ТЕМАТИЧЕСКИЙ ВЫПУСК, ПРИУРОЧЕННЫЙ К I-МУ КАЛИНИНГРАДСКОМУ НАУЧНОМУ ИММУНОЛОГИЧЕСКОМУ ФОРУМУ (27 - 30 ИЮНЯ 2016 Г.), ОБЪЕДИНЯЮЩЕМУ XIII КОНФЕРЕНЦИЮ ИММУНОЛОГОВ УРАЛА, СИМПОЗИУМ ПО ПЕРВИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТАМ «J PROJECT»

Организаторы конференции

Федеральное агентство научных организаций

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Министерство здравоохранения Калининградской области

Балтийский федеральный университет им. И. Канта

Российское научное общество иммунологов

Международный образовательный проект по первичным иммунодефицитам

«J Project» и «JMF»

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН

Косметологическая клиника «Внимания и понимания»

При финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований

ПРЕДСЕДАТЕЛИ ОРГКОМИТЕТА ФОРУМА

Черешнев В.А. — академик РАН (Екатеринбург, Москва),
президент Российского Научного Общества Иммунологов (РНОИ)

Клемешев А.П. — доктор политических наук, профессор, ректор ФГАОУ ВО «Балтийского федерального университета им. И. Канта» (Калининград)

XIII КОНФЕРЕНЦИЯ ИММУНОЛОГОВ УРАЛА

ЗАМЕСТИТЕЛИ ПРЕДСЕДАТЕЛЯ

Литвинова Л.С., д.м.н. (Калининград)
Тузанкина И.А., д.м.н. (Екатеринбург)

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ И НАУЧНЫЙ КОМИТЕТ:

Marodi L., PhD, MD, prof. (Венгрия, Дебрецен)
Дунец Н.А., к.б.н. (Калининград)
Заморина С.А., д.б.н. (Пермь)
Гончаров А.Г., к.м.н. (Калининград)
Головизнин М.В., к.м.н. (Москва)
Зима А.П., д.м.н. (Калининград)
Зубов Д.А., к.б.н. (Украина, Киев)
Зурочка А.В., д.м.н., профессор (Челябинск)
Калинина Н.М., д.м.н., профессор (С.-Петербург)
Кетлинский С.А., д.м.н., чл. — корр. РАН (С.-Петербург)
Козлов В.А., академик РАН (Новосибирск)
Козлов И.Г., д.м.н., профессор (Москва)
Колесникова Н.В., д.б.н., профессор (Краснодар)
Коренев С.В., д.м.н., профессор (Калининград)
Круглик С.В., к.п.н. (Калининград)
Продеус А.П., д.м.н., профессор (Москва)
Раев М.Б., д.б.н. (Пермь)
Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)
Селедцов В.И., д.м.н., профессор (Калининград)
Серебряная Н.Б., д.м.н., профессор (С.-Петербург)
Симбирцев А.С., д.м.н., профессор (С.-Петербург)
Сотникова Н.Ю., д.м.н., профессор (Иваново)
Суховей Ю.Г., д.м.н., профессор (Тюмень)
Тихонова Н.К., д.м.н., профессор (Калининград)
Тотолян А.А., д.м.н., чл. — корр. РАН (С.-Петербург)
Тузанкина И.А., д.м.н., профессор (Екатеринбург)
Хазиахматова О.Г., к.б.н. (Калининград)
Ханферьян Р.А., д.м.н., профессор (Москва)
Хлусов И.А., д.м.н., профессор (Томск)
Черешнева М.В., д.м.н., (Екатеринбург, Москва)
Юров А.В., д.ф. — м.н., профессор (Калининград)
Юрова К.А., к.м.н. (Калининград)

I-Й КАЛИНИНГРАДСКИЙ НАУЧНЫЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ

Заместители председателя:

Литвинова Л.С., д.м.н. (Калининград)
Гончаров А.Г., к.м.н. (Калининград)

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ И НАУЧНЫЙ КОМИТЕТ

Marodi L., PhD, MD, prof.
(Венгрия, Дебрецен)
Дунец Н.А., к.б.н. (Калининград)
Заморина С.А., д.б.н. (Пермь)
Гончаров А.Г., к.м.н. (Калининград)
Головизнин М.В., к.м.н. (Москва)
Зима А.П., д.м.н. (Калининград)
Зубов Д.А., к.б.н. (Украина, Киев)
Зурочка А.В., д.м.н., профессор (Челябинск)
Калинина Н.М., д.м.н., профессор (С.-Петербург)
Кетлинский С.А., д.м.н., чл. — корр. РАН (С.-Петербург)
Козлов В.А., академик РАН (Новосибирск)
Козлов И.Г., д.м.н., профессор (Москва)
Колесникова Н.В., д.б.н., профессор (Краснодар)
Коренев С.В., д.м.н., профессор (Калининград)
Круглик С.В., к.п.н. (Калининград)
Продеус А.П., д.м.н., профессор (Москва)
Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)
Селедцов В.И., д.м.н., профессор (Калининград)
Серебряная Н.Б., д.м.н., профессор (С.-Петербург)
Симбирцев А.С., д.м.н., профессор (С.-Петербург)
Сотникова Н.Ю., д.м.н., профессор (Иваново)
Суховей Ю.Г., д.м.н., профессор (Тюмень)
Тихонова Н.К., д.м.н., профессор (Калининград)
Тотолян А.А., д.м.н, чл. — корр. РАН (С.-Петербург)
Тузанкина И.А., д.м.н., профессор (Екатеринбург)
Хазиахматова О.Г., к.б.н. (Калининград)
Ханферьян Р.А., д.м.н., профессор (Москва)
Хлусов И.А., д.м.н., профессор (Томск)
Черешнева М.В., д.м.н., (Екатеринбург, Москва)
Юров А.В., д.ф. — м.н., профессор (Калининград)
Юрова К.А., к.м.н. (Калининград)

ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМИТЕТ ФОРУМА

Дунец Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А.

ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ:

Российский иммунологический журнал
http://www.iegm.ru/
https://vk.com/event87339815

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР:

BECKMAN COULTER Life Sciences

ГЛАВНЫЕ СПОНСОРЫ:

ВСМ БИОХИММАК

ферон

ОФИЦИАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ:

SkyGen

MERCK

BioVitrum www.biovitrum.ru

НПО ПЕТРОВАКСФАРМ Уникально. Точно. Проверено временем.

пептек

BioCommerce

ДИА•М современная лаборатория www.dia-m.ru заказ on-line

УЧАСТНИКИ ВЫСТАВКИ:

LabTech

ГЕМОТЕСТ

"ИНФАМЕД" "INFAMED"

РОНКОЛЕЙКИН®

Росмедбио РМБ

MCT

CSL Behring Biotherapies for Life™

СОДЕРЖАНИЕ

Том 10 (19), Номер 2 (1), Июнь 2016

РАЗДЕЛ 1
АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИММУНОФИЗИОЛОГИИ **7**

РАЗДЕЛ 2
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ **53**

РАЗДЕЛ 3
ИММУНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ **195**

РАЗДЕЛ 4
ИММУНОПАТОЛОГИЯ:
ПАТОГЕНЕЗ И ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКИХ,
АУТОИММУННЫХ, АУТОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
И ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ **239**

РАЗДЕЛ 5
ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ **327**

РАЗДЕЛ 6
ИНФЕКЦИОННАЯ ИММУНОЛОГИЯ **347**

РАЗДЕЛ 7
ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ И ИММУНОКОРРИГИРУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ **421**

РАЗДЕЛ 8
ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА И ВАКЦИНОТЕРАПИЯ **495**

РАЗДЕЛ 9
АЛЛЕРГОЛОГИЯ И АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА **509**

РАЗДЕЛ 10
ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ
И АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ **519**

СОДЕРЖАНИЕ

Том 10 (19), Номер 2 (1), Июнь 2016

РАЗДЕЛ 11
ТРАНСЛЯЦИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПРАКТИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ **525**

РАЗДЕЛ 12
КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ И ГЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ **561**

РАЗДЕЛ 13
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ **571**

РАЗДЕЛ 14
КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА **585**

РАЗДЕЛ 4
НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СОЗДАНИИ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ **589**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ **601**

Раздел 1
АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИММУНОФИЗИОЛОГИИ

К ВОПРОСУ О ВЗАИМОСВЯЗИ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Бухтояров О. В.[1], Самарин Д. М.[2]

[1]НИИ ФСИН России, Москва; [2]МСЧ-39 ФСИН России, Калининград, Россия

Цель работы заключалась в исследовании влияния высшей нервной деятельности на специфическую противоопухолевую активность иммунной системы у онкобольных с психогенным анамнезом (наличие массивных психотравмирующих событий до постановки онкологического диагноза). В исследовании приняли участие 45 больных, видами злокачественных опухолей: рак молочной железы, яичника, матки, почки, толстой кишки, прямой кишки, желудка, шейки матки, мочевого пузыря, гортани, лёгких, меланома. В плазме крови и в 24-часовых супернатантах крови исследовались цитокины (IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-α, IFN-α, IFN-γ, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, MIG, VEGF, RANTES, EGF, G-CSF, GM-CSF, FGF-basic, HGF, IP-10, Eotaxin), дневной уровень кортизола, кожная реакция ГЗТ на ОАА линии человеческой меланомы BRO. Так же проводились психометрические исследования до и после медикаментозной коррекции психоэмоциональных расстройств. Установлено, что улучшение психоэмоционального состояния и качества жизни онкобольных на фоне психокоррекции ($p=0.0001$) приводит к спонтанному повышению специфической противоопухолевой активности иммунной системы ($p=0.0001$), но не сопровождается достоверными изменениями цитокинового профиля и уровня кортизола ($p>0.05$). Таким образом, супрессия специфической противоопухолевой активности иммунной системы у больных злокачественными опухолями с психогенным анамнезом обусловлена нарушениями высшей нервной деятельности и может быть устранена неиммунологическими методами.

Ключевые слова: онкобольные, противоопухолевый иммунитет, цитокины, кожная реакция гиперчувствительности замедленного типа, высшая нервная деятельность.

Актуальность. Супрессия противоопухолевого иммунитета играет ключевую роль в развитии злокачественных опухолей, а причина иммуносупрессии связана исключительно с биологией опухолевых клеток [1]. Такой подход оставляет в стороне влияние центральной нервной системы (высшей нервной деятельности), как ведущей регуляторной системы организма человека, в том числе, на противоопухолевую активность иммунной системы у больных злокачественными опухолями.

Цель работы заключается в исследовании влияния нарушений высшей нервной деятельности на специфическую противоопухолевую активность иммунной системы у онкобольных с психогенным анамнезом.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 45 больных (39 женщин и 6 мужчин) в возрасте 30-80 лет с гистологически верифицированными 12 видами злокачественных опухолей (рак молочной железы, яичника, матки, почки, толстой кишки, прямой кишки, желудка, шейки матки, мочевого пузыря, гортани, лёгких, меланома). Стадии опухолевой болезни: I – 10 (22.2 %); II – 15 (33.4 %); III – 14 (31.1 %); IV – 6 (13.3 %).Критерии отбора онкобольных: 1) завершение стандартной терапии; 2) наличие психогенного анамнеза (массивные стрессовые события до постановки диагноза рака: смерть близких людей, развод и др.); 3) письменное информированное согласие пациентов.

Исследование цитокинового профиля (Human 30-Plex: IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-α, IFN-α, IFN-γ, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, MIG, VEGF, RANTES, EGF, G-CSF, GM-CSF, FGF-basic, HGF, IP-10, Eotaxin) проводилось в плазме крови и в 24-часовых нативных супернатантах крови онкобольных.

Уровень кортизола исследовался в плазме крови в 16-00.

Специфическая противоопухолевая активность иммунной системы оценивалась по выраженности кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на внутрикожное введение опухолеассоциированных антигенов (ОАА) – лизированных клеток линии человеческой меланомы BRO ($25x10^3$ клеток на один тест). Оценка результатов проводилась в миллиметрах через 12 часов после введения.

Нарушения высшей нервной деятельности определялись с помощью клинико-психопатологического и психометрического (опросник SCL-90, опросник качества жизни SF-36, опросник «Госпитальная шкала тревоги и депрессии», опросник Спилбергера) методов.

Коррекция психоэмоциональных расстройств осуществлялось с использованием антидепрессантов, анксиолитиков и их сочетаний.

Исследование изучаемых показателей проводилось до и после коррекции психоэмоциональных расстройств у онкобольных.

Результаты. Все онкобольные с психогенным анамнезом имели следующие психические нарушения: генерализованное тревожное расстройство (F41.1) – 17 больных (37.8 %), смешанное тревожное и депрессивное расстройство (F41.2) – 2 (4.4 %), длительная депрессивная реакция (F43.21) – 2 (4.4 %), смешанная тревожная и депрессивная реакция (F43.22) – 20 (44.5 %) и органическое тревожное расстройство (F06.4) – 4 (8.9 %). У всех больных в течение 3-8 месяцев (в среднем 4.5 мес.) на фоне клинического улучшения психоэмоционального состояния достигнуто достоверное улучшение психометрических показателей (p=0,0001) и повышение качества жизни (p=0,0001).

Размер гиперемии кожи при реакции ГЗТ на ОАА до коррекции психоэмоциональных расстройств составлял 2.62±0.54 мм, после психокоррекции – 7.80±0.96 мм (p=0.0001). Изменение показателей кожной реакции ГЗТ на ОАА не сопровождалось достоверными изменениями уровня концентраций 30 цитокинов, как в нативной плазме, так и 24-часовых супернатантах крови (p>0.05), не имело достоверных взаимосвязей с ними (p>0.05) и с уровнем кортизола (p>0.05). В то же время, повышение специфической противоопухолевой активности иммунной системы у больных злокачественными опухолями имело достоверную обратную связь с уровнем тревоги (r= –0.34, p=0.028), которая считается облигатным симптомом у этой категории больных [2].

Заключение. В настоящем исследовании установлено повышение специфической противоопухолевой активности иммунной системы при улучшении психоэмоционального состояния у больных злокачественными опухолями с психогенным анамнезом. Это повышение активности противоопухолевого иммунитета не сопровождалось достоверным изменением 30 цитокинов в плазме крови и 24-часовых супернатантах крови, что не позволило выявить цитокиновый механизм этого явления. Полученные данные в определённой мере могут расширить понимание причин иммуносупрессии при злокачественных опухолях и помочь в разработке новых подходов к иммунотерапии злокачественных опухолей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weinberg R. A. The biology of cancer. Garland Science / R. A. Weinberg.– New York, 2006.– 796 p.
2. Stark D., Kiely M., Smith A. Anxiety disorders in cancer patients: their nature, associations, and relation to quality of life / D. Stark, M. Kiely, A. Smith // J. Clin. Oncol.– 2002.– Vol. 20, № 14.– P. 3137-3148.

ON THE QUESTION OF THE RELATIONSHIP OF HIGHER NERVOUS ACTIVITY AND ANTITUMOR IMMUNITY IN PATIENTS WITH MALIGNANT TUMORS

Bukhtoyarov O.V.[1], Samarin D.M.[2]

[1]SRI Federal Penal Service of Russia, Moscow; [2]Medical and Sanitary Unit № 39 of the FPS of Russia, Kaliningrad, Russia

The purpose of this research was to study the influence of a higher nervous activity on specific antitumor activity of the immune system in cancer patients with a psychogenic medical history (the presence of massive psycho traumatic events before statement of oncological diagnosis). The study involved 45 patients with 12 types of cancer (breast, ovary, uterus, kidney, colon, rectum, stomach, cervix, bladder, larynx, lung, melanoma). Studied cytokines (IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-α, IFN-α, IFN-γ, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, MIG, VEGF, RANTES, EGF, G-CSF, GM-CSF, FGF -basic, HGF, IP-10, Eotaxin) in blood plasma and in 24-hour supernatants of blood, daily cortisol level, DTH (delayed-type hypersensitivity) skin reaction on TAA (tumor-associated antigens) human melanoma cell line BRO, as well as psychometric studies conducted before and after pharmacological interventions of psycho-emotional disorders. It was found that the improvement of psycho-emotional state and quality of life of cancer patients on the background of psychocorrection ($p = 0.0001$) leads to spontaneous improvement of specific antitumor activity of the immune system ($p = 0.0001$), but not accompanied by significant changes of cytokine profile and cortisol levels ($p > 0.05$). Thus, the suppression of specific antitumor activity of the immune system in cancer patients with psychogenic medical history caused by dysfunction of higher nervous activity and can be eliminated by non-immunological means.

Keywords: cancer patients, antitumor immunity, cytokines, delayed type hypersensitivity skin reaction, higher nervous activity.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ ПРИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Керимова М.К.

Азербайджанский Медицинский Университет, Баку, Азербайджан

Целью исследования явилось изучение клинико-иммунологических особенностей хламидийной инфекции у ЧБД при острых респираторных заболеваниях. С этой целью мы обследовали 340 ЧБД с респираторными заболеваниями. Выявленная депрессия параметров клеточного иммунитета, дисиммуноглобулинемия, повышение провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНОα) у наблюдавшихся больных может явиться фоном для развития рецидивов синдрома бронхиальной обструкции при последующих эпизодах ОРВИ с развитием в дальнейшем хронической патологии респираторного тракта инфекционного и аллергического генеза.

Ключевые слова: хламидийная инфекция, часто болеющие дети, респираторные заболевания.

«Часто болеющие дети (ЧБД) » – это термин, обозначающий группу детей, выделяемую при диспансерном наблюдении, характеризующуюся более высоким, чем их сверстники, уровнем заболеваемости острыми респираторными инфекциями. У этих детей повторные

острые респираторные заболевания склонны к затяжному течению, развитию осложнений и рецидивированию [1, 2]. Наиболее частым возбудителем ОРЗ у ЧБД являются вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальные вирусы. В последние годы все больше внимания в развитии ОРЗ привлекает возросшая роль оппортунистических инфекций, таких как хламидия, микоплазма и др. Есть убедительные данные о том, что оппортунистические возбудители, как внутриклеточные патогены, персистируют в организме и способствуют рецидивированию воспалительного процесса [2-4].

Целью нашей работы явилось изучение клинико-иммунологических особенностей хламидийной инфекции у ЧБД при острых респираторных заболеваниях.

Материалы и методы. В исследование были включены 340 ЧБД в возрасте от 6 месяца до 6 лет. Контрольную группу составили 30 практических детей аналогичного возраста. Посредством ПЦР у 53 детей (15,6 %) выявлена *Chlamydia pneumoniae*, у 33 детей (9,7 %) – *Chlamydia traxomatis*. При обследовании детей использовали следующие методы: 1) для верификации этиологических факторов применяли метод ПЦР; 2) количество CD 3$^+$, CD 4$^+$, CD 8$^+$, CD 19$^+$-клеток – с помощью проточной цитометрии; 3) содержания ИгА, ИгG, ИгМ в сыворотке крови – методом радиальной иммунодиффузии по G. Manchini, ИгЕ – по методу IFA; 4) содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ФНОα, ИЛ-6, ИЛ-8 и IL-2 – по методу иммунохемилюминисценции, ИНФ-γ – по методу IFA.

Результаты и обсуждение. По результатам наших исследований выявлено, что у детей, часто болеющих респираторными инфекциями, в большинстве случаев обнаруживается хламидийная инфекция, в частности *Chlamydia pneumoniae,* и клиническая картина заболевания у этих детей имеет свои особенности. Так как у ЧБД с хламидийной инфекцией респираторное заболевание сопровождается в большинстве случаев бронхообструктивным синдромом. Заболевание у этих детей начиналось постепенно, мало выраженными катаральными явлениями на фоне повышения температуры тела до 37,3-37,5 °С, нерезким нарушением самочувствия и состояния больного. Бронхообструктивный синдром с умеренно выраженной одышкой появлялся на 4-5-й день заболевания. Проявления конъюнктивита были у 22,2 % больных. Микрополиадения наблюдалась у 33,3 % больных. Гепатомегалия отмечена у 19,4 % детей. На рентгенограмме грудной клетки у этих детей отмечалось умеренное усиление с деформацией бронхососудистого рисунка, эмфизематозное вздутие легочной ткани. У 8,3 % больных была обнаружена инфильтрация. В общих анализах крови отмечалась склонность к лейкопении, небольшой эозинофилии, СОЭ была в пределах нормы или же несколько повышена. Обструкция бронхов имела затяжной характер, и купировались, как правило, к концу 2-й недели от начала обструкции. Продолжительность заболевания составила 20-21 день.

Результаты иммунологических исследований свидетельствовали о нарушениях, в основном, показателей клеточных параметров иммунитета, т.е. снижения количества CD 3$^+$-, CD 4$^+$-клеток, ИРИ (CD 4$^+$/CD 8$^+$). У ЧБД с хламидийной инфекцией количество CD 3$^+$ клеток был равен 33,8±0,3 %, а CD 4$^+$ клеток – 17,1±0,4 % (у здоровых детей количества CD 3$^+$ и CD 4$^+$ клеток составило соответственно 52,0±2,6 % и 33,5±1,2 %, P < 0,001). Иммунорегуляторный индекс у этих детей был равен 1,02±0,02, тогда как у здоровых детей – 1,56±0,06. Со стороны гуморальных параметров иммунитета было отмечено выраженное снижение уровня Ig A (0,25±0,1г/л; у здоровых детей – 0,62±0,03г/л; P < 0,001), и несколько снижение уровня Ig G (9,1±0,03г/л; у здоровых детей – 12,4±0,6г/л; P < 0,001). Наблюдалось увеличение продукции сывороточных Ig E и Ig M. Так как у ЧБД с хламидийной инфекцией концентрация Ig E была равна 436,0±12,0 U/ml, тогда как у здоровых детей этот показатель был равен 23,5± 0,8 U/ml (P < 0,05). На наш взгляд, повышение уровня Ig E у этих детей предсказывает о риске формирования аллергической патологии респираторного тракта. Повышение концентрации Ig M у этих детей (1,73±0,2 г/л; у здоровых детей 0,9±0,03 г/л P < 0,001) связано с персистенцией инфекции.

Со стороны цитокинового профиля, отмечалось повышение концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНОα снижение концентраций ИЛ-2 и ИНФ-γ. Повышение провоспалительных цитокинов, в основном, отмечалось в содержании ИЛ-1β (189,1±7,8 pg/ml; в то время как у здоровых детей он составил 44,8±2,8 pg/ml; P < 0,001), так

как провоспалительный цитокин ИЛ-1 играет большую роль в механизме бронхиальной обструкции [5].

Таким образом, наблюдающаяся депрессия иммунитета у ЧБД хламидийной инфекцией, выражавщаяся в снижении CD 3^+, CD 4^+ клеток, CD 4^+/CD 8^+), уровня ИЛ-2 и ИНФ-γ и сывороточного Ig A, увеличении концентрации сывороточных Ig E, Ig M и провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНОα (в основном ИЛ-1β), может явиться фоном для развития основного клинического синдрома заболевания – бронхообструктивного синдрома. Частые ОРИ и персистирующая хламидийная инфекция могут приводить к рецидированию заболевания. Дети, имеющие наследственную отягощенность по гиперреактивности бронхов, составляют группу риска по развитию хронического воспаления слизистой оболочки бронхиального дерева и формированию хронической инфекционной и аллергической патологии респираторного тракта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Самсыгина Г. А. Проблема часто болеющих детей в педиатрии / Г. А. Самсыгина // Педиатрия.– 2015.– Т. 94, № 1.– С. 167-169.
2. Савицкая Н. А. Диагностика и характеристика оппортунистических инфекций у часто болеющих детей при острых респираторных заболеваниях и в периоде ремиссии: автореф. дис. на соиск. учен.степ. канд. мед. наук. / Н. А. Савицкая.– Москва, 2007.– 24 с.
3. Синдром бронхиальной обструкции у детей раннего возраста с респираторными инфекциями различной этиологии: особенности клинических проявлений и иммунного ответа / В. К. Котлуков, Б. М. Блохин, А. Г. Румянцев и др. // Педиатрия.– 2006.– № 3.– С. 14-21.
4. Рябчук Ф.Н., Пирогова З. И. Клинико-лабораторная характеристика персистирующих инфекций хламидийной и микоплазменной этиологии у детей / Ф. Н. Рябчук, З. И. Пирогова // Лечащий врач.– 2011.– № 1.– С. 42-45.
5. Спичак Т.В., Катосова Л. К. Роль хламидийной инфекции при бронхиальной астме у детей / Т. В. Спичак, Л. К. Катосова // Педиатрия – 2009.– Т. 87, № 2.– С. 19-26.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF CHLAMYDIAL INFECTION IN FREQUENTLY ILL CHILDREN WITH RESPIRATORY DISEASES

Karimova M. K.

Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

The aim of investigation was to study the clinical and immunological features of the Chlamydia infection in frequently ill children (FIC) with respiratory diseases. With this purpose we examined 340 FIC with respiratory diseases. It was revealed cell immunity depression, disimmunoglobulinemia, increased proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα) in examined patients can be the base for syndrome of bronchial obstruction recurrence during next episodes of ARVI and for development of chronic infections and allergic pathology of respiratory tract.

Keywords: Chlamydial infection, frequently ill children, respiratory diseases.

НЕЙРОИММУННЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Керимова М. К.

Азербайджанский Медицинский Университет, Баку, Азербайджан

Целью исследования явилось изучение нейроиммунных параметров ЧБД с респираторными заболеваниями. С этой целью мы обследовали 340 ЧБД с респираторными заболеваниями. Выявлена депрессия клеточных параметров иммунитета, дисиммуноглобулинемия, повышение провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНОα и уровня нейропептида- субстанции П, снижение концентраций ИЛ-2 и ИФН-γ. Установлена тесная взаимосвязь между субстанцией П и параметрами иммунной системы.

Ключевые слова: часто болеющие дети, респираторные заболевания, субстанции П, иммунная система.

Детей с частыми повторными инфекциями дыхательных путей принято объединять в группу диспансерного наблюдения «часто болеющих детей (ЧБД)», нуждающихся в пристальном внимании педиатров. Таких детей характеризует высокая заболеваемость, затяжное течение острых респираторных заболеваний, их тяжесть, тенденция к хроническому течению [1].

Известно, что в основе патогенеза многих патологий, в том числе и заболеваний дыхательных путей, лежат изменения в иммунной системе. Иммунная система вместе с нервной, эндокринной и другими системами обеспечивает гомеостаз организма в условиях постоянно изменяющихся факторов внешней и внутренней среды [2].

Целью нашей работы явилось изучение нейроиммунных параметров ЧБД с респираторными заболеваниями.

Материалы и методы. Было исследовано 340 ЧБД, 125 редко болеющие дети – РБД (дети, болеющие ОРЗ менее 3-х раз в течение года) в качестве группы сравнения и 30 практически здоровых детей в возрасте от 6 месяцев до 6 лет. У 16,1 % ЧБД (55 детей) отмечалась неосложненная ОРВИ, у 21,8 % (74 ребенка) – острый бронхит, у 51,5 % (175 детей) – рецидивирующий бронхит, у 10,6 % (36 детей) – острая пневмония. Острая пневмония в 33 % случаев протекала без осложнений, в 67 % случаев сопровождалась различными осложнениями. У большей части больных группы ЧБД выявлены фоновые и сопутствующие заболевания. У РБД фоновые и сопутствующие заболевания встречались с меньшей частотой (16,2 %). У 34 человек (10 %) из ЧБД выявлен рахит II степени, у 36 детей (10,6 %) – гипотрофия I степени, у 7 детей (2,1 %) – гипотрофия II степени, у 12 детей (3,5 %) – тимомегалия, у 68 детей (20 %) – экссудативно-катаральный диатез, у 115 (33,8 %) детей – железодефицитная анемия, у 177 детей (52,1 %) – гельминтоз и паразитоз (энтеробиоз, аскаридоз, лямблиоз), у 230 детей (67,6 %) – дисбактериоз.

Нейропептид – субстанция определялась иммуноферментным методом на анализаторе «Stat Fax» с помощью приобретенных в фирме PENINSULA LABORATORIES INC. (США) реактивов. Больные были обследованы как в остром периоде заболевания, так и в период клинической ремиссии. Иммунные показатели – количество $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$-клеток определялось методом проточной цитометрии – на аппарате "Epics XL" ("BECKMAN COULTER", США), концентрация сывороточных иммуноглобулинов A, G, M определялась методом радиальной иммунодиффузии G. Manchini (1968), уровень Ig E в сыворотке крови – методом иммуноферментного анализа (ИФА). Уровень цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-α проверялся посредством автоматического анализатора «IMMULITE» (США) иммунохемилюминесцентным методом, уровень ИФН-γ – методом ИФА.

Результаты и обсуждение. Результаты наших исследований выявили, что у всех детей с респираторными заболеваниями в остром периоде заболевания отмечается повышение уровня субстанции П в сыворотке крови. Так как, у здоровых детей этот показатель был равен 1,6±0,05 пг/мл, у РБД – 3,67±0,12 пг/мл, а у ЧБД – 6,15±0,26 пг/мл (p<0,001), т.е. у ЧБД повышение уровня субстанции П в остром периоде заболевания было более выражено, чем у РБД. В периоде клинической ремиссии у РБД уровень субстанции П приблизился к уровню здоровых детей (1,75±0,1 пг/мл), тогда как у ЧБД нормализации не отмечалось (4,18±0,28 пг/мл).

Вызывает интерес, что у ЧБД цитокиновый профиль также отличался от показателей РБД. Так как, в остром периоде заболевания у ЧБД в ходе изучения цитокинового статуса была получена следующая картина: наблюдалось повышение концентраций провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α: ИЛ-1β – 148,4±9,6 пг/мл (у РБД – 54,6± 3,5 пг/мл, у здоровых детей – 44,8±2,8 пг/мл); ФНО-α – 162,3±10,0 пг/мл (у РБД – 66,8± 2,4 пг/мл, у здоровых детей – 54,5±2,4 пг/мл); ИЛ-6 – 16,2±1,0 пг/мл (у РБД – 7,8±0,6 пг/мл, у здоровых детей – 6,5±0,2пг/мл); ИЛ-8 – 92,0± 3,4 пг/мл (у РБД – 66,3±2,1 пг/мл, у здоровых детей – 54,3±3,3 пг/мл), (p<0,001). ИЛ-2 и ИФН-γ в остром периоде заболевания снизились до 124,6±6,8 Ед/мл и 32,4±2,4 пг/мл соответственно (p<0,001). Концентрация ИЛ-2 у РБД составила 223,8±12,7 Ед/мл, а у здоровых детей 292,0±9,8 Ед/мл. А концентрация ИФН-γ у РБД – 64,1±2,8 пг/мл, а у здоровых детей 86,2±4,6 пг/мл. Изменения в цитокиновом статусе в остром периоде заболевания не нормализовались и в период клинической ремиссии. Наблюдаемый и в период клинической ремиссии высокий уровень воспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α доказывают длительное сохранение воспаления. При исследовании иммунологических показателей выявлено, что в остром периоде CD 3$^+$-клетки составляли 40,0±1,2 %, (p<0,001), (у РБД – 46,0±2,2 %, у здоровых детей – 52,0± 2,6 %), CD 4$^+$-клетки составили 20,0±1,6 % (p<0,001). У РБД CD 4$^+$-клетки были отмечены в 28,7±1,2 % (p<0,01), у здоровых детей – в 33,5±1,2 % случаев. Что касается содержания CD 8$^+$-клеток, то они составили 20,0±0,5 % (p<0,05). У РБД этот показатель был 17,3±0,3 %, у здоровых детей – 18,5±0,5 %. Коэффициент CD 4$^+$/CD 8$^+$ составлял 1,01±0,02 (p<0,001). У РБД баланс иммунорегуляторных клеток равнялся 1,50±0,03, у здоровых детей – 1,56±0,06. Что касается показателей гуморального иммунитета, содержание CD 19$^+$-клеток составляло 10,8±0,5 %, (p<0,001), (у РБД – 14,5±0,3; p<0,01, у здоровых детей – 16,8±0,7). Уровень Ig A был 0,35±0,02 г/л (p<0,001), у РБД – 0,50±0,02 г/л (p<0,01), у здоровых детей – 0,62±0,03 г/л. Концентрации Ig G в сыворотке крови снизилась до 9,5±0,5 г/л (p<0,001) (у РБД этот показатель составлял 10,8±0,7 г/л, у здоровых детей – 12,4±0,6 г/л). Концентрация Ig M, возрастая в остром периоде заболевания, составляла 1,45±0,06 г/л (p<0,001). У РБД этот показатель равнялся 1,20±0,02 г/л (p<0,001), у здоровых детей – 0,90±0,03 г/л. У данных детей, особенно при обструктивной форме, наблюдалось возрастание уровня Ig E. Так, при необструктивной форме уровень Ig E составлял 54,0±3,8 МЕ/мл, при обструктивной форме – 436,2±12,0 МЕ/мл (p<0,001). Концентрация общего Ig E в сыворотке крови здоровых детей составляла 23,5±0,8 МЕ/мл, РБД – 24,8±0,8 МЕ/мл.

В ходе исследования выявлено, что между этими показателями существует тесная корреляционная связь. Высокая корреляционная связь выявлена между уровнем ИЛ-1β и уровнем субстанции П (r=+0,64). В связи с тем, что ИЛ-1β может проникать через гематоэнцефалический барьер, он, оказывая влияние на гипоталамический и гипофизарный центры, ускоряет синтез субстанции П из нервных окончаний. Повышенный уровень субстанции П, в свою очередь, воздействуя на макрофаги, усиливает секрецию ИЛ-1β из них. Установлена тесная отрицательная корреляционная взаимосвязь между субстанцией П и CD 4$^+$-клетками, ИЛ-2 и ИФН-γ (между П – CD 4$^+$ r = – 0,48, между П – ИЛ-2 r= –0,45 и между П – ИФН-γ r= –0,4). По нашему мнению, это естественно, т.к. субстанция П повышает сосудистую проницаемость, ускоряет миграцию иммунокомпетентных клеток воспалительной ткани (Т-лимфоциты и их субпопуляции), в конечном итоге уменьшает их количество. Учитывая то, что ИЛ-2 и ИФН-γ секретируются исключительно иммунокомпетентными клетками, говоря более точно, Th1-клетками, становится ясно, что высокий уровень субстанции П приводит к уменьшению ИЛ-2 и ИФН-γ, имеющих существенное значение в борьбе с вирусной инфекцией [2-5].

Таким образом, становится ясно, что играющая существенную роль в патогенезе респираторных заболеваний иммунная система действует во взаимосвязи с другими важными системами, в том числе и нервной системой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов А.А., Альбицкий В.Ю. Социальные и организационные проблемы педиатрии / А.А. Баранов, В.Ю. Альбицкий – М.– 2003.– 233-252 с.
2. Пальцев М.А., Кветной И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии / М.А. Пальцев, И.М. Кветной.– М.: Медицина, 2008.– С. 15-512.
3. Варианты развития острого системного воспаления / Е.Ю. Гусев, Л.Н. Юрченко, В.А. Черешнев и др. // Цитокины и воспаления.– 2008.– Т. 7, № 2.– С. 9-17.
4. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев.– СПб.: Издво «Фолиант», 2008.– 552 с.
5. Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж. От нейрона к мозгу / Дж.Г. Николс, А.Р. Мартин, Б. Дж Валлас.– Пер. с англ. 4-е изд. М.: УРРС, 2003.– С. 525-531.

NEUROIMMUNE PARAMETERS OF FREQUENTLY ILLCHILDREN WITH RESPIRATORY DISEASES

Karimova M.K

Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

The aim of investigation was to study the neuroimmune parameters in frequently ill children (FIC) with respiratory diseases.With this purpose we examined 340 FIC with respiratory diseases. It was revealed cell immunity depression, disimmunoglobulinemia, increased proinflammatory cytokines IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα and neuropeptide – substance P, reducing IL-2 and IFN-γ, the high correlation between the parameters immune system and substance P.

Keywords: frequently ill children, respiratory diseases, immune system, substance P.

ОЦЕНКА АПОПТОЗА СПЕРМАТОЗОИДОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ Fas-АНТИГЕН, ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО FasL

Плосконос М.В.[1,2]

[1]ГБОУ ВПО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России; [2]Каспийский институт морского и речного транспорта — филиал ФГБОУ ВО ВГУВТ, Астрахань, Россия

Цель исследования состояла в выявлении экспрессии Fas-антигена на сперматозоидах мужчин разной фертильности и попытки индукции рецепторного (мембранного) апоптоза спермиев при помощи рекомбинантного FasL. Исследованыэякуляты46 фертильных и 78 субфертильных мужчин. После выявления экспрессии Fas на сперматозоидах индукцию апоптоза осуществляли, инкубируя клетки с 1 мг/мл рекомбинантного FasL в течение 4 ч. Документация апоптоза проводилась при помощи конъюгированного с флуорохромом аннексина-V. Экспрессия Fas антигена на сперматозоидах фертильных мужчин наблюдалась чаще, чем у субфертильных. У фертильных доноров (Fas+) клеток в эякуляте было менее 10 %, а у субфертильных превышало 10 %. Индуцировать рецепторный апоптоз через Fas-рецептор на сперматозоидах не удалось. Вероятно, Fas-рецепторы на сперматозоидах не активны или не функционируют после эякуляции.

Ключевые слова: сперматозоиды, фертильность, Fas, FasL, апоптоз.

Апоптоз – особый вид гибели клетки – является фундаментальным процессом регулирования иммунной системы. Поэтому иммунология – та область знаний, в которой роль апоптоза определялась достаточно разносторонне. Однако апоптозу принадлежит важная роль и в регуляции сперматогенеза, но ощущается недостаток сведений о факторах, вызывающих апоптоз половых клеток и как следствие нарушение фертильности.

Маркёрами апоптоза являются белки мембраны клеток – рецептор Fas (CD 95) и его лиганд FasL, через которые реализуется рецепторный (мембранный) механизм апоптоза. Fas-рецепторно-лигандная система вовлечена в регуляцию числа половых клеток, в отслеживание и удаление повреждённых клеток в процессе сперматогенеза, а так же в защиту от иммунологических реакций в иммунологически привилегированных тканях – в яичках [1].

Поскольку сперматозоиды появляются у мальчиков в 11-13 лет и содержат антигены, ранее не контактировавшие с иммунными клетками, на них может развиться иммунный ответ. Чтобы этого избежать, сперматозоиды развиваются в сперматогенных канальцах, стенки которых пропускают кислород, гормоны, питательные вещества, но не позволяют контактировать с циркулирующими в крови иммунными клетками. Все структуры семенного канальца, в первую очередь клетки Сертоли, образуют особый барьер – гематотестикулярный. Экспрессируясь на клетках Сертоли, FasL связывается с Fas на поверхности лимфоцитов и запускает сигнал апоптоза лимфоцитов, проникших в паренхиму яичка [1].

К настоящему времени в мировой литературе нет единого мнения исследователей, касающегося экспрессии маркёров апоптоза – Fas и FasL на поверхности зрелых эякуляторных сперматозоидов [2, 3], что диктует необходимость дальнейших исследований в этом направлении. Кроме того, в ранних исследованиях не выявлено индукции рецепторного апоптоза через Fas-рецептор на сперматозоидах человека.

Поэтому **целью** исследования было выявить экспрессию Fas-антигена на сперматозоидах мужчин разной фертильности и попытаться индуцировать апоптоз спермиев при помощи рекомбинантного FasL.

Исследованы эякуляты 46 фертильных и 78 субфертильных мужчин (средний возраст 33,5±0,7 лет). Измерение показателей стандартной спермограммы проводили, используя нормативы и рекомендации ВОЗ.

Определение на поверхности сперматозоидов экспрессии Fas включало в себя традиционную подготовку препаратов сперматозоидов, обработанных меченными фикоэритрином (PE) моноклональными антителами CD 95 (CaltagLbs.), с последующей флюоресцентной микроскопией.

Эякуляты, содержащие (Fas+)-сперматозоиды, делили на две части: отмытые сперматозоиды одной части инкубировали в течение 4 ч в среде В-2 с 5 % CO_2 при 37 °С (контроль). Сперматозоиды другой части инкубировали в течение 4 ч при тех же условиях инкубации, только с добавлением 1 мг/мл рекомбинантного FasL (KamiyaBiomedicalCompany, USA) (опыт).

Сразу после инкубации проводилась документация апоптоза, признаком которого считали экстернализацию фосфатидилсерина на внешнюю сторону клеточной мембраны сперматозоида, при помощи конъюгированного с флуорохромом аннексина-V (AnV-FITC) и йодида пропидия (PI). Производился подсчёт количества (AnV^+/PI^-)-сперматозоидов методом флуоресцентной микроскопии.

Выявлено, что экспрессия Fas-антигена на сперматозоидах фертильных мужчин наблюдалась почти в 90 % случаев (у 41 из 46 мужчин), причём количество (Fas+)-клеток у этих мужчин оказалось менее 10 %. У 53 % обследованных субфертильных мужчин (у 41 из 78) более 10 % сперматозоидов оказались Fas-положительными.

Следует подчеркнуть, что экспрессия Fas на клетках свидетельствует лишь о потенциальной готовности клетки к Fas-зависимому апоптозу, но ни в коей мере не является доказательством апоптоза [1, 4, 5].

Наблюдаемая экспрессия Fas-рецептора, вероятно, произошла ещё в период сперматогенеза и Fas-маркированные клетки это те клетки, которые должны были быть устранены в процессе апоптоза, но, по каким-то причинам, механизмы рецепторного (мембранного) апоптоза не были закончены, либо были отложены, либо функционировали неправильно [4, 5].

Далее эксперимент по индукции рецепторного (мембранного) апоптоза проводили с эякулятами мужчин, в которых были выявлены Fas-положительные сперматозоиды.

Выявлено, что после 4-х часовой инкубации клеток с 1 мг/мл рекомбинантного FasL (опыт) изменение количества (AnV^+/PI^-)-сперматозоидов по сравнению с контролем было стастистически не достоверно ($p>0,05$).

Таким образом, хотя экспрессия Fas–антигена была обнаружена на сперматозоидах, как фертильных так и субфертильных мужчин, но индуцировать рецепторный (мембранный) апоптоз через Fas-рецептор не удалось. Вероятно, Fas-рецепторы на сперматозоидах не активны или не функционируют после эякуляции.

Тем не менее, выявленные различия в экспрессии белков маркёров апоптоза: Fas и FasL, на поверхности сперматозоидов фертильных и субфертильных мужчин могут представлять интерес для диагностического использования в практической андрологии, так как позволят дополнить диагностический арсенал при исследовании мужской репродуктивной функции и тем самым повысить информативность исследования причин нарушения фертильности сперматозоидов, а так же сократить группу так называемого идиопатического бесплодия у мужчин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плосконос, М. В. Роль маркёров апоптоза Fas и FasL в сперматогенезе / М. В. Плосконос // Урология. – 2012. – № 1. – С. 77-80.
2. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm / CM. McVicar, N. McClure, K. Williamson et al.// Fertil. Steril. – 2004. – V. 81, № 1. – P. 767-774.
3. Perticarari, S. Отсутствие рецептораFas на поверхности сперматозоидов в эякуляте / S. Perticarari // В журнале Пробл. репрод. – 2008. – № 5. – С. 100.
4. Плосконос, М.В., Николаев, А.А. «Абортивный» апоптоз сперматозоидов: какова его доля в эякуляте фертильного мужчины / М. В. Плосконос, А. А. Николаев // Пробл. репрод. – 2014. – Т. 20, № 6. – С. 70-75.
5. Плосконос, М. В. Исследование экспрессии белков – маркёров апоптоза Fas и FasL на человеческих сперматозоидах / М. В. Плосконос // Пробл. репрод. – 2015. – Т. 21, № 2. – С. 94-97.

EVALUATION OF APOPTOSIS SPERM EXPRESSING Fas-ANTIGEN AFTER EXPOSURE RECOMBINANT FasL

Ploskonos M. V.[1,2]

[1]Astrakhan State Medical University Health Ministry of Russian Federation; [2]Volga State University of Water Transport Caspian Institute of Sea and River Transport, Astrakhan, Russia

The purpose of the study was to identify the expression of Fas-antigen in the sperm of men of different fertility and attempts to induce receptor (membrane) of apoptosis using sperm recombinant FasL. Abstract 46 ejaculates of fertile and 78 subfertile men. After identifying Fas expression on sperm apoptosis induction was performed by incubating the cells with 1 mg/ml recombinant FasL for 4 hours. The documentation of apoptosis was performed using fluorochrome-conjugated annexin-V. Expression of Fas on the sperm of fertile men was observed more frequently than in subfertile. But in fertile donors (Fas+)-cells in the ejaculate was less than 10 %, and subfertile – more than 10 %. However, it was not possible to induce apoptosis through the Fas-receptor on the sperm. Probably, Fas-receptors on the sperm are not active or do not function after ejaculation.

Keywords: spermatozoa, fertility, Fas, FasL, apoptosis.

СОПРЯЖЕННОСТЬ РЕАГИРОВАНИЯ ПСИХИКИ, ИММУННОЙ И ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ КОЛЛЕКТИВА

Петров С. А.[1], Фишер Т. А.[1], Фишер И. В.[2]

[1]Тюменский научный центр СО РАН; [2]Тюменский институт повышения квалификации сотрудников МВД России, Тюмень, Россия

Рассматриваются психофизиологические механизмы адаптации сотрудников правоохранительных органов МВД России при прохождения ими профессиональной подготовки. Даётся обоснование того, что поиск новых методологических подходов изучения адаптационных механизмов на неблагоприятное воздействие можно рассматривать с точки зрения функционального изоморфизма психики и иммунной системы при тесном взаимодействии с эндокринной системой. Изучено стрессорное воздействие в контексте этапов специфического иммунного ответа. Установлено, что сопряженность регулирующих систем является единым механизмом реагирования в системе жизнеобеспечения.

Ключевые слова: стадии стресса, психика, этапы иммунного ответа.

Актуальность. Иммунные дисфункции нередко обусловлены, а часто и детерминированы психогенными факторами и оказываются вовлеченными в единый механизм саморегуляции организма [4, 5]. При этом иммунопатологические состояния вызывают психологический дискомфорт [3]. Обсуждается «параллелизм» или некая синхронизация функционирования психики и иммунной системы. Наличие общей функциональной направленности не исключает функционального сопряжения («партнерства»), то есть согласования сценариев и способов решения общей задачи через специфические факторы, запускающие соответствующие реакции. Для психической системы описаны стадии стресса на стимулы психогенного происхождения. Для иммунной системы, описаны этапы иммунного ответа на чужеродный антиген. Принимая во внимание вероятную сопряженность функционирования этих систем, можно предположить, что иммунная система должна отвечать не только на инфекционный антиген, но и на антиген психического происхождения «психоген», в рамках общепринятых этапов иммунного ответа.

Таким образом, в качестве антигена может выступать стрессорное воздействие. Особенно это актуально для сотрудников органов внутренних дел (ОВД), у которых профессиональная деятельность в системе МВД отличается своей интенсивностью и напряженностью, экстремальностью условий деятельности при выполнении служебных обязанностей в жестко ограниченные сроки и пр. [2]. При этом достаточно описаны этапы специфического иммунного ответа и отсутствуют сведения описывающие динамику функционирования иммунной системы на «психоген» в рамках общепринятой этапности иммунного ответа.

Цель – оценить физиологическую сопряженность функционирования психики, иммунной и эндокринной систем на разных этапах адаптации организма у сотрудников ОВД к условиям нового, временного коллектива, а также дать модельное описание механизмов психоиммунных связей.

Методы исследования. Обследовано 59 сотрудников патрульно-постовой службы, мужского пола, средний возраст в группе составил 23,5±0,71 лет. Исследования проводились на 1, 4, 14 и 21 сутки в соответствии с фазами иммунного ответа на патогенный объект. В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определялась репертуарные цитокины ИЛ-4 и ИНФγ, а также содержания гормо-

нов – серотонина и кортизола. Психологическое тестирование проводилось после занятий, в середине дня, когда наблюдается высокий уровень активности и соблюдены привычные условия жизни (общение, профессиональная нагрузка, питание и пр.). Использовались следующие методы: 8-цветовой тест М. Люшера, САН (самочувствие, активность, настроение), СП-климат (социально-психологический климат в коллективе) в модификации методики Марьина и др. Статистическая обработка материала проведена на ПЭВМ IBM/PC при помощи стандартных статистических пакетов «SPSS 11,5 for Windows».

Результаты исследования. Установлено, что психо-иммуно-эндокринные взаимодействия связаны с выполнением единой функции гомеостатического баланса по устранению внешних и внутренних раздражителей. Такое глубокое взаимодействие возможно лишь при наличии общих функциональных свойств. При формировании временного коллектива в новых условиях возможности одной системы выступают дополнительным ресурсом для другой [1]. При этом психоэмоциональное состояние (уровень вегетативного коэффициента) сопряжено с уровнем содержания сывороточного ИНФγ: мобилизация психических защит выступает сигналом тревоги для иммунных защит, и наоборот, «запуск» иммунных защит выступает сигналом для мобилизации защит психических.

В работе представлена попытка максимально приблизиться к интегрированному, комплексному подходу, который бы в единстве рассматривал известные механизмы приспособления организма при реакции на неспецифические и специфические раздражители. Нами выявлено, что даже незначительное по силе психоэмоциональное напряжение (заранее ожидаемые изменение условий существования) способно изменять уровень кортизола и серотонина и снижать функциональную активность специфических звеньев иммунной системы через репертуарные медиаторы Т-хелперных клонов лимфоцитов (ИЛ-4 и ИНФγ). В связи с этим нами показано, что возникающая неспецифическая реакция на психическое напряжение «психоген» также активирует функциональное состояние Т-хелперных клонов лимфоцитов в поиске адаптивных программ для поддержания гомеостатического равновесия.

Прослежена динамика функционирования иммунной системы на «антиген» психического происхождения в рамках общепринятой этапности специфического иммунного ответа. Установлено, что иммунная система также откликается на «психоген», как и на инфекционный антиген, запуская Т-клеточную реакцию иммунного ответа при участии Th1 и Th2 лимфоцитов. Установлены корреляционные связи между психической и иммунной системами подтверждают сопряженное функционирование этих систем.

Возможно, наблюдаемые нами явления несут черты видимого функционального параллелизма – свидетельство существования единого механизма реакций на неблагоприятное воздействие, в котором заложен глубокий биологический смысл. В процессе эволюции выработался единый механизм, который не адаптируется сам, но создаёт основу (метаболическую, функциональную, структурную) для самых разнообразных адаптаций. При этом психической, иммунной и эндокринной системам отводится основная роль по обеспечению выживания и развития организма как в ближайшей, так и отдаленной перспективе. И не смотря на то, что эти системы изолированы (автономны) по отношению друг к другу, они все же работают синхронно и влияют друг на друга как единый «структурно-информационный образ».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Доценко Е. В., Фишер Т. А. Психосоматические реакции мышей на введение микроорганизмов / Е. В. Доценко, Т. А. Фишер // Вест. Тюм. Гос. Универ.– 2010.– Т. 5 – С. 120-128.
2. Суховей Ю. Г., Доценко Е. Л. Имманентность и изоморфность психики и иммунной системы / Ю. Г. Суховей, Е. Л. Доценко // Вест. Урал.мед. академ. науки.– 2012.– Т. 4 – С. 62-63.
3. Capuron L., Miller A., Irwin M. R. Psychoheuroimmunology of depressive disorder: Mechanisms and elinical implications / L. Capuron, A. Miller, M. R. Irwin // Psychoheuroimmunolog.– 2007.– V.1 – P. 509-530.
4. Kudryavtseva, N. N. Perspectives on the Psychology of Aggression. Psychopathology of repeated aggression: a neurobiological aspect / J. P. Morgan, (ed.).– NOVA Science Publishers, Inc., 2006.
5. Psycho-immune Partnership in the Dynamic Responses of Living System / Yu.G. Suhovey, A. V. Koptyug, S. A. Petrov et al. // International Journal of Life Science and Medical Research.– 2014.– V. 4 – P. 57-70.

PAIRIMG RESPONSE PSYCHE, IMMUNE AND ENDOCRINE SYSTEMS IN THE FORMATION OF TIME COLLECTIVE

Petrov S. A.[1], Fisher T. A.[1], Fisher I. V.[2]

[1]The Tyumen Centre of Sciences, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences;
[2]The Tyumen institute of improvement of professional skill of employees of the Ministry of Internal Affairs of Russia, Tyumen, Russia

We consider the physiological mechanisms of adaptation law enforcement Ministry of Internal Affairs of Russia to the passage of the training. We give a rationale that the search for new methodological approaches to the study of adaptive mechanisms to adverse effects may be considered from the point of view of functional isomorphism of psyche and the immune system in close cooperation with the endocrine system. Studied the stress influence in the context of the specific stages of the immune response. It was found that conjugation of regulatory systems is the single mechanism to respond to life-support system.

Keywords: stress stages, mentality, stages of the immune answer.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ РЕАБИЛИТАЦИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ОТДЕЛА ЭРИТРОНА У ЖЕНЩИН ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА В ДИНАМИКЕ ПОСТИММОБИЛИЗАЦИОННОГО ПЕРИОДА ПОСЛЕ ТРАВМЫ ВЕРХНЕЙ КОНЕЧНОСТИ

Черток Н. В.[1], Мамылина Н. В.[2]

[1]МБУЗГКП № 5; [2]Челябинский государственный педагогический университет, Челябинск, Россия

В статье представлены результаты исследования показателей периферического отдела эритрона в крови женщин зрелого возраста, перенесших травму верхней конечности, в динамике постиммобилизационного периода. У женщин исследованных групп в течение недели реабилитационных мероприятий наблюдались выраженные количественные и качественные изменения в периферическом отделе системы крови, являющиеся реакцией на острый стресс, сопровождаемый гипоксией и приводящий к рекрутированию костномозговых ретикулоцитов и эритроцитов в периферическую кровь. Показано, что занятия по методике ауторелаксирующих упражнений оказывают более быстрый реабилитационный эффект на организм женщин зрелого возраста, перенесших травму верхней конечности, по сравнению с традиционным комплексом лечебной физической культуры.

Ключевые слова: эритрон, эритроциты, ретикулоциты.

Актуальность. В системе крови при действии экстремальных факторов развивается комплекс изменений, характерных для стресса, имеющих значительную роль в процессе развития краткосрочной и долговременной адаптации [1, 2, 4]. При травме верхней конечности в организме женщин зрелого возраста формируется повышенная потребность в самообновлении клеток крови. Изучений влияния травм верхней конечности у женщин зрелого возраста в динамике восстановительного периода на показатели периферического отдела эритрона крайне мало, что доказывает актуальность настоящего исследования.

Цель. Оценить эффекты разных реабилитационных (не консервативных) мероприятий,

сопровождающихся острым эмоционально-болевым стрессом, на параметры периферического отдела эритрона у женщин зрелого возраста, перенесших травму верхней конечности.

Организация и методы исследования. Исследование было проведено на базе муниципального бюджетного учреждения здравоохранения «Городская клиническая поликлиника № 5» г. Челябинска. В исследовании принимали участие 52 женщины в возрасте 55-65 лет, которые находились в периоде постиммобилизации с диагнозом перелом дистального метаэпифиза лучевой кости. Из данной категории исследуемых методом случайной выборки было сформировано две группы (основная и контрольная) по 26 человек в каждой. Женщины контрольной группы восстанавливали подвижность травмированной конечности по классической методике лечебной физической культуры (ЛФК), основной группы – по методике реабилитации, сочетающей в себе пост-изометрическую миорелаксацию и специальные дыхательные упражнения в теплой воде [3]. Для определения числа эритроцитов периферической крови использовали пробирочный метод, в камере Горяева. Ретикулоциты считали в препаратах крови, окрашенных суправитально бриллиант-крезиловым синим. Исследования проводили с помощью микроскопа «Микмед-5».

Основные результаты. Количество эритроцитов в периферической крови у женщин обеих групп при фоновом исследовании находилось на уровне нижней границы нормы. Через 3, 7 и 14 суток постиммобилизационного периода у женщин основной группы количество эритроцитов в периферической крови было на 16,0 % ($p<0,05$), 11,1 % ($p<0,05$), 4,0 % соответственно выше фоновых значений, у женщин контрольной группы этот показатель превышал фоновый уровень на 17,0 % ($p<0,05$), 22,8 % ($p<0,05$), 13,9 % ($p<0,05$). Через 7 и 14 суток восстановительного периода у женщин основной группы количество эритроцитов в периферической крови было соответственно на 12,2 % ($p<0,05$) и 11,3 % ($p<0,05$) ниже, чем у женщин контрольной группы, что указывает на более ускоренное восстановление организма женщин основной группы.

Число ретикулоцитов в периферической крови у женщин обеих групп при фоновом исследовании находилось на уровне верхней границы нормы, что являлось защитно-компенсаторной реакцией организма в целом, и системы крови в частности на гипоксию, сопровождающую иммобилизацию верхней конечности после травмы на фоне малоподвижного образа жизни.

Через 3, 7 и 14 суток постиммобилизационного периода у женщин основной группы число ретикулоцитов в периферической крови было соответственно на 35,2 % ($p<0,05$), 15,2 % ($p<0,05$), 7,8 % ($p<0,05$) выше фоновых значений, у женщин контрольной группы этот показатель превышал фоновый уровень на 33,9 % ($p<0,05$), 36,4 % ($p<0,05$) и 18,2 % ($p<0,05$). Изменения периферического отдела эритрона у женщин, перенесших травму верхней конечности, в первую неделю реабилитационных мероприятий являлись реакцией на острый стресс, сопровождаемый гипоксией и приводящий к рекрутированию костномозговых ретикулоцитов и эритроцитов в периферическую кровь. Через 7 и 14 суток постиммобилизационного периода у женщин основной группы число ретикулоцитов в периферической крови было на 12,7 % ($p<0,05$) и 5,6 % ($p<0,05$) ниже, чем у женщин контрольной группы, что указывает на более ускоренное и эффективное перераспределение клеток в системе центрального и периферического отделов эритрона в ответ на снижающиеся стрессовые воздействия в течение данного периода в организме женщин основной группы.

Эмоциональные стрессовые воздействия у женщин в динамике постиммобилизационного периода, особенно в первые трое суток, вызывают количественные и качественные изменения в периферическом отделе системы крови. Поэтому изучение функционирования кроветворной ткани у данной категории женщин с изучаемой нозологией способствует выяснению адаптационно-компенсаторных возможностей организма в целом. Занятия по методике ауторелаксирующих упражнений оказывают более быстрый реабилитационный эффект на организм женщин. Эффект от комплекса ЛФК более пролонгирован по времени и дольше сохраняет эмоциональный след от болевых ощущений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горизонтов П. Д. Стресс и система крови / П. Д. Горизонтов, О. И. Белоусова, М. И. Федотова.– М.: Медицина, 1983.– 238 с.
2. Захаров Ю. М. Роль обратных связей в регуляции эритропоэза / Ю. М. Захаров // Рос.физиол. журн. им. И. М. Сеченова.– 2006.– Т. 92.– № 9.– С. 1033-1043.

3. Мамылина Н. В., Черток Н. В., Белоусова Н. А. Влияние комплекса ауторелаксирующих упражнений (КАУ) на функциональные показатели подвижности лучезапястного сустава у женщин, перенесших травму верхней конечности / Н. В. Мамылина, Н. В. Черток, Н. А. Белоусова // Научно-теоретический журнал Ученые записки университета имени П. Ф. Лесгафта. – 2014. – Т. 115. – № 9. – С. 87-91.
4. Юшков Б. Г. Система крови и адаптация организма к экстремальным воздействиям / Б. Г. Юшков // Вестник РАМН. – 2006. – № 3. – С. 3-5.

EFFECT OF DIFFERENT METHODS OF REHABILITATION TO THE PERIPHERAL ERYTHRON INDICATORS IN DYNAMIC OF POSTIMMOBILIZATION PERIOD AFTER UPPER LIMBS INJURY IN ADULT WOMEN

Chertok N. V.[1], Mamylina N. V.[2]

[1]MBHCI № 5 (city polyclinic); [2]Chelyabinsk State Pedagogical University, Chelyabinsk, Russia

The article presents the results of research of peripheral blood erythrone indicators in adult women who have had the upper limb injury, in dynamic of post-immobilization period. We observed marked quantitative and qualitative changes in the peripheral part of the blood system as a response to acute stress, followed by hypoxia and leading to the recruitment of bone marrow reticulocytes and red blood cells to the peripheral blood in women of studied groups during the week period of rehabilitation exercises. It is shown that the method of auto relaxing exercises has a more rapid rehabilitation effect on adult women`s health after an upper limb injury, in comparison with a traditional complex of medical physical therapy.

Keywords: erythron, red blood cells, reticulocytes.

ВЛИЯНИЕ ФИНГОЛИМОДА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Уракова М. А., Брындина И. Г.

ГБОУ ВПО «Ижевская медицинская академия» МЗ РФ, Ижевск, Россия

В работе проведено исследование клеточного состава бронхо-альвеолярных смывов (БАС) и функциональной активности альвеолярных макрофагов при перевязке общих сонных артерий у крыс в сочетании с внутрибрюшинным введением финголимода. Функциональную активность клеток оценивали путем подсчета фагоцитарного индекса (ФИ), фагоцитарного числа (ФЧ) и индекса завершенности фагоцитоза (ИЗФ). Установлено, что ишемия головного мозга сопровождается изменением клеточного состава БАС и снижением функциональной активности альвеолярных макрофагов. Дополнительное введение финголимода вызывает уменьшение количества лимфоцитов в БАС. При этом, уменьшение ФИ, ФЧ, выявленное при ишемии мозга, сохраняется; ИЗФ альвеолярных макрофагов восстанавливается.

Ключевые слова: альвеолярные макрофаги, ишемия мозга, финголимод.

В настоящее время сосудистая патология головного мозга является одной из ведущих причин летальности и инвалидизации трудоспособного населения России. В ряду ослож-

нений цереброваскулярных заболеваний особое место занимают поражения органов дыхательной системы, имеющих высокую частоту встречаемости и включающих нарушения как респираторных, так и нереспираторных функций легких. Так, выявлено изменение сурфактантной системы и неспецифической иммунной резистентности легких при моделировании сосудистой патологии головного мозга [1,2]. Установлено участие капсаицинчувствительных афферентов блуждающего нерва в реализации постинсультных осложнений [3,4]. В настоящее время, особый интерес вызывают сфинголипидные механизмы, участвующие в проявлении многочисленных физиологических и патофизиологических процессов, включая клеточную гибель и выживание. Большое место в исследованиях последних лет, посвященных сфинголипидным рецепторам, занимает структурный аналог сфингозин-1-фосфата – финголимод (FTY720). Обнаружено протекторное влияние сфингозин-1-фосфата на ряд клеточных функций (усиление пролиферативных процессов, угнетение апоптоза), доказаны иммуномоделирующие эффекты финголимода [5].

Целью исследования стало изучение влияния финголимода на функциональную активность альвеолярных макрофагов при ишемии головного мозга у крыс.

Экспериментальное исследование проведено на 26 крысах-самцах массой 180-250 г. Эксперимент проводился с соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по уходу за подопытными животными. Ишемию головного мозга у животных первой группы воспроизводили посредством двусторонней перевязки общих сонных артерий (n=8); группой сравнения служили ложнооперированные животные (n=8), у которых выделяли общие сонные артерии без их последующей перевязки (контроль). Животным третьей группы после перевязки общих сонных артерий однократно внутрибрюшинно вводили финголимод 0,1 мг/кг массы тела (n=10). Спустя 3 суток у всех крыс путем лаважа получали бронхо-альвеолярные смывы (БАС). Из клеточной взвеси, полученной после центрифугирования БАС, готовили мазки методом окраски по Романовскому-Гимзе, в которых определяли эндопульмональную цитограмму. Для оценки поглотительной активности альвеолярных макрофагов подчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) – процент фагоцитирующих клеток, и фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число объектов фагоцитоза (дрожжей), поглощенное одной клеткой спустя 30 и 60 минут инкубации. При сопоставлении ФЧ после 30-минутной и 120-минутной инкубации подчитывали индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ). Обработка статистических данных выполнена на основе пакета “MicrosoftExcel 2007” и “SPSS” forWindows. Достоверность отличий изучаемых параметров между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия выборок считали статистически достоверными при уровне значимости $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. В ходе исследований было выявлено, что ишемия головного мозга сопровождалась изменением клеточного состава БАС. Происходило уменьшение лимфоцитов на 32 % и увеличение альвеолярных макрофагов на 22 % по сравнению с контролем ($p<0,05$). Ишемия в условиях введения финголимода вызывала ещё более выраженное уменьшение лимфоцитов: количество было на 22 % меньше, чем у крыс без дополнительного воздействия ($p<0,05$). При этом финголимод на оказывал существенного влияния на содержание альвеолярных макрофагов ($p>0,05$). Являясь пропрепаратом, в естественных условиях финголимод фосфорилируется сфингокиназой-2 доFTY720-фосфата (структурного аналога сфингозин –1-фосфата), который взаимодействует с четырьмя из пяти видов сфингозин-1-фосфатных рецепторов [5]. Механизм действия финголимода через сфингозин-1-фосфатные рецепторы 1 типа включает блокаду выхода лимфоцитов из лимфоидных тканей [5], что согласуется с наблюдаемым уменьшением лимфоцитов в БАС в наших исследованиях при введении данного препарата.

Широкое представительство толл-подобных рецепторов на альвеолярных макрофагах, а также сильный бактерицидный и фагоцитарный потенциал этих клеток позволяет их отнести к “первой линии” защиты легких. Поглотительная активность макрофагов в условиях ишемии мозга характеризовалась снижением ФИ на 34 и 43 % спустя 30 и 120 минут инкубации по сравнению с контролем ($p<0,05$). Наряду с этим, уменьшалось среднее число объектов фагоцитоза на 12 и 47 %, поглощенное клеткой в течение 30 и 120 минут,

а также снижался ИЗФ на 40 % ($p<0,05$). Введение финголимода не вызывало изменений ФИ и ФЧ, выявленных при ишемии мозга без дополнительного воздействия ($p>0,05$). Однако ИЗФ при воздействии фиголимода был выше, чем при ишемии ($p<0,05$) и не отличался от контрольных значений ($p>0,05$).

Наши результаты показали, что введение финголимода после ишемии мозга изменяет клеточный состав БАС в сторону уменьшения лимфоцитов. При этом сохраняется, вызванное ишемией снижение поглотительной активности альвеолярных макрофагов, однако, частично восстанавливается их обезвреживающая активность в отношении поглощенных объектов.

Таким образом, наряду с системным иммуномоделирующим действием, финголимод может оказывать влияние на органные механизмы иммунной резистентности, в том числе при патологических процессах, связанных с дисрегуляцией этих процессов в условиях ишемии мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уракова М. А., Брындина И. Г. Сурфактант и водный баланс легких при экспериментальном внутримозговом кровоизлиянии и ишемии головного мозга / М. А. Уракова, И. Г. Брындина // Вестн. Уральской мед.акад. науки.– 2014.– Т. 48, № 2.– С. 187-189.
2. Уракова М. А., Брындина И. Г. Изменение коагуляционной активности легких при внутрижелудочковом кровоизлиянии и ишемии головного мозга / М. А. Уракова, И. Г. Брындина // Гематология и трансфузиология.– 2014.– Т. 59. № 1.– С. 125.
3. Уракова М. А., Брындина И. Г. Сурфактант и водный баланс легких при внутримозговом кровоизлиянии в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва / М. А. Уракова, И. Г. Брындина // Росс.физиол. журн. им. Сеченова.– 2015.– Т. 101, № 3.– С. 308-315.
4. Уракова М. А., Брындина И. Г. Влияние капсаициновой блокады блуждающего нерва на активность альвеолярных макрофагов при ишемии мозга / М. А. Уракова, И. Г. Брындина // Росс.иммунол. журн.– 2015.– Т. 9, № 2.– С. 333-335.
5. Chi H. Sphingosine 1-phosphate and immune regulation: trafficking and beyond / H. Chi // Trends. Pharmacol.Sci.– 2011.– № 32(1).– P. 16-24.

THE INFLUENCE OF FINGOLIMOD ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF ALVEOLAR MACROPHAGES DURING CEREBRAL ISCHEMIA IN EXPERIMENT

Urakova M. A., Bryndina I. G.

Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia

In the present work conducted in rats the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and functional activity of alveolar macrophages were explored in cerebral ischemia combined with intraperitoneal fingolimod administration. Functional activity of alveolar macrophages was estimated by the counting of phagocytic index (PI), phagocytic number (PN) and phagocytosis completion index (PCI). It is revealed that cerebral ischemia is accompanied by the change of cellular composition in BAL and decreased phagocytic activity of alveolar macrophages. Fingolimod administration causes the additional decrease of lymphocytes number in BAL. Simultaneously, PI and PN decline detected in cerebral ischemia retains after fingolimod administration whereas PCI of alveolar macrophages restores to normal.

Keywords: alveolar macrophages, cerebral ischemia, fingolimod.

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РИСКА РАЗВИТИЯ КОГНИТИВНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПОЖИЛЫХ ЛЮДЕЙ

Филиппова Ю. Ю., Тимофеева А. В., Степанова Т. Ю., Бурмистрова А. Л.

ФГБОУ ВПО Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

Определена структура и композиция микробиоты тонкого кишечника, а также уровень интерлейкина-6 в плазме крови людей пожилого возраста с разным психофизическим статусом. На основе комплекса показателей значимых микроорганизмов тонкого кишечника: *Bacillus cereus*, *Propionibacterium jensenii*, *Fusobacterium spp*, и *Moraxella spp*. и IL-6 периферической крови создана математическая модель риска развития когнитивной несостоятельности у пожилых людей.

Ключевые слова: интерлейкин-6, микробиота тонкого кишечника, когнитивная недостаточность, пожилые люди.

В настоящее время функции и физиологическая структура мозга все чаще рассматриваются в свете реципрокных взаимоотношений с кишечником и иммунной системой. Микробиота кишечника, эндокринная, иммунная, автономная нервная и кишечная нервная системы, формируют ось «микробиота-кишечник-мозг» [1]. Показано, что кишечная микробиота может влиять на поведение, модулировать пластичность мозга и когнитивные функции в процессе старения [2].

Цель. Определить прогностические маркеры риска развития когнитивной недостаточности у людей пожилого возраста по уровню интерлейкина-6 и показателеям микробиоты тонкого кишечника.

Материалы и методы. Было обследовано 42 человека пожилого возраста, проживающих в «Челябинском геронтологическом центре». Средний возраст обследованных составил 79 ± 5 лет. Психофизический статус пожилых людей определяли в ходе мониторинга их физического и когнитивного состояния с помощью индекса Бартела (Barthel Index of Activities of Daily Living, 1993) и в соответствии с классификацией стадий дисциркуляторной энцефалопатии Н. Н. Яхно с соавт. (2003). По результатам оценки психофизического статуса все обследованные были разделены на 2 группы: 20 человек с умеренными когнитивными расстройствами и незначительными физическими нарушениями – группа «активное долголетие» и 22 человека, с выраженной когнитивной недостаточностью, проявляющейся сосудистой деменцией, и физической несостоятельностью – группа «милосердие».

Пожилые люди всех групп имели одинаковые возраст-ассоциированные заболевания: кардиоваскулярные, бронхолегочные, заболевания желудочно-кишечного тракта и опорно-двигательного аппарата. При этом из исследования были исключены индивидуумы с ожирением, онкологическими заболеваниями, болезнью Паркинсона и Альцгеймера, врожденными нарушениями центральной нервной системы. Уровень интерлейкина-6 (IL-6) (ЗАО «Вектор Бест», Новосибирск) определяли в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для изучения структуры и композиции микробиоты тонкого кишечника был использован метод газового хромато-масс-спектрометрического определения микроорганизмов по количественному содержанию специфических маркеров (карбоновые кислоты, альдегиды, стерины, стеролы) в периферической крови. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали критерий Краскела-Уоллиса

с апостериорными парными сравнениями по Коноверу-Инману. Различия считали статистически значимыми при p≤0,001. Для прогнозирования риска развития выраженной когнитивной недостаточности у пожилых людей использовали аппарат множественной логистической регрессии.

Результаты. На первом этапе работы мы провели сравнительный анализ уровня IL-6 в плазме крови, а также структуры и композиции микробиоты тонкого кишечника у людей пожилого возраста с различным психофизическим статусом. Обнаружено, что у пожилых людей с выраженными нарушениями психофизического статуса (группа «милосердие») наблюдается статистически значимое повышение концентрации IL-6 в плазме крови, по сравнению с индивидуумами с умеренными изменениями когнитивного и физического состояний (группа «активное долголетие»). Наши данные согласуются с данными RavagliaG. с коллегами, о том, что высокие системные уровни IL-6 являются сильным предиктором развития сердечно-сосудистых заболеваний, сосудистой деменции и смертности у людей пожилого возраста [3]. Изучение структуры микробиоты тонкого кишечника на основе определения специфических липидных маркеров микроорганизмов в периферической крови показало, что структура сообщества бактерий была одинакова в группах пожилых людей с разным психофизическим статусом, в ней преобладали бактерии типов *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Значимые различия наблюдались только в количественном составе некоторых родов и видов микроорганизмов: в тонком кишечнике пожилых людей группы «милосердие» было статистически значимо снижено количество *Bacillus cereu*s, *Propionibacterium jensenii*, *Fusobacterium spp.*, и *Moraxella spp*. по сравнению с аналогичными показателями индивидуумов группы «активное долголетие».

На втором этапе работы нами была предпринята попытка сформировать на основе статистически значимых показателей комплекс прогностических оценочных маркеров развития когнитивной несостоятельности у людей пожилого возраста с использованием логистического регрессионного анализа. По результатам регрессионного анализа была получена высоко статистически значимая (p<0,0001) и высоко диагностически эффективная (90,48 %; чувствительность – 85,0 %, специфичность – 95,45 %) математическая модель риска развития когнитивной недостаточности у людей пожилого возраста:

$$Логит(P) = -0{,}461 + 0{,}619X_1 - 0{,}027X_2 - 0{,}031X_3 - 0{,}359X_4 - 0{,}827X_5$$

где X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 – концентрация IL-6, *Bacillus cereus*, *Propionibacterium jensenii*, *Fusobacterium spp.*, и *Moraxella spp*. в крови конкретного обследуемого лица.

Получив значение Логит(P), можно вычислить значение вероятности отнесения пожилого человека к группе риска развития когнитивной недостаточности (P) по формуле:

$$P = \left(\frac{1}{1 + e^{-Логит(P)}} \right)$$

где e – математическая константа = 2,718281828

Если P<0,5 человека следует причислить к группе 0 (отсутствие риска развития осложнений), если P>0,5 – к группе 1 (наличие риска развития когнитивной недостаточности).

Выводы. Таким образом, на основе математической модели множественной логистической регрессии, включающей комплекс показателей четырех значимых видов/родов микроорганизмов тонкого кишечника: *Bacillus cereus*, *Propionibacterium jensenii*, *Fusobacterium spp.*, и *Moraxella spp.* и уровню IL-6 в периферической крови можно дать персонифицированный прогноз риска развития когнитивной несостоятельности у пожилых людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collins S. M., Surette M., Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain / S. M. Collins, M. Surette, P. Bercik // Natre Review Microbiology.– 2012.– V. 10.– P. 735-742.
2. Leung K., Thuret S. Gut Microbiota: A Modulator of Brain Plasticity and Cognitive Function in Ageing / K. Leung, S. Thuret // Healthcare.– 2015.– V. 3.– P. 898-916.
3. Ravaglia G., Forti P., Maioliatal F. Blood inflammatory markers and risk of dementia: The Conselice Study of Brain Aging / G. Ravaglia, P. Forti, F. Maioliatal // Neurobiology of Aging.– 2007.– V. 28.– P. 1810-1820.

PROGNOSTIC MARKERS OF INDIVIDUAL RISK OF COGNITIVE IMPAIRMENT IN THE ELDERLY

Filippova Yu.Yu., Timofeeva A. V., Stepanova T. Yu., Burmistrova A. L.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

The structure and composition of the microbiota of the small intestine, as well as the level of interleukin-6 in the blood plasma of elderly people with different psychophysical status were determined. A mathematical model of the risk of cognitive failure in the elderly was created, which was based on the complex of statistically significant indicators of the intestinal microorganisms: *Bacillus cereus*, *Propionibacterium jensenii*, *Fusobacterium spp*, *Moraxella spp*. and IL-6 in peripheral blood.

Keywords: interleukin-6, intestinal microbiota, cognitive impairment, elderly.

ИММУНОАНАЛИЗ АНТИТЕЛ К ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Поленок Е. Г.[1], Глушков А. Н.[1,2], Антонов А. В.[3]

[1]ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Сибирского отделения РАН»; [2]ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет»; [3]ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», Кемерово, Россия

Исследовали антитела (АТ) к эстрадиолу (Эс) и прогестерону (Пг) у женщин больных раком молочной железы (РМЖ) и здоровых доноров. Установили, что у больных РМЖ средний уровень IgA и IgG АТ к Эс и Пг в 1,2-1,7 раз выше, чем у здоровых женщин. Одновременное присутствие низких уровней IgA АТ к Эс и Пг (<2) и повышенных уровней IgG АТ к этим гормонам (>4) ассоциировано с высоким риском возникновения РМЖ (OR=11,3, 95 %CI 2,5-50,4).

Ключевые слова: рак молочной железы, антитела, эстрадиол, прогестерон.

Рак молочной железы (РМЖ) является ведущей онкологической патологией у женщин как в России, так и в других странах. В связи с повсеместным ростом заболеваемости РМЖ проблема профилактики и ранней диагностики патологии молочной железы остается весьма актуальной. Особое значение приобретает поиск новых лабораторных методов, в том числе и иммунологических, для ранней диагностики РМЖ.

Известно, что важную роль в процессе пролиферации и метастазирования РМЖ имеют стероидные гормоны [1]. Однако роль иммунной системы в регуляции гормонального гомеостаза при злокачественных опухолях молочной железы изучена недостаточно. В ряде работ [2, 3] авторы указывают на взаимосвязь иммунного ответа на низкомолекулярные канцерогены экзо- и эндогенного происхождения с патологией молочной железы.

Цель настоящей работы – изучить особенности иммунного ответа на стероидные гормоны, эстрадиол (Эс) и прогестерон (Пг), у больных раком молочной железы.

Материалы и методы. В обследовании приняли участие 459 женщин в постменопаузе. В исследуемую группу были включены 300 женщин с диагнозом инфильтрующая карцинома молочной железы, которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РМЖ в каждом случае был подтвержден морфологически. Средний возраст больных РМЖ составил 62,2±7,5 лет. В группу сравнения

были включены 159 здоровых женщин без патологии молочной железы (средний возраст – 59,0±6 лет). Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 2000 г. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Исследование IgA и IgG антител (АТ) к Эс и Пг проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа [4]. Уровни АТ к Эс и Пг выражали в относительных единицах и вычисляли по отношению связывания АТ с конъгатом гаптен-бычий сывороточный альбумин БСА (за вычетом фонового связывания с БСА) к БСА.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Ненормальный характер распределения показателей выявили с помощью критерия Шапиро-Уилка, различия между группами определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни при уровне значимости $p<0,05$ и непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность вариации. Риски возникновения РМЖ оценивали на основании показателя отношения шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости. Для выявления пороговых значений уровней АТ (cut-off) был проведен ROC-анализ [5].

Основные результаты. При исследовании иммунных реакций на стероидные гормоны было установлено, что у больных РМЖ средний уровень АТ к Эс и Пг в 1,2-1,7 раз значимо выше чем у здоровых женщин (медианы: IgA-Эс 2,7 против 1,8, p=0,0004; IgG-Эс 5,3 против 3,2, p=0,0001; IgG-Пг 3,4 против 2,9, p=0,0005 соответственно). С помощью ROC-анализа были определены значения cut-off для АТ к стероидным гормонам: IgA-Эс=2, IgA-Пг=2, IgG-Эс=4, IgG-Пг=4. Обнаружили, что повышенные уровни IgG-Эс>4 и IgG-Пг>4 чаще встречались у больных РМЖ в отличие от здоровых доноров (IgG-Эс 62,3% против 29,6%, χ^2=43,4, df=1, p=0,0005; IgG-Пг 43,7% против 22,0%, χ^2=20,2, df=1, p=0,0005). При этом риск возникновения рака возрастает в 2,7-3,9 раз (для IgG-Эс OR=3,9, 95%CI 2,6-5,9; для IgG-Пг OR=2,7, 95%CI 1,8-4,3). Одновременное присутствие повышенных уровней IgG-АТ к Эс и Пг увеличивало риск возникновения РМЖ в 6,5 раз (OR=6,5, 95%CI 3,6-11,6). Повышенные уровни АТ класса А к Эс и Пг также чаще выявлялись у больных РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами, но статистически значимо исследуемые группы отличались только по IgA-Эс (61,7% против 44,7, χ^2=11,5, df=1, p=0,002). Величина OR составила 1,99 (95%CI 1,4-2,9). Анализ комбинаций АТ разных классов и к разным стероидным гормонам показал следующее. Низкий уровень АТ к Эс и Пг обоих классов (IgA-Эс<2, IgA-Пг<2, IgG-Эс<4, IgG-Пг<4) не ассоциирован с риском возникновения РМЖ (OR=0,5, 95%CI 0,3-0,7; χ^2=9,6, df=1, p=0,003). Повышенные уровни АТ к Эс и Пг обоих классов (IgA-Эс>2, IgA-Пг>2, IgG-Эс>4, IgG-Пг>4) чаще встречались у больных РМЖ в отличие от здоровых женщин (27,7% против 6,3% соответственно, χ^2=30,4, df=1, p=0,0005). Риск возникновения патологии возрастает значительно (OR=7,8, 95%CI 3,6-16,8) по сравнению с оценкой АТ к этим гормонам по отдельности. Однако максимальный риск возникновения РМЖ (OR=11,3, 95%CI 2,5-50,4) ассоциирован с наличием одновременно низких уровней АТ к Эс и Пг класса А (<2) и повышенных уровней IgG АТ к гормонам (>4). Такая комбинация АТ чаще встречалась у женщин больных РМЖ, чем у здоровых (8,0% против 1,3% соответственно, χ^2=12,6, df=1, p=0,001).

Выводы. У больных РМЖ средний уровень IgA и IgG антител к Эс и Пг в 1,2-1,7 раз выше, чем у здоровых женщин. Одновременное присутствие низких уровней IgA АТ к Эс и Пг (<2) и повышенных уровней IgG АТ к этим гормонам (>4) ассоциировано с высоким риском возникновения РМЖ (OR=11,3, 95%CI 2,5-50,4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition / R. Kaaks, S. Rinaldi, T. J. Key et al. // Endocr. Relat. Cancer.– 2005.– V. 12, № 4.– P. 1071-1082.
2. Антитела к ксено- и эндобиотикам у больных раком молочной железы / Т. П. Аносова, Е. Г. Поленок, М. П. Аносов и др. // Известия Самарского научного центра РАН.– 2012.– № 5(2).– С. 440-443.
3. Chagnaud J. L. Identification and immunochemical characterization of IgA in sera of patients with mammary tumors / J. L. Chagnaud, S. Faiderbe, M. Geffard // Int. J. Cancer.– 1992.– V. 50.– P. 395-401.
4. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные аберрации в лимфоцитах перифери-

ческой крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия / А. Н. Глушков, Е. Г. Поленок, Т. П. Аносова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2011.– Т. 5(14), № 1.– С. 39-44.

5. Greiner M., Pfeiffer D., Smith R. D. Principles and practical application of the receiver operating characteristic analysis for diagnostic test / M. Greiner, D. Pfeiffer, R. D. Smith // Prev. Vet. Med.– 2000.– V. 45.– P. 23-41.

IMMUNOASSAY OF ANTIBODIES TO ESTRADIOL AND PROGESTERONE IN BREAST CANCER PATIENTS

Polenok E. G.[1], Glushkov A. N.[1,2], Antonov A. V.[3]

[1]Federal Research Center of Coal and Coal Industry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, ; [2]Kemerovo State University; [3]Regional clinical oncology hospital, Kemerovo, Russia

The antibodies (Abs) to estradiol (Es) and progesterone (Pg) were investigated in breast cancer patients (BCP) and healthy donors. It is found the average levels of IgA and IgG Abs to the Es and Pg in 1.2-1.7 times higher in BCP than in healthy women. The simultaneous presence of low levels of IgA Abs to Es and Pg (<2) and high levels of IgG antibodies to these hormones (> 4) is associated with a high risk of breast cancer (OR = 11,3, 95 % CI 2,5-50,4).

Keywords: breast cancer, antibodies, estradiol, progesterone.

АДАПТИВНЫЕ ИММУНО-ГОРМОНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ У МУЖЧИН В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ И ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ СЕВЕРА

Некрасова М. В., Шашкова Е. Ю., Поповская Е. В.

ФАНО России Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики Российской академии наук, Архангельск, Россия

В работе представлены результаты иммуно-гормонального обследования работников гидрографической службы г. Архангельска. У 92 % лиц, работающих на маяках длинновахтовым методом, выявлена низкая активность апоптоза на фоне повышенных уровней лимфопролиферации и общего тестостерона, что косвенно свидетельствует о сокращении резервных возможностей иммунного гомеостаза. У мужчин – гигрографов, работающих коротковахтовым методом, иммунно-гормональные дисбалансы выявлены в 2 % случаев.

Ключевые слова: иммунно-гормональные реакции, Север, тестостерон, лимфопролиферация.

Актуальность. Гидрографическая служба г. Архангельска играет ведущую роль в обеспечении круглогодичной навигации в высоких широтах и по Северному морскому пути [4]. Как правило, сотрудниками гидрографической службы являются мужчины трудоспособного возраста, которые выполняют гидрографические работы по побережью Белого и Баренцева морей, совершая в течение навигационного периода кратковременные рейсы в среднем по 16 дней (короткая вахта), а часть работают в условиях социальной изоляции на маяках, расположенных по побережью указанных морей Арктического бассейна. Климатические условия морей Арктического бассейна характеризуются усиленной циклонической активностью при низких среднегодовых температурах, влиянием электромагнитного излучения, длительным световым голоданием[1, 3, 5]. Известно, что на Севере состояние иммунной

системы характеризуется наличием разнообразных дисбалансов[3, 5]. В настоящее время Север и Арктика – важнейшие стратегические регионы с точки зрения освоения природных ресурсов [6], которое невозможно без участия человека.

Цель. Выявить соотношение фенотипов лимфоцитов периферической крови и общего тестостерона у мужчин в экстремальных климатических и профессиональных условиях Севера.

Методы. Проведено иммунологическое обследование 68 мужчин в возрасте 21-65 лет 1-2 групп здоровья (по заключению профессиональной медицинской комиссии на базе 1-го филиала ФГУ «1469 ВМКГ СФ»), работающих в гидрографической службе г. Архангельска. Среди них работающих вахтовым методом 42 человека 22-56 лет, выполняющих работы на маяках 26 человек в возрасте 21-65 лет. Определяли содержание в периферической крови лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофиллов, нейтрофилов; оценивали фагоцитарную активность нейтрофиллов; лимфоцитов с рецепторами к CD 71$^+$, CD 95$^+$, CD 10$^+$, содержание общего тестостерона методом ИФА. Кровь для исследования брали из локтевой вены в объеме 6 мл, натощак. Все полученные результаты были статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ «MicrosoftExel 7.0» (США) и «Statistica 6.0» («StartSoft», США).

Представляло интерес изучить состояние иммунного фона по восьми иммунным показателям в соотношении с уровнями содержания общего тестостерона у мужчин трудоспособного возраста в экстремальных профессиональных и климатических условиях Севера в зависимости от вида выполняемых работ: вахтовый метод (2 недели) и служба на маяках (8 месяцев). Анализ показал, что в обеих обследованных группах количество лимфоцитов, моноцитов и эозинофиллов выявлено в общеизвестных физиологических пределах, соответственно в среднем: 2,64±0,24; 0,42±0,03; 0,19±0,02·10^9 кл/л у 84 % обследуемых независимо от вида службы. Общее количество нейтрофилов не велико (в среднем 3,51± 0,16·10^9 кл/л), при этом пониженное значения данного показателя встречаются в 7 % случаев не зависимо от выполняемой деятельности. Следует отметить, что процент активных фагоцитов у работников маячной службы значительно ниже, чем у гидрографов, работающих коротким вахтовым методом: 64,04± 2,07 и 67,48±1,42 %, соответственно. Важно отметить, что фагоцитарное число при этом составляет в среднем 6,75±0,25 не зависимо от вида выполняемых работ.

Зафиксировано снижение содержания клеток с рецепторами к трансферрину (CD 71$^+$) в обеих группах обследованных лиц у 58,33 % работников маячной службы и у 75 % гидрографов и составляет 0,47±0,03; 0,45±0,06·10^9 кл/л соответственно.

Содержание клеток, отражающих запрограммированную клеточную гибель – апоптоз (CD 95$^+$) входит в пределы общепринятой физиологической нормы 0,49±0,03·10^9 кл/л у работников, служащих на маяках и 0,46± 0,07·10^9 кл/л работников короткой вахты. При этом у 33,33 % мужчин-маячников и 67,50 % мужчин-гидрографов выявлен дефицит активности апотоза на фоне повышенного уровня лимфопролиферации (CD 10$^+$).

Изучая содержание общего тестостерона в обеих группах обследуемых лиц, выявили, что у 89 % работников маячной службы концентрация указанного гормона достоверно выше, чем у мужчин, совершающих кратковременные рейсы в Арктику – 18,23±5,52; 14,85±4,08 нмоль/л соответственно. Критически низкие уровни содержания общего тестостерона зафиксированы у 10 % «маячников» и 32 % мужчин-гидрографов.

Таким образом, у 92 % лиц, работающих на маяках длинновахтовым методом (восемь месяцев) выявлена низкая активность апоптоза на фоне повышенных уровней лимфопролиферации и общего тестостерона, что косвенно свидетельствует о сокращении резервных возможностей иммунного гомеостаза. У мужчин – гигрографов, работающих коротковахтовым методом (16 дней) иммунно-гормональные дисбалансы выявлены в 2 % случаев.

Работа поддержана грантами 09-С-4-1016 УрО РАН; № 12-У-4-1021 УрО РАН; № 12-4-5-025-АРКТИКА УрО РАН; № 15-3-4-46 УрО РАН; № 15-3-4-39 УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авцын А. П. Патология человека на Севере / А. П. Авцын, А. А. Жаворонков, А. Г. Марачев, А. П. Милован. – Москва: Медицина, 1985-416 с.
2. Гудков А. Б. Адаптивные реакции организма моряков рыбопромыслового флота / А. Б. Гудков,

Ф. А. Щербина, И. Л. Мызникова.– Архангельск: Изд-во Северного государственного медицинского университета, 2011.– 241 с.
3. Добродеева Л. К. Иммунологическая реактивность, состояние здоровья населения Архангельской области / Л. К. Добродеева, Л. П. Жилина.– Екатеринбург: УрО РАН, 2004-229 с.
4. Катенин В. А. Особенности научных исследований и гидрографических работ в высоких широтах подо льдом / В. А. Катенин // Арктика: экология и экономика.– 2013.– № 2(10).– С. 104-109.
5. Поскотинова Л. В. Оценка психоэмоционального состояния, гормонального фона и иммунологического статуса у лиц, работающих в условиях, приближенным к боевым. автореф. дис. … канд. биол. наук / Л. В. Поскотинова – Архангельск, 1998.– 18 с.
6. Татарин А.И., Захарчук Е.А., Логинов В.Г. Современная парадигма освоения и развития Арктической зоны Российской Федерации / А. И. Татарин, Е. А. Захарчук, В. Г. Логинов // Арктика: экология и экономика.– 2015.– № 2(18).– С. 4-13.

ADAPTIVE REACTION IMMUNO-GORMONALNYE AT MEN IN EXTREME CLIMATIC AND PROFESSIONAL CONDITIONS OF THE NORTH

Nekrasova M. V., Shashkov E. Yu., Popovskaya E. V.

Federal Agency of Scientific Organisation Federal Center for Integrated Arctic Research, Arkhangelsk, Russia

In work are presented results of immuno-hormonal inspection of employees of hydrographic service of Arkhangelsk. At 92 % of the persons working at beacons as long watch method low activity of apoptosis against the increased levels of a limfoproliferation and the general testosterone is revealed that indirectly demonstrates reduction of reserve opportunities of an immune homeostasis. At men – the gidrograf working with a short watch method immune and hormonal imbalances are revealed in 2 % of cases.

Keywords: immune and hormonal reactions, North, testosterone, limfoproliferation.

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СПЕКТР И АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ В РАННИЕ СРОКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ

Осиков М. В., Кишкин А. М.

НОЦ «Проблемы фундаментальной медицины» ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия

Цель работы – изучить влияние ЭПО на концентрацию CD 3$^+$ и CD 45RA$^+$ лимфоцитов в крови и оценить их апоптоз в ранние сроки экспериментальной ТТ. Исследование выполнено на 26 крысах, ТТ моделировали при контакте кожи с нагретым до 100 °С предметом, площадь ожога составила 4 %, глубина соответствовала IIIA степени. ЭПО вводили внутрибрюшинно в суммарной дозе 1000 МЕ/кг. Установлено, что во 2 сутки экспериментальной ТТ в крови понижается концентрация лимфоцитов преимущественно за счет CD 45RA$^+$. Применение ЭПО при ТТ приводит к повышению концентрации в крови CD 3$^+$ и CD 45RA$^+$ лимфоцитов и уменьшению их апоптоза на 2 сутки.

Ключевые слова: термическая травма, лимфоциты, апоптоз, эритропоэтин.

Введение. Термическая травма (ТТ) остается достаточно распространенным видом травм в России и мире. Несмотря на появление значительного количества новых методов лечения, большого количества публикаций и исследований, до сих пор остаются неизученными многие вопросы, касающиеся как местных процессов в ожоговой ране, так и системных

реакций организма, в частности иммунологических изменений. В последнее время внимание исследователей привлекает эритропоэтин (ЭПО), в особенности его плейотропные эффекты. На современном этапе полученные данные позволяют отнести ЭПО одновременно к цитокинам, факторам роста и гормонам. Ранее нами было продемонстрировано влияние эритропоэтина на показатели врожденного иммунитета в ранние сроки ТТ.

Целью данной работы являлось выявить влияние ЭПО на популяционный спектр и апоптоз лимфоцитов периферической крови на 2 сутки экспериментальной ТТ.

Материалы и методы. Работа выполнена на 26 белых нелинейных крысах массой 180-220 г. находящихся в стандартных условиях вивария на типовом рационе при свободном доступе к пище и воде при 12-14-часовом световом дне. Для создания модели ТТ использовали плоскодонный стеклянный стакан из химического стекла с диаметром дна 4 см, наполненный дистиллированной водой с температурой 100 °С, время контакта с кожей для моделирования ТТ IIIA степени составило 15 с. Площадь ожога составила 3,97 ± 0,14 %. ЭПО в составе препарата «Рекормон» (МНН: эпоэтин бэта, «Roche», Швейцария) вводился внутрибрюшинно, начиная с 1 суток, ежедневно в дозе 500 МЕ/кг массы в течение 2 дней, суммарная доза 1000 МЕ/кг. Контрольной группе животных с ТТ вводилось эквиобъемное количество стерильного физиологического раствора. Исследования проводили на 2 сутки. Определение популяционного спектра лимфоцитов периферической крови (CD 3$^+$, CD 45RA$^+$) осуществляли методом проточной цитометрии. Для оценки количества живых, апоптотических и некротических (или, так называемых, поздних апоптотических) клеток применяли флуоресцентный метод при двойном флуоресцентном окрашивании клеток Аннексином V-FITC и 7-AAD. Статистический анализ результатов проводился с помощью пакета программ «Statisticav 10.0 forWindows», проверка достоверности осуществлялась путем вычисления критериев Mann-Whitney, Wald-Wolfowitz и Kruskall – Wallis.

Результаты и обсуждение. Установлено, что при экспериментальной ТТ на 2 сутки по сравнению с интактными животными статистически значимо снижается количество CD 45RA$^+$ лимфоцитов (с 2,27*10^9/л до 0,57*10^9/л, p<0,05), в то время как количество CD 3$^+$ снижается на правах тенденции. Возрастает количество клеток в стадии «раннего апоптоза» (с 7,83 % до 15,6 %, p<0,05) и погибших клеток(с 0,2 % до 2,8 %, p<0,05).

Полагаем, что снижение количества CD 3$^+$ и CD 45RA$^+$ лимфоцитов в ранние сроки ТТ является проявлением ранее продемонстрированной нами лейкопении в 1-3 сутки ТТ, обусловленной в том числе и лимфоцитопенией [1], которая может быть связана как с выходом лимфоцитов в очаг повреждения (в меньшей степени, учитывая ранние сроки), так и с активацией их апоптоза [2]. Активация апоптоза может быть связана с изменением баланса цитокинов (в частности, повышением уровня ИЛ-1β и ИЛ-4), которые, по некоторым данным, способны нарушать процессы дифференцировки лимфоцитов, повышением уровня эндогенного NO, что по имеющимся данным приводит к остановке их клеточного цикла в стадии G1 с последующим исходом в апоптоз [3],

Применение эритропоэтина (ЭПО) в ранние сроки экспериментальной термической травмы на 2 сутки эксперимента привело к статистически значимому увеличению количества CD 3$^+$(с 2,73*10^9/л до 6,97*10^9/л, p<0,05) и CD 45RA$^+$ (с 0,57*10^9/л до 4,43*10^9/л, p<0,05) клеток периферической крови по сравнению с контрольной группой. Также нами отмечено статистически значимое снижение количества клеток в состоянии апоптоза(с 2,8 % до 0,27 %, p<0,05) и готовых вступить в апоптоз(с 15,6 % до 9,73 %, p<0,05).

Полагаем, что механизм действия ЭПО на количество лимфоцитов и их апоптоз связан как с прямым действием на эти клетки – были обнаружены экспрессия гена EPOR и мРНК EPOR на различных популяциях лейкоцитов [4], выявлена способность ЭПО к активации антиоксидантного транскрипционного ядерного фактора-2 и, как следствие, изменением активности НАД(Ф)Н-оксидоредуктазы, глутатион-S-трансферазы α-1 и гемоксигеназы-1 [5] так и опосредованным – например, через изменение уровня цитокинов.

Выводы.

1. При экспериментальной термической травме на 2 сутки наблюдается лимфоцитопения, более выражено снижается количество CD 45RA$^+$ лимфоцитов. Также отмечается активация апоптоза лимфоцитов.

2. Применение ЭПО при экспериментальной термической травме на 2 сутки приводит к повышению количества $CD3^+$ и $CD45RA^+$ лимфоцитов и уменьшению их апоптоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние эритропоэтина на показатели врожденного иммунитета в ранние сроки экспериментальной термической травмы / М. В. Осиков, Л. Ф. Телешева, А. М. Кишкин и др. // Фундаментальные исследования.– 2014.– № 7-2.– С. 334-339.
2. Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat / T. Nakanishi, Y. Nishi, E. F. Sato et al. // J Trauma.– 1998.– № 44(1) – С. 143-148.
3. High levels of endogenous nitric oxide produced after burn injury in rats arrest activated T lymphocytes in the first G1 phase of the cell cycle and then induce their apoptosis. / L. M. Valenti, J. Mathieu, Y. Chancerelle et al. // Exp Cell Res.– 2005.– № 306(1).– С. 150-167.
4. Erythropoietin receptor is expressed on human peripheral blood T and B lymphocytes and monocytes and is modulated by recombinant human erythropoietin treatment / K. A. Lisowska, A. Debska-Slizień, E. Bryl et al. // Artif. Organs.– 2010.– V. 34(8).– P. 654-662.
5. Zhang J., Zhu Y., Zhou D. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) alleviates early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rats: possible involvement of Nrf2-ARE pathway / J. Zhang, Y. Zhu, D. Zhou // Cytokine.– 2010.– V. 52, № 3.– P. 252-257.

THE INFLUENCE OF EPO ON THE BLOOD CONCENTRATION OF LYMFOCYTES AND APOPTOSIS IN EARLY STAGE OF THERMAL INJURY

Osikov M. V., Kishkin A. M.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Objective – to study the effect of EPO on the concentration of $CD3^+$ and $CD45RA^+$ lymphocytes in the blood and to evaluate apoptosis in the early stages of experimental TI. The study was performed on 26 rats, TI simulated with skin contact with the heated to 100 °C subject burn area was 4 %, the depth extent corresponds IIIA. EPO was administered intraperitoneally in a total dose of 1000 IU/kg. It is found that in experimental day 2 TI concentration in blood lymphocytes decreased primarily due to $CD45RA^+$. Use of EPO in the TI results in an increase of concentration of $CD3^+$ and $CD45RA^+$ lymphocyte apoptosis reduction.

Keywords: thermal injury, lymphocytes, apoptosis, erythropoietin

УЧАСТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ДЕСТРУКТИВНЫХ ФОРМ АПИКАЛЬНОГО ПЕРИОДОНТИТА

Мозговая Л. А., Задорина И. И., Годовалов А. П., Быкова Л. П.

ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия

Выявлена зависимость размера очага деструкции при деструктивных формах апикального периодонтита от вида выделенных микроорганизмов. Показано, что иммунная система реагирует достаточно высокой концентрацией белковых реактантов воспаления в периапикальном очаге. Повышение острофазных белков в содержимом патологического очага отражает удельная доля СРБ, которая коррелирует со степенью выраженности деструкции костной ткани в апикальном периодонте.

Ключевые слова: иммунопатогенез, апикальный периодонтит, С-реактивный белок, микробный пейзаж.

Широкий спектр микроорганизмов причастен к развитию периодонтита [1]. Первона-чальный ответ на бактериальную инфекцию приводит к активации иммунитета. Фаго-

цитирующие клетки, такие как нейтрофилы и макрофаги образуют первую линию защиты против бактериальной инфекции. Кроме фагоцитирующей им присуща секретирующая функция, и они продуцируют ряд цитокинов. Так, выделяется интерлейкин-6 (ИЛ-6), который, с одной стороны, стимулирует выработку в печени С-реактивного белка (СРБ), способствуя его увеличению в очаге поражения для усиления фагоцитоза через опсонизацию бактерий, с другой – относится к группе «остеокласт-активирующих факторов» [2]. Следовательно, с увеличением секреции ИЛ-6 повышается содержание СРБ в периапикальном очаге и усиливаются процессы деструкции костной ткани при хроническом апикальном периодонтите (ХАП).

Цель исследования – определить взаимосвязь иммуно-биохимических и микробиологических показателей в содержимом корневых каналов зубов с выраженностью деструкции костной ткани в апикальном периодонте.

Материалы и методы. Проведено открытое проспективное рандомизированное контролируемое клиническое исследование, в ходе которого изучено содержимое 44 корневых каналов (КК) в 36 зубах у 34 пациентов (13 мужчин и 21 женщина) в возрасте от 18 до 65 лет с деструктивными формами ХАП. Из них – хронический апикальный периодонтит, в том числе периапикальная гранулема (К 04.5.), диагностирован в 24 зубах, периапикальный абсцесс без полости (К 04.7.) – в 12 зубах.

Для микробиологического и иммуно-биохимического исследования содержимого КК зубов и периапикальной области использовали биоматериал, полученный трансканально с применением стерильных бумажных штифтов конусовидной формы диаметром 0,25 мм. Концентрацию альбумина и СРБ определяли с использованием соответствующих наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест», рассчитывая соотношение СРБ к общему белку. Рентгенологические симптомы ХАП оценивали по максимальному диаметру и площади очага деструкции костной ткани в апикальном периодонте по Н. А. Прилуковой [3], а также по индексу деструкции костной ткани PAI в модификации А. М. Соловьевой [4]. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с расчетом *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведенных исследований установлена зависимость размеров очага деструкции костной ткани от видовой численности и таксономической принадлежности микрофлоры, выделенной из КК зубов. Так, максимальный диаметр и площадь очага деструкции костной ткани были минимальными при выделении *Neisseria spp*. и *Staphylococcus spp*., а максимальными – при обнаружении *Corynebacterium spp.* и представителей семейства *Enterobacteriaceae*. При оценке индекса PAI не выявлено существенных изменений в зависимости от численности бактериальных видов в КК зубов.

На присутствие микроорганизмов в КК зубов иммунная система отреагировала выработкой С-реактивного белка. Высокая концентрация этого реактанта острой фазы воспаления в содержимом периапикального очага зарегистрирована при выделении *Streptococcuspyogenes* (3,1±0,2 мг/г белка), *Corynebacterium spp*. (2,9±0,4 мг/г белка), анаэробных микроорганизмов (3,0±0,5 мг/г белка) и коагулазопозитивных стафилококков (2,8±0,2 мг/г белка). Аналогичная зависимость обнаружена в отношении концентрации альбумина, где наибольшая его концентрация отмечена при выделении анаэробных микроорганизмов (218,8±56,3 мг/мл), *Corynebacterium spp.* (157,7±37,9 мг/мл) и *Streptococcuspyogenes* (120,4±14,4 мг/мл), а минимальная – при выделении *Neisseria spp*. (65,3±16,2 мг/мл; $p<0,05$). Кроме этого, уровень альбумина и СРБ в периапикальном очаге многократно превышали таковые в слюне и сыворотке крови пациентов с хроническим периодонтитом [5].

При проведении корреляционного анализа установлена прямая положительная связь средней силы между концентрацией СРБ в содержимом периапикального очага и значением индекса деструкции костной ткани PAI ($r=0,6$), что позволяет рассматривать уровень СРБ как маркер активности патологического процесса. Концентрация альбумина, которая в определенной степени отражает сосудистую проницаемость и экссудативные процессы, обратно коррелирует со значением индекса PAI ($r= –0,3$).

Таким образом, активность воспалительного процесса в апикальном периодонте определяют как условно патогенные микроорганизмы, так и факторы иммунной системы. Выявлена зависимость размера очага деструкции от вида выделенных микроорганизмов, что может быть обусловлено непосредственным повреждающим действием факторов их патогенности. Од-

новременно иммунная система отреагировала достаточно высокой концентрацией белковых реактантов воспаления в периапикальном очаге при всех деструктивных формах хронического апикального периодонтита. Так, повышение острофазных белков отражает доля СРБ в общем белке содержимого патологического очага, которая коррелирует со степенью выраженности деструкции костной ткани и, как следствие, указывает на активность хронического воспалительного процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микрофлора корневых каналов зубов в динамике лечения хронических форм апикального периодонтита / Л. А. Мозговая, И. И. Задорина, Л. П. Быкова и др. // Саратовский научно-медицинский журнал.– 2013.– Т. 9, № 3.– С. 447-449.
2. Триголос Н. Н. Клинические аспекты патогенеза хронического верхушечного периодонтита / Н. Н. Триголос // Волгоградский научно-медицинский журнал.– 2014.– № 2.– С. 18-24.
3. Прилукова Н. А. Оптимизация лечения хронического апикального периодонтита и факторы, влияющие на его развитие: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук (14.00.14) / Н. А. Прилукова.– Ижевск, 2013.– 24 с.
4. Соловьева А. М. Совершенствование методов профилактики и лечения хронической очаговой одонтогенной инфекции: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук (14.01.21) / А. М. Соловьева.– СПб, 2001.– 45 с.
5. Shaila M., Pai G.P., Shetty P. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis / M. Shaila, G. P. Pai, P. Shetty // J. Indian. Soc. Periodontol.– 2013.– V. 17, № 1.– P. 42-46.

MICROORGANISMS PARTICIPATION IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF APICAL PERIODONTITIS DESTRUCTIVE FORMS

Mozgovaya L. A., Zadorina I. I., Godovalov A. P., Bykova L. P.

Acad. EA Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

It was established the dependence of the destruction focus size under apical periodontitis destructive forms on the type of isolated microorganisms. It was shown that the immune system reacts to a sufficiently high concentration of inflammation protein in periapical focus. Increased acute phase proteins in the contents of the pathological focus reflects a specific percentage of C-reactive protein, which correlates with the severity of destruction of bone tissue in the apical periodontitis.

Keywords: immunopathogenesis, apical periodontitis, C-reactive protein, microflora.

АУТОАНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЕ У ЛИЦ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА НА СЕВЕРЕ

Сергеева Е. В., Леванюк А. И.

Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН, Архангельск, Россия

Активизация аутоантителообразования при старении обеспечивается повышением содержания в крови аутоантигенов, что доказано в отношении окисленных липопротеинов низкой плотности, фосфолипидов и некоторых ядерных антигенов. Переключение синтеза аутоантителообразования также определяется сохранением повышенных уровней циркулирующего в крови аутоантигена. Иммунная реакция на аутоантиген фактически не отличается от таковой на экзогенный антиген, за исключением взаимосвязи аутоантителообразования и содержания IgE.

Ключевые слова: аутоантитела, аутосенсибилизация, старение, иммунитет.

Актуальность. Одной из причин активного антителообразования у пожилых людей, является выраженная аутосенсибилизация. Выявление аутоантител до сих пор считается признаком аутосенсибилизации и развития тех или иных патологических процессов. Общепризнано, что появление аутоантител возникает в результате нарушения иммунорегуляции. Сведений о сочетании аутосенсибилизации и дефектов иммунной регуляции практически нет. Известно только, что аутоантитела возникают в результате неэффективности супрессорного звена за счет перекрестных антигенов.

Цель. Предполагается выявить взаимосвязь активизации аутоантителообразования и иммунных реакций.

Методы. Проанализированы результаты иммунологического обследования людей (514), родившихся и проживающих на Севере.Обследованы 255 человек в возрасте от 60 до 93 лет, 259 человек в возрасте от 45 до 59 лет. Комплекс иммунологического исследования крови включал определение гемограммы, фагоцитоза, содержания фенотипов лимфоцитов CD 3$^+$, CD 4$^+$, CD 5$^+$, CD 8$^+$, CD 10$^+$, CD 16$^+$, CD 25$^+$, CD 95$^+$, HLADR$^+$, CD 22$^+$, IgM, IgG, IgE, аутоантител к двухспиральной ДНК (ds-DNA), аутоантител к нуклеопротеидам (RNP), кардиолипину, аутоантитела класса IgM/IgG к фосфолипидам(аФЛ), фосфатидил-серину(аФС), фосфатидил-инозитолу (аФИ), фосфатидиловой кислоте (аФС); антитела против окисленных липопротеинов низкой плотности (оЛПНП), антитела к катепсину G, эластазе и антитела Jo-1, а также цитокинов – интерлейкин-2 (IL-2), растворимый рецептор к интерлейкину-2 (sIL-2R), фактор некроза опухоли альфа (TNF-α), растворимый рецептор I типа к фактору некроза опухоли альфа (sTNFα -RI). Комплекс определяемых цитокинов включал TNFa, IL-2.

Основные результаты. Известно, что у лиц, родившихся и проживающих на Севере, содержание аутоантител выше, чаще регистрируется повышение их концентрации. Известно, что активизация синтеза аутоантител различной специфичности у практически здоровых людей, переключение их синтеза с IgM на IgG регламентируется содержанием в крови соответствующих антигенов и уровнем развития на них иммунной реакции [1].

В группе лиц с повышенным уровнем содержания аутоантител к оЛПНП концентрации этой формы липидов были значительно выше (соответственно 203[115-296] и 112 [98-1126] нг/мл). Антифосфолипидные антитела выявлены у всех обследованных, частота регистрации повышенных уровней колеблется в пределах от 2,44 до 32,50 %. Содержание антител к кардиолипину находилось в пределах 3,23-11,08 МЕ/мл со средним значением 5,20±0,26 МЕ/мл; превышение физиологических границ регистрировали в (28,40 %). Признаки переключения антителообразования с класса IgM на IgG регистрировали в 65,85 %. Подобную закономерность наблюдали относительно выявления антител к фосфатидилинозитолу [2]. Содержание данных антител класса IgM колебалось в пределах 1,39-17,15 МЕ/мл со средним значением 4,57±0,50 МЕ/мл. Превышение физиологических границ их уровня наблюдали в 9,76 %. Активный синтез антител данного типа класса IgG регистрировали у 39,02 % обследуемых людей.

Несколько иную закономерность наблюдали в отношении содержания аутоантител к фосфатидиловой кислоте (ФК) – концентрации IgG в большинстве случаев были выше, чем IgM. Их уровни колебались в очень широких пределах 0,12-17,78 МЕ/мл, составляя в среднем 5,59±0,86 МЕ/мл. Единственным вариантом антител фосфолипидного профиля, уровень которых ни в одном случае не выходил за пределы физиологический нормы, являются антитела к фосфатидил-серину. Эти аутоантитела класса IgM составляют в среднем 2,09±0,22 МЕ/мл с колебаниями 0,73-7,23 МЕ/мл. Содержание IgG данного типа антител составило в среднем значении 2,83±0,17 МЕ/мл с пределами колебаний 1,57-6,20 МЕ/мл. Более высокие концентрации IgG, чем содержание IgM, наблюдали у большинства обследуемых лиц.

Наиболее высокие уровни повышенных концентраций антител установлены в группе лиц пожилого возраста 60-74 года с четким увеличением числа повышенных уровней аутоантител в двухспиральной ДНК (33,78 %), рибонуклеопротеину (16,23 %), оЛПНП (25,68 %), фосфатидиловой кислоте (28,38 %) и фосфатидил-инозитолу (22,97 %). При этом установлен интересный, на наш взгляд, факт снижения частоты регистрации повышенных концентраций у лиц старше 90 лет. Указанная закономерность выявляется в отношении всех изучаемых в работе типов аутоантител, но наиболее резко проявляется относительно антител к фосфатидил-серину.

Установлено, что синтез аутоантител, как и антител, индуцированных экзогенным антигеном, связан с активизацией лимфопролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, что проявляется увеличением содержания зрелых Т-клеток, лимфоцитов, способных к пролиферации, а также Т-хелперов и антителообразующих клеток. Установлена прямая зависимость уровней аутоантителообразования с содержанием провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-2.

При низких уровнях аутоантител к фосфолипидам выше содержание клеток, меченных к апоптозу. Повышенные концентрации аутоантител к оЛПНП ассоциированы с увеличением цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [3].

Выводы. У лиц пожилого возраста, родившихся и проживающих на севере, выше концентрации аутоантител, шире спектр их повышенных концентраций и частота их обнаружения. Активизация аутоантителообразования обеспечивается повышением содержания в крови аутоантигенов, что доказано в отношении оЛПНП, фосфолипидов и некоторых ядерных антигенов. Переключение синтеза аутоантителообразования также определяется сохранением повышенных уровней циркулирующего в крови аутоантигена. Иммунная реакция на аутоантиген фактически не отличается от таковой на экзогенный антиген, за исключением взаимосвязи аутоантителообразования и содержания IgE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добродеева Л. К., Сергеева Е. В. Состояние иммунной системы в процессе старения / Л. К. Добродеева, Е. В. Сергеева.– Екатеринбург: РИО УрО РАН,– 2014.– 136с.
2. Добродеева Л. К., Сенькова Л. В., Лютфалиева Г. Т. Содержание аутоантител у практически здоровых людей / Л. К. Добродеева, Л. В. Сенькова, Г. Т. Лютфалиева // Физиология человека.– 2006.– № 1.– С. 99-107.
3. Intrisic and induced regulation of the age-associated onset of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis / H. Zhang, J. R. Podojil, X. Luo et al. // J. Immunol.– 2008.– V. 181. № 7.– P. 4638-4647.

AUTOANTIBODIES EDUCATION IN ELDERLY AGE IN THE NORTH

Sergeeva E. V., Levanyuk A. I.

Institute of Environmental Physiology, Ural branch of RAS, Arkhangelsk, Russia

Activating autoantiteloobrazovaniya aging provides increased blood levels of autoantigens that proved against oxidized low density lipoprotein, phospholipids and some nuclear antigens. Switching autoantiteloobrazovaniya synthesis as determined persistence of elevated levels of circulating blood autoantigen. The immune response to the autoantigen is not actually different from that to exogenous antigen, except the content and interrelation autoantiteloobrazovaniya IgE.

Keywords: autoantibodies, autoserotherapy, aging, immunity.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ Г. АРХАНГЕЛЬСКА

Леванюк А. И., Сергеева Е. В.

Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН, Архангельск, Россия

В работе приводятся данные сравнительного анализа иммунологической реактивности у врачей и медицинских сестер. Работа в медицинском учреждении ассоциирована с повышением концентраций в крови IL-6, NK и цитотоксических лимфоцитов CD 8^+ на фоне снижения содержания активированных Т-лимфоцитов с рецепторами к IL-2, трансферрину, HLADRII. При этом уровень регистрации лимфопении достаточно значим, сопровождается дефицитом зрелых и активированных Т-клеток.

Ключевые слова: иммунная система, врачи, медсестры, цитокины.

Иммунная система контролирует постоянство внутренней среды человека и фактически является интегральным показателем здоровья. Иммунологическая реактивность является энергозатратным процессом и требует постоянного восполнения энергетического ресурса [1]. Напряжение иммунного фона обусловливает сокращение резервных возможностей своевременного иммунного ответа и риск формирования вторичного иммунодефицита. В комплексе профессиональных условий труда, не отнесенных к категории вредных, достаточно факторов, которые могут оказывать влияние на иммунологическую реактивность работника (контакт с токсическими веществами, биологически опасными объектами и физическими факторами, напряженные социально-психологические условия). Особую значимость указанные факторы приобретают при жизни в неблагоприятных климатических условиях Севера.

Целью настоящей работы является оценка возможного воздействия и последствий условий труда на состояние иммунологической реактивности у медицинского персонала.

Методы. Проанализированы результаты иммунологического обследования 66 человек (врачи – 32 человека и медицинские сестры – 34 человека), работающих в лечебно-профилактических учреждениях г. Архангельска в возрасте от 22 до 55 лет и стажем до 30 лет. Изучали содержание лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, фенотипов Т- и В- лимфоцитов, цитокинов, фагоцитарный показатель. Общее количество лейкоцитов определяли в камере Горяева. Гемограмму подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза. Субпопуляции лимфоцитов определяли методом непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител производства НПЦ «МедБиоСпектр» (г. Москва). Содержание цитокинов, определяли методом «конкурентного» иммуноферментного анализа с реактивами «BIOSOURSE», США. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли с помощью тест-набора химической компании «Реакомплекс» (г. Чита). Полученные результаты обработаны с помощью пакета программы «Statistica for Windows, версия 5.5».

Результаты. Установлено, что особенностью изменения иммунного статуса медработников является относительно высокое содержание в крови IL-6. Повышенные концентрации IL-6 установлены у 22,22±13,86 % обследуемых врачей и у 19,75±9,76 % медицинских сестер. Известно, что динамика активизации провоспалительных цитокинов

отличается наиболее ранней реакцией со стороны IL-2 и IL-6. IL-6 связан с острой фазой реакции воспаления, стимулирует продукцию гликогена, липолиз, окисление жиров, что обеспечивает дополнительный энергетический ресурс. Известно, что изменение концентраций провоспалительных цитокинов наблюдается под влиянием стресса, когда происходит повышение содержания IL-6 и IL-4.

Установлены различия относительно содержания циркулирующих моноцитов: у врачей моноцитоз регистрировали в 6 раз чаще, чем у медицинских сестер (12,5±5,85 и 2,94±2,90 %, p<0,01). Кроме распознавания и обработки антигена, моноцитарные фагоциты секретируют цитокины, регулируют пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность различных клеток. Активироанные макрофаги продуцируют цитокины (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF-α, INF-γ), обладающие эффекторными и регуляторными свойствами, способными запустить каскад воспалительных реакций.

Дефицит фагоцитарной активности нейтрофилов наблюдали у 46,88±8,82 % врачей и у 11,76±5,52 % медицинских сестер. Известно, что экспрессия CD 16 CD 40, CD 80, CD 86 и HLA-DR определяет способность нейтрофилов выступать в роли антигенпрезентирующих клеток для Т-лимфоцитов. Секреторная функция состоит в продукции и секреции IL-1α, IL-1ß, IL-8, IL-12, TNFα, IFNγ и колониестимулирующих факторов. Секретирующие гранулоциты, как правило, не фагоцитируют, выделяют большое разнообразие биологически активных веществ, способных оказать системное влияние на содержание и функциональную активность иммунокомпетентных клеток [2].

Под влиянием активизации IL-6 могут развиваться лимфопролиферативные реакции с увеличением содержания дифференцированных фенотипов лимфоцитов. Повышенные уровни содержания NK ($CD 16^+$) составили 50,01±8,84 % у врачей и 70,59±7,81 % у медсестер, а также цитотоксических лимфоцитов $CD 8^+$ соответственно 28,13±7,95 и 38,24± 8,33 %. Гликопротеин CD 16 реализует антителозависимую цитотоксичность в отсутствии молекул Главного комплекса гистосовместимости, антител и комплимента [1].

Обращает на себя внимание уровень частоты пониженных значений содержания зрелых Т-клеток (40,63±8,68 % у врачей и 29,41±7,81 % у медсестер), активированных Т-лимфоцитов с рецептором к IL-2 (соответственно 59,38±8,68 и 52,94±8,33 %) и $HLADR^+$ (соответственно 53,13±8,82 и 29,41±7,81 %) и содержание клеток с рецептором к трансферрину (соответственно 53,13±8,82 и 38,24±8,33 %). Трансферрин поддерживает и стимулирует клеточную пролиферацию, дополнительно обеспечивая клетки железом для синтеза ДНК и секреции цитокинов, в том числе IL-2. Молекулам HLADRII отводится ключевая роль в регуляции активности всех антиген представляющих клеток; снижение экспрессии HLADR характерно для иммунодефицитов и хронических воспалительных процессов.

Итак, работа в медицинском учреждении ассоциирована с повышением концентраций в крови IL-6, натуральных киллеров и цитотоксических лимфоцитов $CD 8^+$ на фоне снижения содержания активированных Т-лимфоцитов с рецепторами к IL-2, трансферрину, HLADRII. При этом уровень регистрации лимфопении достаточно значим 9-11 %, сопровождается дефицитом зрелых (40 и 29 %) и активированных Т-клеток (55 и 39 %). Известно, что IL-6 совместно с Toll-рецепторами формируют сенсорную систему изменения межклеточной среды при появлении различных изменений состава межклеточного пространства. Учитывая свойства этого цитокина, можно полагать, что активизация клеточно-опосредованной реакции цитотоксичности направлена на восстановление иммунного гомеостаза и она более эффективна у среднего медицинского персонала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добродеева Л. К. Состояние иммунной системы в процессе старения / Л. К. Добродеева, Е. В. Сергеева.– Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014.– 136 с.
2. Gavin P., Zubir A.S., Perry N. Young cross-linking of neutrophil CD 11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation / P. Gavin, A. S. Zubir, N. Perry // Immunology.– 2005.– V.114. № 3.– P. 354-368.

FEATURES OF IMUNNOLOGICAL REACTIVITY AMONG HEALTH WORKERS OF MEDICAL INSTITUTIONS IN ARKHANGELSK

Levanyuk A. I., Sergeeva E. V.

Institute of Environmental Physiology, Ural branch of RAS, Arkhangelsk, Russia

In this work there are researches of comparative studying of the immunological reactivity of the doctors and nurses. Work in a medical institution is associated with elevated concentrations in blood IL-6, NK cells and cytotoxic lymphocytes CD 8+ in the background to reduce the content of activated T-lymphocytes with receptors to IL-2, transferrin, HLADRII. The level of lymphopenia registration is quite significant, accompanied with deficit of mature and activated T-cells.

Keywords: immune system, doctors, nurses, cytokines.

КОЭФФИЦИЕНТ МАССЫ СЕЛЕЗЕНКИ – КРИТЕРИЙ СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЕБЕНКА В РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОГЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Суменко В. В.[1], Возгомент О. В.[2], Боев В. М.[1], Акатова А. А.[3], Климова А. Р.[1]

[1]ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет», Оренбург; [2]ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии», Москва; [3]ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия

Обследованы дети 1-й и 2-й групп здоровья, проживающих на территориях с различной антропогенной нагрузкой. Среднее значение коэффициента массы селезенки больше у детей, проживающих на территориях с высокой антропогенной нагрузкой. Детей с увеличенным коэффициентом массы селезенки имели изменения иммунограммы в виде снижения абсолютного и относительного содержания CD 19 клеток, индекса CD 4/CD 8 за счет снижения CD 4 клеток.

Ключевые слова: селезенка, антропогенная нагрузка, дети.

Иммунная система, являясь одной из важнейших гомеостатических систем, занимает центральное место в выработке адаптационной реакции на воздействие комплекса факторов окружающей среды. Детский организм более уязвим к антропогенной нагрузке, вследствие функциональной незрелости органов и систем, что приводит к увеличению иммунодефицитных состояний у детей на территориях с повышенной техногенной нагрузкой. Селезенка, являясь самым крупным лимфойдным органом, отражает базовое состояние периферической иммунной системы [1, 2]. Ультразвуковое исследование, повсеместно применимое в медицинской практике, позволяет получить точное представление о структуре селезенки и коэффициенте массы селезенки (КМС), то есть ее относительном размере.

Цель исследования. Обосновать использование ультразвукового параметра – коэффициента массы селезенки у детей в качестве критерия оценки состояния иммунной системы и маркера техногенной нагрузки территорий.

Материалы и методы. Обследовано 2406 детей в возрасте 1-15 лет 1-й и 2-й групп здоровья, проживающих на территориях промышленных городов Пермь (531 человек), Оренбург (450), Новотроицк (223), Медногорск (337) и г. Соль-Илецка (865), промышленность которого представлена соледобывающим пред-

приятием «Илецксоль», на территории города находится курортная зона. Ультразвуковое исследование выполнено по стандартной методике на ультразвуковых диагностических системах Mindray 8DCEXP (China) и TOSHIBA VIAMO (Япония). Всем детям рассчитан коэффициент массы селезенки по формуле:

$$KMC = 0{,}34 l^2 h \times 1000 / M,$$

где l -длина селезенки (см), h – толщина селезенки (см), М- масса тела (гр.) [1]. В исследование включались дети, проживающие с их родителями на данных территориях не менее 5-ти лет. Для комплексной оценки изучены приоритетные показатели качества источников водоснабжения и питьевой воды, атмосферного воздуха, почвы. Детям, проживающим в городах Пермь, Оренбург, Новотроицк проводилось исследование иммунного статуса с изучением клеточных и гуморальных параметров. Контролем явились региональные нормы показателей иммунного статуса детей. Статистическую достоверность различий оценивали по непарному *t*-критерию Стьюдента, вычислением χ^2с использованием программы Excel 2010. Выполнен математический анализ взаимосвязи лабораторных показателей и КМС. Доказательство связи строили на основе построения парных математических моделей «коэффициент массы селезенки – лабораторный маркер», основанных на данных выборочных статистических исследований, с использованием логистической регрессионной модели из пакета прикладных программного Statistica 10.

Результаты. В Медногорске суммарный показатель загрязнения атмосферного воздуха составил – 5,3, питьевой воды – 5,3, почвы – 6,3, в Новотроицке – соответственно 4,5, 2,6, 2,7, в Перми – 4,4, 3,9, 4,9 и в Соль-Илецке – 3,7, 3,8 и 1,7, соответственно. Таким образом, комплексный показатель загрязнения среды обитания (Ксум) в Медногорске (16,9) на 1,82 раза выше, чем в Соль-Илецке (9,3).

Установлено, что среднегрупповое значение коэффициента массы селезенки достоверно больше ($p<0{,}05$) в Перми (3,69), Оренбурге (3,24), Медногорске (3,56), Новотроицке (3,34), чем в Соль-Илецке (2,83). Выявлено, что доля детей с увеличенным коэффициентом массы селезенки, достоверно различна на анализируемых территориях. В Соль-Илецке количество детей, имеющих увеличение селезенки составляет 9,8 % и это достоверно ($p\leq0{,}05$) меньше, чем в Перми (28,6 %), Оренбурге (16,2 %), Новотроицке – 27,8 %, Медногорске 31,8 %, где почти треть исследуемых детей имеет увеличение самого крупного лимфоидного органа в организме. Следовательно, имеются различия КМС в зависимости от степени санитарно-гигиенического благополучия территорий постоянного проживания детей.

Анализ иммунологических показателей у детей, проживающих в промышленных городах, показал наличие однонаправленных изменений. Так в Оренбурге – достоверное снижение $CD4^+$ $0{,}63\pm0{,}05*10^9$ (в контроле $1{,}12\pm0{,}2*10^9$), соотношения $CD4^+/CD8^+$ 1,35±0,18 (в контроле 2,3±0,03), увеличение IgG 14,28±1,07 г/л (в контроле 10,41±0,18 г/л), в Новотроицке достоверное снижение CD4 $0{,}77\pm0{,}09*10^9$ (в контроле $1{,}12\pm0{,}2*10^9$), соотношения $CD4^+/CD8^+$ 1,53±0,14 (в контроле 2,3±0,03), в Перми – снижение иммунорегуляторного индекса $CD4^+/CD8^+$ 1,1±0,7 в контроле (1,4±0,3), тенденция к снижению IgA 1,25±0,03 г/л в контроле 1,27±0,02 г/л. Детей с увеличенным коэффициентом массы селезенки имели изменения иммунограммы в виде достоверного ($p<0{,}05$) снижения абсолютного и относительного содержания $CD19^+$ клеток, иммунорегуляторного индекса $CD4^+/CD8^+$ за счет снижения $CD4^+$ клеток.

На фоне иммунодефицитных состояний возникает реактивная гиперплазия лимфоидной ткани отражением которой является увеличение селезенки [1].

Анализ математического моделирования (построение кривых логистической регрессии), характеризующий изменение иммунологических показателей крови в зависимости от увеличения КМС более 2, показал, что с увеличением КМС вероятность снижения иммуноглобулина А и увеличения иммуноглобулина G (IgG) достоверно ($p\leq0{,}05$) возрастает. Тенденция к увеличению IgG может указывать на активацию специфических иммунных реакций на фоне инфекций и интоксикаций различной этиологии. Статистически значимые различия среднегруппового значения КМС, а также доли детей с увеличением селезенки, свидетельствуют о существовании хронической антигенной стимуляции иммунной системы, обусловленной антропогенной нагрузкой.

Выводы. Коэффициент массы селезенки может являться критерием, характеризующим изменение иммунной системы на популяци-

онном уровне, которое можно расценить как адаптивное на фоне техногенных факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Возгомент О.В. Ультразвуковая оценка состояния периферических органов иммунной системы у детей в условиях различного техногенного воздействия. Автореф. дисс. … докт. мед.наук: 14.01.13 / Возгомент Ольга Викторовна.– Москва, 2015.– 44 с.
2. Инновационный подход для разработки региональных показателей ультразвукового исследования органов брюшной полости и почек у детей, проживающих на территориях с различной антропогенной нагрузкой: монография / В.В. Суменко, В.М. Боев, М.И. Пыков и др.– Оренбург-Москва.– ООО ИПК «Университет», 2015.– 108 с.

WEIGHT RATIO SPLEEN – IMMUNE SYSTEM CRITERIA OF THE CHILD IN DIFFERENT CONDITIONS TECHNOGENIC

Sumenko V.V.[1], Vozgoment O.V.[2], Boev V.M.[1], Akatova A.A.[3], Klimova A.R.[1]

[1]Orenburg State Medical University, Orenburg; [2]Central Research Institute for Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow; [3]Federal Research Center of Medical and preventive public health risk management technologies, Perm, Russia

The study included children of the 1st and 2nd of health groups. Average value of the coefficient of spleen weight greater among children living in the high anthropogenic load areas. Children with an increased coefficient of spleen weight changes were immunogram in the form of lower absolute and relative content of CD 19 cells, CD 4 / CD 8 index due to lower CD 4 cell count.

Keywords: spleen, human pressure, children.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ЦИТОАРХИТЕКТОНИКА ТКАНЕВЫХ БАЗОФИЛОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПОСЛЕРОДОВЫЙ ПЕРИОД

Параскун А.А., Виноградов С.Ю., Штойко М.А., Чериков В.С.

ГБОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Иваново, Россия

Установлено, что в послеродовый период у крыс пространственная цитоархитектоника тканевых базофилов щитовидной железы достоверно изменяется. Общее количество исследуемых клеток минимально через несколько часов после родов, а к первым суткам лактации увеличивается, максимальных значений достигает на 3-5 сутки эксперимента. Эти изменения происходят синхронно с динамикой параметров морфофункциональной активности железы.

Ключевые слова: тканевые базофилы, щитовидная железа, послеродовый период.

Известно, что женщины в 10 раз чаще, чем мужчины, страдают от тиреоидных нарушений. В последние годы распространенность этих заболеваний у женщин во время беременности и лактации увеличивается [1]. Щитовидная железа (ЩЖ) играет важную роль в регуляции процессов жизнедеятельности организма. Она контролируется двумя тесно взаимосвязанными системами: трансгипофизарной и нервнопроводниковой. Наряду с этим в поддержании внутриорганного гомеостаза щитовидной железы принимают участие тканевые базофилы (тучные клетки), которые накапливают и выделяют широкий спектр биологически

активных веществ (гистамин, гепарин, серотонин, катехоламины, цитокины, липидные медиаторы и др.) [2, 3]. Тем самым, регулируя пролиферацию клеток, их дифференцировку, функциональную активность, межклеточные взаимодействия, как в норме, так и в условиях воспаления, регенерации и при развитии иммунных реакций [4, 5].

Цель исследований – оценка динамики пространственной цитоархитектоники тканевых базофилов (ТБ) щитовидной железы крыс в послеродовый период.

Работа выполнена на 30 здоровых беспородных крысах – самках зрелого репродуктивного возраста. Сроки эксперимента составили 0, 1, 3, 5, 7 сутки после родов и лактации. Исследования с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ № 724 Минвуза от 13.11.1984 г.). После забоя у крыс отделяли обе доли щитовидной железы. Одна доля сразу же подвергалась криостатному микротомированию, а другая – парафиновой проводке. Для оценки пространственной цитоархитектоники тканевых базофилов криостатные срезы толщиной 20 мкм окрашивали альциановым синим-сафраниновым в прописи J. Desaga и изучали с помощью микроскопа Биолам (об. 90, ок. 7). Подсчитывали количество тканевых базофилов в поле зрения (10 полей зрения – 1 варианта статистического массива) отдельно в центральных и периферических зонах железы. При анализе результатов тучные клетки были разделены на основе сродства гранул к тому или иному красителю на 3 группы: 1. альцианофильные, окрашивающиеся только альциановым синим; 2. миксные, содержащие альцианофильные и сафранинофильные гранулы; 3. сафранинофильные, окрашивающиеся сафранином. Морфометрические исследования препаратов ЩЖ, окрашенных гематоксилин-эозином, проводили с помощью анализатора изображений, используя программу ВИДЕО ТЕСТ МАСТЕР. Содержание тироксина, трийодтиронина, тиреотропного гормона в сыворотке крови животных определяли методом твердофазного ИФА. Статистическая обработка материала проводилась с использованием интерпрограмм «MicrosoftExcel 2010», «Статистика 6,0». Для выявления и анализа внутри- и межрегиональных сопряжений изменения оценочных параметров применялся непараметрический метод рангового корреляционного анализа Спирмена.

Выявлено, что тканевые базофилы чаще всего располагаются около кровеносных сосудов, нередко тесно примыкают к базальной мембране фолликулов и перифолликулярных капилляров [5]. Показатели пространственной цитоархитектоники изменяются на протяжении всего эксперимента. Через несколько часов после родов общее количество тканевых базофилов минимально, а к первым суткам лактации достоверно увеличивается, сохраняя максимальные значения на 3-5 сутки и незначительно снижаясь к окончанию испытаний (7 сутки). При анализе дифференциальной окраски было установлено, что на начальных этапах эксперимента (0-1 сутки) преобладают сафранинофильные ТБ., на 3 сутки их количество достоверно уменьшается, а позднее (5 сутки) вновь возрастает. Плотность пространственного распределения миксных и альцианофильных тучных клеток возрастает на 3 сутки с последующим снижением в период с 5-х по 7-е сутки после родов. Динамика изменений цитоархитектоники ТБ в центральных и периферических зонах щитовидной железы синхронизированы. Достоверные отличия выявлены на 0, 3, 5 сутки эксперимента, что проявляется в преобладании ТБ на периферии железы. Ранговый корреляционный анализ демонстрирует хроносопряженность изменений плотности пространственного распределения ТБ с морфометрическими (размер фолликулов, высота тироцитов и др.) и функциональными (содержание тироксина, трийодтиронина и тиреотропного гормона в сыворотке крови) параметрами щитовидной железы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maternal thyroid function in the first twenty weeks of pregnancy andsubsequent fetal and infant development: a prospectivepopulation-based cohort study in China / P. Y. Su, K. Huang, J. H. Hao et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2011.– V. 96.– P. 3234-3241.
2. Гордон Д. С., Сергеева В. Е., Зеленова Н. Г. Нейромедиаторы лимфоидных органов / Д. С. Гордон, В. Е. Сергеева, Н. Г. Зеленова.– Ленинград: Наука, 1982.– 128с.
3. Диндяев С. В. Тучные клетки эндометрия матки крыс в системе ее биоаминового обмена / С. В. Диндяев // Успехи современного естествознания.– 2007.– № 10.– С. 26-29.

4. Кондашевская М. В. Тучные клетки и гепарин – ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах / М. В. Кондашевская // Вестник РАМН.– 2010.– № 6.– С. 49-54.
5. Параскун А. А., Виноградов С. Ю., Штойко М. А. Динамика изменений флуоресценции односпиральных нуклеиновых кислот в тканевых базофилах щитовидной железы во второй половине беременности / А. А. Параскун, С. Ю. Виноградов, М. А. Штойко // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9(18), № 2.– С. 416-417.

SPATIAL CYTOARCHITECTONICS TISSUE BASOPHILS THYROID GLAND IN THE POSTPARTUM PERIOD

Paraskun A. A., Vinogradov S. Y., Shtoyko M. A., Cherikov V. S.

Ivanovo State Medical Academy, the Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovo, Russia

It was found that the postnatal period in rats spatial cytoarchitectonics tissue basophils thyroid significantly changed. The total number of cells studied minimally a few hours after birth, and to the first days of lactation increases, reaches a maximum value at 3-5 day experiment. These changes occur synchronously with the dynamics of the morphological and functional activity of the gland options.

Keywords: tissue basophils, thyroid gland, postpartum period.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ПОРОКАМИ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА

Климова А. Р., Сетко Н. П., Суменко В. В., Рощупкин А. Н., Терентьева С. Ю.

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет», Оренбург, Россия

Проведя оценку иммунного статуса детей с врожденными пороками развития опорно-двигательного аппарата: врожденный вывих бедра, врожденная косолапость выявлены отклонения в клеточном (снижение количества CD3, CD4, CD8, CD19 клеток) и гуморальном (увеличение содержание циркулирующих иммунных комплексов, содержание сывороточных иммуноглобулинов класса А и М, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНОα) звеньях иммунитета.

Ключевые слова: иммунологические показатели, пороки развития, дети.

В настоящее время значимость заболеваний опорно-двигательного аппарата (ОДА) в качестве серьезной проблемы здравоохранения, имеющей большое социальное значение, общепризнана [2,4]. Полученные данные показали, что инвалидность с детства в структуре общей инвалидности вследствие патологии ОДА составляют в среднем 6,5 % [1,3,5]. При этом важно отметить, что малое количество работ посвящено вопросам изучения иммунного статуса детей с пороками развития (ПР) опорно-двигательного аппарата.

Цель исследования: изучить иммунный статус детей с пороками развития опорно-двигательного аппарата.

Иммунологические показатели сравнивались с региональными нормативами показателей системы иммунитета для детей и под-

ростков Оренбургской области. Определение суммарного числа лимфоцитов и их субпопуляций проводили в реакции иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител (CD 3, CD 4, CD 8, CD 19). Для количественного определения сывороточных иммуноглобулинов классов A, M, G использовали метод радиальной иммунодиффузии. Содержание циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови исследовались в реакции преципитации с раствором полиэтиленгликоля. Концентрацию цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8, ФНОа в сыворотке крови обследуемых определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов фирмы «ЦИТОКИН», Санкт-Петербург, специфичных для каждого цитокина и предназначенных для их количественного исследования в сыворотке крови.

Был изучен иммунный статус 25 детей с пороками развития ОДА: врожденный вывих бедра, врожденная косолапость.

Некоторые показатели периферической крови и иммунной системы имеются отклонения, которые выходят за пределы региональных нормативов. В периферической крови у 60 % детей с врожденными пороками развития (ВПР) ОДА выявлена тенденция к повышению числа лейкоцитов. У 80 % обследованных отмечалось увеличение абсолютного и относительного количества суммарных лимфоцитов. 66,7 % детей с врожденным вывихом бедра, врожденной косолапостью имели снижение фагоцитарного показателя.

Анализ показателей иммунитета выявил, что наиболее значимые отклонения выражались в супрессии Т- и В-систем иммунитета, активации гуморального иммунитета.

Среди показателей клеточного иммунитета у всех детей с ВПР ОДА было выявлено снижение относительного количества CD 3 клеток, у 93,3 % больных – CD 4 клеток и у 66,7 % детей наблюдалось уменьшение относительного содержания CD 8 клеток. Оценивая В-систему иммунитета необходимо отметить, что у 80 % детей с ВПР ОДА имели уменьшение абсолютного и относительного числа CD 19 клеток.

Оценивая изменения показателей гуморального иммунитета было выявлено, что большинство детей (80 %) имели увеличение уровня IgM и IgA у 73,3 % обследуемых.

У 20 больных с пороками развития ОДА был определен уровень цитокинов в сыворотке крови. У всех обследованных детей отмечалось достоверное увеличение уровня ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНОα.

В ходе проведенного исследования была установлена прямая сильная корреляционная связь между IgA и ИЛ-8, средние корреляционные связи между содержанием лимфоцитов и уровнем ФНОα, IgM, IgG и ИЛ-6. Обратные корреляционные связи были обнаружены между уровнем моноцитов и ФНОα, сегментоядерными нейтрофилами и ИЛ-6.

Выводы:

1. Проведя оценку иммунного статуса детей с врожденными пороками развития опорно-двигательного аппарата выявлены отклонения в клеточном (снижение количества CD 3, CD 4, CD 8, CD 19 клеток) и гуморальном (увеличение содержание циркулирующих иммунных комплексов, содержание сывороточных иммуноглобулинов класса A, M, уровня ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНОα) звеньях иммунитета.

2. Полученные результаты исследования могут быть использованы при разработке дифференцированных подходов к включению иммуномодулирующих препаратов в комплексную терапию больных с врожденными пороками развития опорно-двигательного аппарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дитман Ю. М., Мехтиханов Д. Д. Распространенность и структура ортопедических заболеваний в детском возрасте / Ю. М. Дитман, Д. Д. Мехтиханов // Советское здравоохранение.– 1998.– № 8.– С. 40.
2. Мицкевич В. А. Ортопедия первых шагов / В. А. Мицкевич.– М: БИНОМ, 2013.– 359 с.
3. Мухина Т. В., Какорина Е. П. Перинатальная смертность в городской и сельской местности Российской Федерации / Т. В. Мухина, Е. П. Какорина // Здравоохранение Российской Федерации.– 2005.– № 4.– С. 29-33.
4. Роль врожденных пороков развития в структуре младенческой смертности / Н. Б. Седова, Т. В. Чаша, Н. В. Харламова и др. // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины.– 2005.– № 2.– С. 14-16.
5. Яковлева Т. В. Причины и динамика перинатальной смертности в Российской Федерации / Т. В. Яковлева // Здравоохранение Российской Федерации.– 2005.– № 4.– С. 26-28.

IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BLOOD OF CHILDREN WITH MALFORMATIONS OF THE MUSCULOSKELETAL SYSTEM

Klimova A. R., Setco N. P., Sumenko V. V., Roshchupkin A. N., Terentyeva S. Y.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

After assessing the immune status of children with congenital malformations of the musculoskeletal system: congenital hip dislocation, congenital clubfoot identified abnormalities in cell (reducing the number of CD 3, CD 4, CD 8, CD 19 cells) and humoral (increased content of circulating immune complexes, serum immunoglobulins A and M, IL-6, IL-8, TNFa) the elements of the immune system.

Keywords: immunological parameters, malformations, children.

ТРОМБОЦИТЫ КАК УЧАСТНИКИ ВНУТРИСОСУДИСТЫХ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ

Серебряная Н. Б.[1,2,3,4], Казеннова Е. В.[4], Якуцени П. П.[5]

[1]ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» Владивосток; [2]ФГАОУ ВО «Северо-западный медицинский университет им. Мечникова», Санкт-Петербург; [3]ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; [4]ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург; [5]ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

До недавнего времени основной и критической функцией тромбоцитов считалась поддержка гемостаза. Однако выявленный на тромбоцитах обширный репертуар рецепторов, общих с иммунными клетками, продукция ими антимикробных белков и различных регуляторных молекул свидетельствует, что тромбоциты являются постоянными и активными участниками иммунных реакций, активирующими и регулирующими реакции как врожденного иммунитета, так и адаптивного иммунитета.

Ключевые слова: тромбоциты, иммунитет, хемокины, Т-лимфоциты.

До недавнего времени основной и критической функцией тромбоцитов считалась поддержка гемостаза. Однако для контроля над гемостазом достаточно, чтобы количество тромбоцитов немного превышало 10 000/мкл, (при нормальном диапазоне в 180 000-400 000/мкл). Такое количественное несоответствие подсказывает, что тромбоциты имеют еще ряд важных функций, не связанных с тромбозом и гемостазом [4].

В 2004 на тромбоцитах выявлены Toll-подобные рецепторы (TLR), что существенно продвинуло представление о них, как о клетках, вовлеченных в иммунные реакции. На тромбоцитах выявлены функциональные TLR 2, TLR 4, TLR 7 и TLR 9 [1]. Стимуляция тромбоцитарных TLR 2 и TLR 9 вызывает агрегацию тромбоцитов. Тромбоцитарный TLR 4 участвует в ответе на бактериальный эндотоксин. Активированные через TLR 4 тромбоциты при контакте с нейтрофилами активируют их к образованию внеклеточных ловушек, способных к захвату бактерий. Тромбоциты, экспрессирующие TLR 7, вовлечены в ответе организма на вирусные инфекции, причем без индукции их агрегации. Активированные тромбоциты экспрессируют CD 40L (CD 154), мембранный гликопротеин семейства фактора некроза опухоли (TNF). Матриксные металлопротеиназы тромбоцитов обеспечивают шеддинг рецептора CD 40L, что обеспечивает его присутствует в плазме в растворенной форме

(sCD 40L), причем именно тромбоциты представляют собой главный источник sCD 40L в плазме крови [2]. Тромбоцитарный CD 40L может взаимодействовать с рецептором CD 40 на эндотелиальных клетках, вызывая воспалительный ответ, и В-лимфоцитах, усиливаю продукцию ими иммуноглобулинов. В комплексе с другими сигналами, CD 40L тромбоцитов может вызвать созревание и активацию дендритных клеток.

Значительное внимание привлекает в настоящее время тромбоцитарный рецептор С-лектинового типа CLEC-2, который позволяет тромбоцитам участвовать в разделении лимфовенозных и кровеносных сосудов во время развития организма за счет взаимодействия с белком подопланином на клетках эндотелия лимфатических сосудов. Через рецептор CLEC-2 тромбоциты могут быть активированы воспалительными макрофагами, для которых характерна экспрессия подопланина.

Наличие на тромбоцитах рецепторов FcγRII, FcεRI и FcαRIA и рецепторов для компонентов комплемента подтверждает участие пластинок в разнообразных иммунных реакциях. FcγRIIA на тромбоцитах может вовлекать их в защиту от бактерий. Активация тромбоцитов через FcεR 1 вызывает высвобождение хемокина RANTES и серотонина, медиаторов, которые способствуют провоспалительному ответу иммунных клеток. Перекрестная связь FcαRI на тромбоцитах приводит к продукции ими протромботических и провоспалительных медиаторов, таких как тканевой фактор (TF) и IL-1β.

Тромбоциты обладают рецепторами для активированных компонентов комплемента и их фрагментов – CR 2, CR 3, CR 4, C 1q, C 1-ингибитора и факторов D и H. Активированные тромбоциты способствуют активации системы комплемента через высвобождение протеинкиназ и АТФ, а также при фосфорилировании C 3 и C 3b [3].

В α-гранулах тромбоцитов хранятся хемокины классов CC и CXC, которые высвобождаются после активации тромбоцитов. Хемокины CC, такие как CCL2, CCL3 и CCL5 привлекают и активируют лейкоциты. Хемокины CXC, CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL7, CXCL8, CXCL12, привлекают нейтрофилы и подавляют их апоптоз.

Хемокины тромбоцитов представляют и самую многочисленную группу тромбоцитарных антимикробных белков и классифицируются как киноцидины. В экстрагранулярном отделе цитоплазмы тромбоцитов присутствует дефензин hBD-1. Он высвобождается из тромбоцитов при их разрушении литическими токсинами. Дефензин hBD-1 задерживает рост патогенных штаммов бактерий и индуцирует нейтрофилы к образование внеклеточных ловушек [4]. Тромбоцитарные хемокины являются также важными регуляторами активации, пролиферации и адгезии Т-лимфоцитов. Способность тромбоцитов создавать агрегаты с Т-лимфоцитами позволяет последним проникать через высокий эндотелий венул, что необходимо для проникновения наивных Т-лимфоцитов во вторичную лимфоидную ткань и дальнейшее развитие. Хемокин PF4 (CXCL4), присутствующий в α-гранулах в очень высоких концентрациях, вовлечен в регулирование гомеостаза Т-хелперов, ограничивая развитие Th17 CD 4^+ лимфоцитов и поддерживая развитие Tregs [5]. Не вызывает сомнений влияние на иммунные клетки и тромбоцитарных белков, относящимися к семейству цитокинов и их рецепторов, в частности, рецепторов суперсемейства TNF (TRAIL и LIGHT), интерлейкинов IL-1, IL-8, растворимого рецептор IL-6 (sRIL-6) и трансформирующих факторов роста TGFα и TGFβ1 и -β2.

Таким образом, за последние годы получены новые данные убедительно свидетельствующие, что тромбоциты являются постоянными и активными участниками иммунных реакций, активирующими и регулирующими реакции как врожденного иммунитета, так и адаптивного иммунитета. Рецепторы тромбоцитов – потенциальные мишенями для поиска новых терапевтических средств. Пространственная структура некоторых из них, например, CLEC-2 изучена рентгенографически, что облегчает работы в области создания лекарственных средств к этой мишени. Напротив, трехмерная структура большинства TLR изучена фрагментарно, что определяет актуальность работ, связанных с молекулярным моделированием их строения и поиском новых агонистов и или антагонистов, обладающих заданными регуляторными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors / F. Cognasse, K. A. Nguyen, P. Damien et al. // Front Immunol.– 2015.– V.6.– P. 83-93.

2. Lee R.H., Bergmeier W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and hemITAM signaling and vascular integrity in inflammation and development / R. H. Lee, W. Bergmeier // J. Thromb Haemost.– 2016. doi: 10.1111/jth.13250.
3. Complement and platelets: Mutual interference in the immune network / C. Speth, G. Rambach, R. Würzner et al. // Mol Immunol.– 2015.– V.67, № 1.– P. 108-118.
4. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells / C. N. Morrell, A. A. Aggrey, L. M. Chapman et al. // Blood.– 2014.– V.123, № 18.– P. 2759-2767.
5. Platelets provoke distinct dynamics of immune responses by differentially regulating CD4+ T-cell proliferation / L. Zhu, Z. Huang, R. Stålesen et al. // J Thromb Haemost.– 2014.– V.12, № 7.– P. 1156-1165.

PLATELETS AS PARTICIPANTS OF THE INTRAVASCULAR IMMUNE REACTIONS

Serebryanaya N. B.[1-4], Kazennova E. V.[4], Yakutseni P.P[5]

[1]FEFU, Vladivostok; [2]NWSMU, SPb; [3]SPbU, SPb; [4]IEM SPb; [5]SPbPU, SPb, Russia

Until recently, the support of a hemostasis was considered as the main and critical function of the platelets. However, the wide repertoire of the receptors shared with the immune cells, the production by the platelets of the microbicidal proteins and the various regulatory molecules, confirm the platelets are the constant and active participants of the immune reactions, which activate and regulate the reactions both the innate, and the adaptive immunity.

Keywords: platelets, immunity, chemokines, T-lymphocytes.

ТРОМБОЦИТЫ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

Серебряная Н. Б.[1-4], Якуцени П. П.[5]

[1]ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток; [2]ФГАОУ ВО «Северо-западный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург; [3]ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; [4]ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург; [5]ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) неотъемлемая черта нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний. При повреждении ГЭБ микроглия изменяет паттерн традиционного поведения на провоспалительный, что значительно усиливает первоначальное повреждение. Продукция активированными тромбоцитами широкого спектра различных модуляторов заставляет обратить на них особое внимание как на ключевых игроков в регуляции проницаемости ГЭБ и активности нейровоспаления.

Ключевые слова: тромбоциты, иммунитет, Т-лимфоциты.

В последнее десятилетие стало очевидно, что тромбоцитам принадлежит ведущая роль не только в контроле над гемостазом, но и в регуляции состояния сосудистой стенки, воспаления и иммунных реакций [1]. Тромбоциты (Тр) первыми попадают к местам сосудистого повреждения, распознают их и активируются при взаимодействии с компонентами базальной мембраны. Наличие комплекса адгезионных рецепторов позволяет Тр устанавливать стабильное взаимодействие с иммунными и эндотелиальными клетками. Свидетельством контроля

тромбоцитами функционального состояния сосудистой стенки является тот факт, что тромбоцитопения приводит к повышению проницаемости неповрежденных, не вовлеченных в воспаление микрососудов, а при повышении количества тромбоцитов нарушенная проницаемость полностью восстанавливается [2]. Нормализация сосудистой проницаемости может быть обеспечена также растворимыми факторами, высвобождаемыми тромбоцитами (сфингозин-1-фосфат, серотонин, ангиопоэтин-1 и адениновые нуклеотиды).

Эндотелиальный барьер в ЦНС, неотъемлемая структура ГЭБ, создает более высокий уровень защиты мозга, чем тот, что существует в других тканях. При повреждении ГЭБ астроглия и микроглия, оказываются в измененной, не «иммунопривелегированной» среде и изменяют паттерн традиционного противовоспалительного поведения на провоспалительный. При этом воспалительный ответ в ткани мозга, связанный с первоначальным повреждением, значительно усиливается [3]. Дисфункция ГЭБ связана с патогенезом таких заболеваний как болезнь Альцгеймера (БА), рассеянный склероз (РС), боковой амиотрофический склероз, эпилепсия, большое депрессивное расстройство, и с такими косвенно связанными с воспалением состояниями, как послеоперационные когнитивные нарушения и возрастное снижение когнитивной функции. Последнее, как считают, главным образом, сосудистое заболевание, о чем свидетельствует тот факт, что предшественником снижения когнитивной функции является повреждение капилляров сетчатки глаза.

Состояние хронической активации Тр характерно для болезни Альцгеймера. Амилоидный белок β (Аβ) активирует тромбоциты и вызывает их агрегацию. Показано, что Тр содержат более 90 % циркулирующего белка, предшественника β-амилоида (APP), причем после их активации количество экспрессируемого APP увеличивается в три раза. Тр также экспрессируют фермент BACE, известный как «β-секретаза», который вырезает из APP специфический β-амилоидный пептид. Высвобождение Аβ активированными тромбоцитами приводит к отложению Аβ в стенках кровеносных сосудов и развитию амилоидной ангиопатии, характерной для БА. Посмертное исследование образцов мозга лиц с БА показало, что активированые Тр присутствуют в большинстве сосудов мозга, независимо от присутствия в них β-амилоидных отложений, тогда как в паренхиме мозга обнаруживаются только единичные тромбоциты [4].

Тр синтезируют многочисленные липидные модуляторы, которые способны воздействовать на барьерную функцию эндотелия разнонаправленно [5]. Так при активации Тр начинают взаимодействовать с нейтрофилами, что приводит к трансклеточному метаболизму фосфолипидов и, как результат, увеличивает концентрацию фактора активации тромбоцитов (PAF). PAF увеличивает сосудистую проницаемость, связываясь со своим рецептором (PAFR) на эндотелиальных клетках. Интересно, что увеличение концентрации PAF может вызвать тромбоцитопению, и склонность к тромбоцитопении у больных с воспалительными состояниями может быть проявлением активности PAF. Предполагают, что PAF вовлечен в патогенез РС, инсульта и травмы головного мозга. Повышение уровня PAF зарегистрировано в ЦСЖ и плазме крови больных РС, а в очагах демиелинизации повышена экспрессия PAFR, которые считают ответственным за раннее разрушение ГЭБ при РС. Трехмерная структура PAFR остается все еще не изученной, что затрудняет поиски эффективных антагонистов.

Выделяемая активированными Тр лизофосфатидная кислота (фосфатированный эфир глицерина) действует через рецептор LPA1 и вовлечена в патогенез нейродегенеративного процесса после травмы мозга, способствуя демиелинизации, гибели нейронов, дегенерации аксонов, активации микроглии, а также развитию нейропатической боли. Фармакологические блокаторы LPA1, позволяют значительно снизить демиелинизацию, существенно улучшая показатели активности и подвижности животных с травмой спинного мозга.

Восстановление барьерной функции эндотелия связано с активностью противовоспалительных липидных модуляторов Тр, таких как резольвины и протектины. При травме головного мозга показано, что резольвины ингибируют проникновение лейкоцитов в ткань мозга, модулируя экспрессию нескольких адгезинов на моноцитах и нейтрофилах. Протектин D1 тормозит миграцию нейтрофилов через эндотелий, снижает их активность, а в микроглиальных клетках блокирует транскрипцию ИЛ-1β, что при экспериментальной ишемии головного мозга ограничивает объем повреждения.

Таким образом, тромбоциты являются активными участниками нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваний, причем наиболее существенным представляется их участие в патогенезе указанных состояний через регуляцию проницаемости ГЭБ, что требует создания новых теоретических моделей молекулярного, надмолекулярного, клеточного и системного уровня.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rondina M.T., Weyrich A.S., Zimmerman G. A. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases / M. T. Rondina, A. S. Weyrich, G. A. Zimmerman // Circ Res.– 2013.– V.4, № 11.– P. 1506-1519.
2. Rodrigues S.F., Granger D. N. Blood cells and endothelial barrier function / S. F. Rodrigues, D. N. Granger// Tissue Barriers.– 2015,– V. 3, № 1-2.– e978720.
3. Role of platelets in neuroinflammation: a wide-angle perspective // L. L. Horstman, Y. S. Ahn, R. Zivadinov et al. // J Neuroinflammation.– 2010.– V. 7, № 10.– P. 2-22.
4. Platelets in the Alzheimer's disease brain: do they play a role in cerebral amyloid angiopathy? / K. M. Kniewallner, D. Ehrlich, A. Kiefer et al. // Curr Neurovasc Res.– 2015.– V. 12, № 1,– P. 4-14.
5. O'Donnell, V.B., Murphy, R.C., Watson, S. P. Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets / V.B. O'Donnell, R. C. Murphy, S. P. Watson / Circ Res.– 2014.– V. 114, № 7.– P. 1185-1203.

PLATELETS AS BLOOD-BRAIN BARRIER (BBB) REGULATORS

Sererbryanaya N.[1-4], Yakutseni P.[5]

[1]FEFU, Vladivostok; [2]NWSMU, SPb; [3]SPbU, SPb; [4]IEM SPb; [5]SPbPU, SPb, Russia

The disturbances of permeability of the blood brain barrier (BBB) are the integral feature of the neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. The damage of BBB changes the usual reaction pattern of microglia to pro-inflammatory, which considerably enhances the initial damage.. We should give particular attention to the activated platelets producing a wide range of modulators as they play a key role in the regulation BBB permeability and neuroinflammation activity.

Keywords: platelets, immunity, T-lymphocytes.

РОЛЬ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА В РАЗВИТИИ ГЕМОЛИЗА ПОСЛЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ПЕРФУЗИИ

Чумакова С. П., Уразова О. И., Новицкий В. В., Шипулин В. М., Воронкова О. В., Серебрякова В. А.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

Проведено исследование активности системы комплемента у кардиохирургических больных с умеренным (40 человек) и выраженным (16 человек) гемолизом до и после коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения (ИК). Показано, что активация системы комплемента при ИК связана с инициацией альтернативного и классического механизмов без участия лектинового пути. Активация системы комплемента во время ИК вызывает умеренный гемолиз и не является ведущей в патогенезе выраженного гемолиза.

Ключевые слова: гемолиз, комплемент, экстракорпоральная перфузия.

Эффективность и широкое применение экстракорпорального кровообращения в медицине (операции на остановленном сердце, методы экстракорпоральной детоксикации и оксиге-

нации) определяют необходимость изучения механизмов постперфузионных осложнений, в патогенезе которых важную роль играют внутрисосудистый гемолиз и активация системы комплемента.

В связи с этим **целью** настоящего исследования стало исследование путей активации системы комплемента у больных ишемической болезнью сердца при умеренном и выраженном гемолизе после операции с искусственным кровообращением (ИК).

Материал и методы исследования. В исследование вошло 56 больных (49 мужчин и 7 женщин) в возрасте от 50 до 69 лет, страдающих ишемической болезнью сердца (ИБС)и перенесших операцию коронарного шунтирования в условиях нормотермии и кристаллоидной кардиоплегии с использованием аппаратов ИК роликового типа («Stokert», Германия) и мембранных оксигенаторов («Quadrox», Швеция). Критериями исключения из исследования считали проведение у пациентов продленного после операции ИК и выполнение сочетанных операций.

Исследования проводили в двух группах пациентов: с умеренным гемолизом (гемоглобинемия менее 40 мг/дл, 40 человек) и с выраженным гемолизом (гемоглобинемия 40 мг/дл и выше, 16 человек) после операции. Концентрация свободного гемоглобина в крови 40 мг/дл выбрана как граница клинически значимого внутрисосудистого гемолиза [1]. Больные двух групп сравнения были сопоставимыми по возрасту (59,42±1,08 лет) и полу (87,5 % мужчины и 12,5 % женщины), функциональному классу стенокардии (2,73±0,08) и продолжительности ИК (118,62±9,84).

В контрольную группу вошли 12 практически здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с группами больных ИБС, не страдающие патологией кардиоваскулярной системы, а также заболеваниями других систем органов в стадии обострения.

Материалом исследования служила апирогенная сыворотка крови (при взятии 3 мл крови в стерильные пробирки). В сыворотке определяли содержание свободного гемоглобина бензидиновым методом [2]; методом иммуноферментного анализа – содержание терминального комплекса комплемента (ТКК, SC 5b67), используя наборы «Human terminal complement complex (TCC) » («HBT», Нидерланды), а также активность классического, лектинового и альтернативного путей активации системы комплемента, применяя тест-системы «Wieslab Complement system Screen» («BCM Diagnostics», США). Активность каждого из трех путей активации комплемента отражает содержание всех факторов, участвующих в его реализации, и указана в% от активности классического пути активации комплемента у здоровых доноров. Все исследования проводили непосредственно до операции и через 1 ч после завершения ИК.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ «Statistica 8.0». Для каждой выборки вычисляли – среднее арифметическое и m – ошибку среднего. Проверку гипотезы о равенстве средневыборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента, критериев Манна-Уитни и Вилкоксона. Различия считали достоверными при уровне значимости $p<0,05$. Для оценки взаимосвязей изучаемых величин вычисляли коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение. Показано, что концентрация свободного гемоглобина в крови у больных ИБС с умеренным и выраженным гемолизом определялась выше контрольных значений как до (11,42±0,96 мг/дл, $p<0,05$), так и после операции, многократно возрастая в этот период (21,08±1,14 мг/дл, $p<0,01$ и 51,83±4,57 мг/дл, $p<0,001$ соответственно) и формируя отличия между группами ($p<0,001$).

Активность классического пути активации системы комплемента у кардиохирургических больных до операции превышала норму независимо от степени выраженности постперфузионного гемолиза (153,41±5,70 % $p<0,01$). После ИК величина данного показателя в обеих группах снижалась до 124,55±5,76 % ($p<0,05$) при умеренном и до 97,15±7,48 % ($p<0,05$) при выраженном гемолизе, что объясняется потреблением факторов классического пути в конце ИК при нейтрализации гепарина протамином сульфата [3].

Активность альтернативного пути комплемента до операции у больных с выраженным гемолизом была снижена (61,73±8,93 %, $p<0,05$) по отношению к значениям другой группы пациентов (76,80±4,21 %). Более высокое содержание ТКК в крови до ИК у больных с выраженным гемолизом (385,66± 40,00×10^{-3} Ед/мл), чем у пациентов с умеренной гемоглобине-

мией (302,12±32,43×10^{-3} Ед/мл, p<0,05) и отрицательная корреляция между уровнем ТКК и активностью альтернативного пути (r= –0,67; p<0,05) на данном этапе позволяет предполагать потребление факторов альтернативного пути комплемента вследствие его гиперактивации. Последняя еще более усиливается во время ИК, детерминируя снижение показателя у больных обеих групп (до 3,81±1,29 %, p<0,001) вследствие контакта крови с чужеродной поверхностью контура [4]. При этом дооперационное истощение его компонентов у больных с выраженным гемолизом, вероятно, обусловливает активацию системы комплемента, в целом сопоставимую по силе с умеренным гемолизом (ТКК после операции 1872,51±358,84 ×10^{-3} Ед/мл, p<0,001), что само по себе не может объяснить выраженную перфузионную травму эритроцитов, которая опосредуется, очевидно, другими механизмами.

Концентрация свободного гемоглобина в крови после операции у больных с умеренным гемолизом положительно коррелировала с уровнем ТКК в крови (r=0,75; p<0,01), демонстрируя ведущую роль системы комплемента в этом процессе. Потенциал лектинового пути активации комплемента у больных ИБС не отличался от нормы независимо от выраженности гемолиза и этапа исследования (46,10±14,09 %).

Выводы.

1. Активация системы комплемента при ИК происходит в большей степени за счет инициации альтернативного пути активации, в меньшей степени в результате индукции классического механизма. Лектиновый путь не задействован в каскадной реакции.

2. Активация системы комплемента во время ИК обусловливает развитие умеренной гемоглобинемии, и не является ведущей в патогенезе выраженного гемолиза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дуткевич И. Г. Тактика экстренной диагностики и лечения гемолитических гемотрансфузионных осложнений / И. Г. Дуткевич // Вестник хирургии им. И. И. Грекова.– 2007.– Т. 166, № 6.– С. 77-80.
2. Перспективы использования в клинической практике бензидинового метода определения свободного гемоглобина в крови / В. И. Козловский, А. В. Акуленок, П. П. Быковский и др. // Вестник ВГМУ.– 2009.– Т. 8, № 3.– С. 1-14.
3. Paparella D., Yau T. M., Youn E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update / D. Paparella, T. M. Yau, E. Youn // Eur. J. of Cardio-Thoracic Surg.– 2002.– V. 21, № 2.– P. 232-244.
4. Одинцов Ю. Н., Перельмутер В. М. Биологические функции комплемента / Ю. Н. Одинцов, В. М. Перельмутер // Бюллетень сибирской медицины.– 2007.– № 2.– С. 72-82.

THE ROLE OF COMPLEMENT SYSTEM IN THE DEVELOPMENT OF HEMOLYSIS AFTER EXTRACORPOREAL PERFUSION

Chumakova S. P., Urazova O. I., Novitskiy V. V., Shipulin V. M., Voronkova O. V., Serebryakova V. A.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

The study of the complement system activity in cardiosurgical patients with moderate (40 patients) and expressed (16 patients) hemolysis before and after coronary artery bypass grafting in conditions of cardiopulmonary bypass (CB) was carried out. It has been shown that activation of the complement system with CB is connected with the initiation of the alternative and classical mechanisms without participation of lectin way. Activation of the complement system during CB causes moderate hemolysis and it is not leading in the pathogenesis of expressed hemolysis.

Keywords: hemolysis, complement, extracorporeal perfusion.

Раздел 2
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ

ВЛИЯНИЕ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ НА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ЛЕЙКОЦИТАМИ У МУЖЧИН И ЖЕНЩИН В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

Гейн С. В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Установлено, что селективные агонисты опиатных рецепторов снижали выраженность микробицидного потенциала преимущественно у доноров мужского пола, при этом в группе 30-39 лет эффект оказывал мю-агонист, а в группе 50-59 лет эффект реализовывался через стимуляцию дельта-рецепторов.

Ключевые слова: лейкоциты, опиоидные пептиды, микробицидность, возраст.

Эндогенные и синтетические опиоидные пептиды являются важными иммунорегуляторными факторами, они реализуют свои эффекты через связывание с опиатными рецепторами. В настоящее время экспрессия трёх основных типов опиатных рецепторов (мю, дельта, каппа) доказана на всех популяциях клеток иммунной системы [1]. Известно, что эффекты, реализуемые при стимуляции различных типов опиатных рецепторов могут носить прямо противоположный характер [2], кроме этого рядом авторов показана независимость влияния β-эндорфина на пролиферативный ответ лимфоцитов от блокады опиатных рецепторов [3].

Нейтрофильные лейкоциты, на долю которых приходится 60-80 % от общего количества лейкоцитов периферической крови, реализуют свой микробицидный потенциал благодаря кислороднезависимым и кислородзависимым механизмам. Ранее нами было показано, что бета-эндорфин угнетал продукцию активных форм кислорода у здоровых мужчин и женщин в возрастных группах 30-39 и 50-59 лет [4].

Цель работы – оценить влияние селективных агонистов μ-, δ-опиатных рецепторов пептидной природы на продукцию активных форм кислорода лейкоцитами периферической крови у мужчин и женщин в возрастных группах 30-39 и 50-59 лет.

Объектом исследования в опытах *in vitro* служили лейкоциты периферической венозной крови, полученной от соматически здоровых людей – добровольцев в возрасте 30-39 лет и 50-59 лет обоих полов. У доноров-женщин забор крови производился в первую фазу овуляторного цикла. Все исследования проводились в соответствии с этическими нормами, с согласия доноров-добровольцев после ознакомления их с условиями и задачами эксперимента.

Оценку кислородзависимой микробицидной активности лейкоцитов осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах («Greiner», Германия), каждая лунка содержала 10^5 клеток в 100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛЗХЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 15 мкг/мл и 150 мкг/мл. Агонист μ-агонист [d-Ala^2, N-Me-Phe^4, Gly^5-ol]-энкефалин (DAGO) использовали в концентрации 10^{-8}М, δ-агонист [d-Ala^2, d-Leu^5] – энкефалин (DADLE) и δ_2-агонист дельторфин II (Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly амид) (DELT) использовали в концентрации 10^{-7}М. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовался люминол (10^{-5}М), свечение которого неизбирательно по отношению к различным кислородсодержащим ради-

калам. Регистрация результатов проводилась в течение часа с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Полученные результаты были обработаны статистически с помощью парного t-критерия Стьюдента.

Установлено, что мю-агонист DAGO угнетал зимозан-индуцированную продукцию АФК у доноров – мужчин 30-39 лет, в то время как DADLE и Deltirphin-2 влияние не оказывали. У женщин 30-39 лет селективные агонисты опиатных рецепторов влияния на продукцию АФК не оказывали. У мужчин 50-59 лет отмечено выраженное угнетающее действие на зимозан-индуцированную продукцию АФК у Deltirphin-2, в то время как у женщин 50-59 лет угнетающее действие на микробицидный потенциал оказывал мю-агонист DAGO в течение короткого промежутка времени с 15 по 25 мин наблюдений. На спонтанную продукцию АФК исследуемые агонисты влияния не оказывали. Таким образом, селективные агонисты снижали выраженность микробицидного потенциала преимущественно у доноров мужского пола, при этом в группе 30-39 лет эффект оказывал мю-агонист, а в группе 50-59 лет – дельта-агонист. У доноров женского пола влияние агонистов было выражено значительно слабее, был зарегистрирован слабый эффект только мю-агониста в группе 50-59 лет. Ранее было показано, что бета- эндорфин, анонист мю-, дельта-рецепторов, угнетал продукцию АФК во всех возрастных группах у доноров обоих полов, лишь несколько снижаясь у мужчин 50-59 лет [4]. Обращает на себя внимание, что все эффекты селективных агонистов имели место в стимулированных культурах, что подтверждает факт повышения экспрессии опитных рецепторов на фоне стимуляции [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharp B. M. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling / B. M. Sharp // Brain Behav. Immun.– 2006.– V. 20.– P. 9-14.
2. Experimental basis for neural-immune interactions / K. S. Madden, D. L. Felten // Physiological Rev.– 1995.– V. 75 (1).– P. 77-106.
3. Гейн С. В., Гилева С. Г. Влияние бета-эндорфина на пролиферативную и фагоцитарную активность клеток периферической крови у мужчин и женщин различных возрастных групп / С. В. Гейн, С. Г. Гилева // Физиология человека.– 2013.– Т. 39, № 3.– С. 96-103.
4. Влияние β-эндорфина на микробицидную активность лейкоцитов у мужчин и женщин различных возрастных групп / С. В. Гейн, С. Г. Гилева, Е. Г. Чижова // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9 (18), № 2 (1).– С. 772-773.
5. Bidlack J. M. Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system / J. M. Bidlack // Clin. Diagnos. Lab. Immunol.– 2000.– V. 7(5).– P. 719-723.

EFFECT OF β-ENDORPHIN ON MICROBICIDAL ACTIVITY OF LEUKOCYTES IN MEN AND WOMEN OF DIFFERENT AGE GROUPS

Gein S. V.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Perm State National Research University, Perm, Russia

It was found that selective agonists of opiate receptors reduces the severity of potential microbicidal predominantly in male donors, while in the group of 30-39 years, the effect exerted mu agonist, and in 50-59 years the effect was realized through stimulation of delta receptor.

Keywords: white blood cells, opioid peptides, reactive oxygen species, age.

ВЛИЯНИЕ МП-5 и МП-6 НА ДИНАМИКУ РЕСПИРОТОРНОГО ВЗРЫВА У ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ ПРИ СТРЕССЕ *IN VIVO*

Гейн С. В.[1,3], Гаврилова Т. В.[1], Черешнева М. В.[2], Кирилина Е. А.[4], Черешнев В. А.[2]

[1]ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь; [2]ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург; [3]ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь; [4]ФГБУН Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Таким образом, миелопептиды МП-5 и МП-6 оказывают модулирующее действие на функции стимулированных зимозаном перитонеальных макрофагов, отменяя стресс-индуцированное угнетение продукции активных форм кислорода.

Ключевые слова: макрофаги, миелопептиды, активные формы кислорода.

Одной из важных проблем современной иммунологии является разработка методов направленной иммунокоррекции при иммунодефицитах и воспалительных процессах различного генеза, направленных на восстановление нарушенных функций иммунитета без развития нежелательных побочных эффектов [1]. К высокоэффективным отечественным иммуномодуляторам, не имеющим зарубежных аналогов, относится миелопид, который представляет собой нативную смесь иммунорегуляторных пептидов костного мозга – миелопептидов (МП) и опиоидных пептидов (эндорфинов и энкефалинов), выделенных из супернатанта культуры клеток костного мозга свиньи, и обладающий выраженным иммунокорригирующим действием. В настоящее время разработчиками препарата выделены и охарактеризованы шесть отдельных миелопептидов, обладающих самостоятельным и более избирательным иммуномодулирующим действием [2]. Наиболее полно в настоящее время охарактеризовано иммуномодулирующее действие первых четырех фракций, МП-1, 2, 3, 4 в системах как *in vitro*, так и *in vivo* [3]. Иммунорегуляторные эффекты МП-5 и МП-6, обладающих дифференцировочной активностью в отношении лейкозных клеток, изучены не достаточно. Имеются некоторые данные по иммуномодулирующей активности МП-5 и МП-6 в отношении пролиферативного ответа лимфоцитов, продукции IL-1бета, бактерицидного потенциала клеток периферической крови в системе *in vitro* [4].

Цель настоящей работы – исследовать влияние миелопептида МП-5 и МП-6 на продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами мыши на фоне иммобилизационного стресса *in vivo*.

Эксперименты в системе *in vivo* выполнены на 24 мышах-самцах породы Swiss, массой 17-22 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, двухразовом питании натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам, при неограниченном доступе к воде. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г). В качестве стрессорного воздействия использовался 2-х часовой иммобилизационный стресс. МП-5 и МП-6 вводили внутрибрюшинно за 30 минут до начала стресса в дозе 40 мкг/кг. Животные были разделены на 4 группы: 1-я – контрольная; 2-я – моделирование стресса; 3-я – моделирование стресса и введение МП-5 или МП-6; 4-я – введение

МП-5 или МП-6. После окончания стресса животных выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. Для получения перитонеальных макрофагов животным внутрибрюшинно вводили 2 мл раствора Хэнкса с добавлением гепарина 20 ед/мл и ЭТС 50 мкл/мл. После вскрытия брюшной полости раствор собирали с помощью автоматического дозатора, подсчет макрофагов производили в камере Горяева. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными клетками производили с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах (Greiner, Германия), каждая лунка содержала клетки в концентрации 2×10^5 клеток/0,2 мл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛЗХЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл, маркером выраженности реакции ЛХЗЛ являлся люминол 10^{-5}М. Регистрация результатов велась в течение часа с интервалом в 5 минут с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Статистический анализ проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и непарного t-критерия Стьюдента.

В результате исследования влияния миелопептидов МП-5, -6 на микробицидную активность клеток врождённого иммунитета на фоне стресса были получены следующие данные. Иммобилизационный стресс не влиял на спонтанную продукцию активных фор кислорода. Миелопептид МП-5 стимулировал спонтанную продукцию активных форм кислорода макрофагами. При анализе стимулированной ЛЗХЛ было установлено, что стресс угнетал продукцию активных форм кислорода на 10, 15, 20 и 25 минуте в зимозан стимулированных культурах, а МП-5 отменял эффект стресса, и показатели ЛЗХЛ в этой группе мышей не отличались от контроля. В группах животных, подвергнутых стрессу на фоне введения МП-6, а также при введении одного МП-6 наблюдалось усиление продукции активных форм кислорода по отношению к стрессу нестимулированными перитонеальными макрофагами с пятой по шестидесятую минуты наблюдений. В стимулированных зимозаном пробах имммобилизационный стресс угнетал продукцию активных форм кислорода по отношению к контролю с 10 по 25 минуты. В группах животных, подвергнутых стессу на фоне МП-6 и при введении одного МП-6 наблюдалось усиление продукции активных форм кислорода по сравнению с группой животных, получавших стресс, с 10 по 60 минуты наблюдения.

Таким образом, миелопептиды МП-5 и МП-6 оказывают модулирующее действие на функции стимулированных зимозаном перитонеальных макрофагов, отменяя стресс-индуцированное угнетение продукции активных форм кислорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайлова А. А. Миелопептиды – новая группа регуляторных пептидов / А. А. Михайлова // Иммунология.– 1999.– № 4.– С. 14-17.
2. Миелопептиды / Р. В. Петров, А. А. Михайлова, Л. А. Фонина и др. // М.: Наука, 2000.– 181 с.
3. Костномозговые иммунорегуляторы миелопептиды / Р. В. Петров, А. А. Михайлова, Л. А. Фонина // Российский химический журнал.– 2005.– Т. XLIX, № 1.– С. 55-63
4. Влияние миелопептидов на пролиферацию лимфоцитов и продукцию IL-1β и TNFα мононуклеарами, моноцитами и нейтрофилами / С. В. Гейн, Т. В. Гаврилова, В. А. Черешнев и др. // Цитокины и воспаление.– 2008.– Т. 7, № 1.– С. 24-28.

EFFECT OF MP-5 AND MP-6 ON RESPIRATORY BOOST BY MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES UNDER STRESS *IN VIVO*

Gein S. V.[1,3], Gavrilova T. V.[1], Chereshneva M. V.[2], Kirilina E. A.[4], Chereshnev V. A.[2]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch of RAS, Perm;
[2]Institute of Immunology and physiology Ural Branch of RAS, Yekaterinburg;
[3]Perm State National Research University, Perm; [4]Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

Thus, myelopeptides MP-5 and MP-6 have a stimulating effect on the function of zymosan-stimulated peritoneal macrophages, abolished stress-induced inhibition of the production of reactive oxygen species.

Keywords: macrophages, myelopeptides, reactive oxygen species.

СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА ФОНЕ ПОВЫШЕННЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ГАПТОГЛОБИНА В КРОВИ

Самодова А. В., Добродеева Л. К., Патракеева В. П., Ставинская О. А.

ФГБУН Институт физиологии природных адаптаций Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия

В работе изучено влияние транспортного белка гаптоглобина (Hp) на состояние иммунной системы и концентрацию сывороточных медиаторов иммунных реакций. Установлено, что увеличение концентрации Hp ассоциировано с активизацией Т-клеточного звена преимущественно за счет Т-клеток с рецептором к трансферрину, клеточно-опосредованных и антителозависимых реакций, с увеличением концентрации свободного L-селектина, гликопротеина РЭА, IgE, ЦИК IgA и без изменения содержания в сыворотке крови пула свободных кластеров дифференциации и апоптоза sApo-1/Fas и sFasL.

Ключевые слова: внеклеточный пул рецепторов, гаптоглобин, цитокины, иммуноглобулины, Т- и В-лимфоциты.

Внеклеточный пул сыворотки крови включает цитокины, хемокины, иммуноглобулины, которые переносятся транспортными белками и чаще состоят в комплексе с ними. Образующиеся комплексы способны к диссоциации и освобождению активных компонентов с сохранением специфических свойств и функциональной активности. Гаптоглобин (Hp) обладает не только гемоглобин связывающей способностью, но и взаимодействует с кластерами дифференциации, в том числе с CD 163, экспрессия которого зависит от IL-10. Кроме того, тяжело дисперсный комплекс гемоглобин-гаптоглобин не проходит через почечный фильтр, а поглощается клетками ретикулоэндотелиальной системы, сохраняя железо гемоглобина в организме. Элиминация излишков связанных биологически активных вещество обеспечивается фагоцитами; дефицит фагоцитарной защиты приводит к увеличению концентраций циркулирующих комплексов, в том числе с Ig в их составе [1, 2]. Известно также, что Hp может быть лигандом CD 22 [3]. Казалось бы, взаимосвязь активности Hp и иммунных реакций очевидна, но совершенно неизученными остаются вопросы влияния внеклеточного пула рецепторов и транспортных белков крови на функциональную активность иммунной системы.

Цель работы – изучить участие гаптоглобина в формировании внеклеточного пула рецепторов и сохранении иммунного гомеостаза.

Материал и методы. Проведено иммунологическое обследование 91 жителя поселка Ревда Мурманской области, 77 женщин и 14 мужчин, в возрасте от 21 до 55 лет. Содержание общего гаптоглобина определяли в крови иммуноферментным методом реактивами «Bender Medsystems» (Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Evolis» фирмы «Bio-RAD» (Германия). Комплекс исследований включал изучение содержания в крови фенотипов лимфоцитов (CD 3^+, CD 4^+, CD 8^+, CD 10^+, CD 16^+, CD 19^+, CD 23^+, CD 25^+, CD $45RA^+$, CD 56^+, CD $62L^+$, CD 71^+, CD 95^+, HLA DR^+) в непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител («Сорбент», г. Москва). Содержание IgA, IgM, IgG, IgE, цитокинов IL-2, IL-6, IFN-γ, трансферрина, свободного рецептора трансферрина sCD 71 (sTfR), свободного белка клеточной адгезии sCD 324 (E-кадгерин, E-Cad), свободного лиганда селектина sL-селектина, белка апоптоза sApo-1/Fas и свободного лиганда к Fas sFasL в сыворотке крови изучали методом иммуноферментного анализа. Реакции оценивали с помощью фотометра Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) и автоматическо-

го иммуноферментного анализатора «Evolis» фирмы «Bio-RAD» (Германия). Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов определяли методом преципитации с использованием различных концентраций ПЭГ-6000 (3,5, 4 % и 7,5 %).

Основные результаты. Содержание Hp в крови колебалось в очень широких пределах (20-4980 мг/л), в среднем составило 2471,14± 134,23 мг/л, частота регистрации повышенных концентраций (более 2000 мг/л) выявлена у 63,29 % обследуемых лиц. В связи с широкими пределами колебаний содержания Hp анализ полученных результатов обследования проведен в двух группах с содержанием Hp до 1000 мг/л (n=17) и более 3500 мг/л (n=19).

Увеличение концентрации Hp ассоциировано с активизацией Т-клеточного звена преимущественно за счет клеток с рецептором к трансферрину (0,50 (0,33; 0,83) и 0,31 (0,16; 0,49) $\times 10^9$ кл/л; p<0,001); при этом содержание sCD 71 в сыворотке крови не увеличивалось. Тем самым, мы подтверждаем высказанное ранее положение о том, что шеддинг производится преимущественно дифференцированными иммунокомпетентными клетками [2].

Увеличению Hp сопутствует повышение содержания Th (0,36 (0,25; 0,53) и 0,55 (0,35; 1,04) $\times 10^9$ кл/л; p<0,01), CD 8^+ (0,33 (0,29; 0,42) и 0,62 (0,31; 0,89) $\times 10^9$ кл/л, p<0,001) и CD 19^+ (0,47 (0,35; 0,77) и 0,67 (0,28; 0,82) $\times 10^9$ кл/л, p<0,01). Взаимодействие Hp с антителообразующими клетками может быть объяснено его способностью выступать в качестве лиганда для кластера дифференциации антителообразующих клеток [3].

Hp относится к α-2-глобулинам, повышение его содержания является признаком воспаления, деструкции соединительной ткани и маркером лизиса эритроцитов. Воспалительная реакция, в т.ч. превентивного воспаления, и последующее развитие иммунного ответа всегда обусловливают повышение концентрации свободных рецепторов, лигандов, ЦИК и Ig [1]. Однако при высоких концентрациях Hp нами не установлено повышения содержания трансферрина, sCD 71, sAPO-1/Fas и sFasL, обычно сопровождающего развитие иммунной реакции, в то время как концентрации IgE, ЦИК IgA, sL-селектина и РЭА повышаются в 1,5-2 раза. Можно предположить, что Hp связывает трансферрин, свободный рецептор к трансферрину, белок апоптоза и свободный лиганд апоптоза. Для этого предположения достаточно оснований: Hp, трансферрин и его рецептор связывают железо; рецептор Fas и лиганд к нему объединены участием TNF в процессах апоптоза и некроза. В более ранних работах нами доказано, что между содержанием TNF, уровнем антител к фосфатидилсерину, а также IgE, которые обладают повышенной цитофильностью, прослеживаются прямые корреляционные взаимосвязи [4]. Таким образом, несмотря на косвенные доказательства взаимосвязи Hp с трансферрином, sAPO-1/Fas, sFasL и IgE, есть некоторые основания признать данную вероятность вполне возможной.

Следующей особенностью иммунного статуса на фоне повышенного содержания Hp является резкое снижение содержания IL-10 (8,70 (5,10; 13,50) и 4,80 (4,20; 5,90) пг/мл; p<0,001). Основными продуцентами IL-10 являются моноциты и макрофаги II типа, которые в отличие от макрофагов I типа плохо фагоцитируют. Концентрация моноцитов в крови при повышенных уровнях содержания Hp значительно выше, поэтому нет оснований считать, что снижение уровня содержания IL-10 обусловлено подавлением активности моноцитарной системы. Известно, что Hp связывается со свободным гемоглобином, в результате чего образуется трудно диссоциирующий комплекс гаптоглобин-гемоглобин, который удаляется из кровотока путем связывания с мембранным рецептором CD 163 моноцита, экспрессия CD 163 регулируется IL-10 [5]. Таким образом, в данной ситуации повышение содержания Hp обеспечивается низким содержанием IL-10, необходимым для экспрессии CD 163. Заметное повышение концентрации моноцитов на фоне высоких уровней содержания Hp возможно является реакций по типу обратной взаимосвязи.

Итак, гаптоглобин оказывает влияние на состояние иммунной системы путем снижения концентрации естественного иммунодепрессанта IL-10, повышения содержания активированных форм Т-клеток, Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов, а также антителообразующих клеток, IgE, IgA и ЦИК. Увеличения концентраций свободных кластеров дифференциации sCD 71, sCD 324, sAPO-1/Fas и sFasL, обычно сопровождающих иммунную реакцию [1], на фоне повышенного содержания Hp не регистрируется, что возможно, объ-

ясняется уникальной абсорбционной способностью данного транспортного белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Самодова А. В. Содержание внеклеточного пула рецепторов у жителей Ненецкого автономного округа /А.В. Самодова, О. А. Ставинская // Вестник Уральской медицинской академической науки – 2014.– № 2.– С. 152-155.
2. Добродеева Л. К., Самодова А. В., Карякина О. Е. Взаимосвязи в системе иммунитета / Л. К. Добродеева, А. В. Самодова, О. Е. Карякина // Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. 200 с.
3. Distribution of lymphocyte subsets in bone marrow and peripheral blood is associated with haptoglobin type. Binding of haptoglobin to the B-cell lectin CD 22 / M. Langlois, J. Delanghe, J. Philippe et al. // Eur.J.Clin. Chem. Clin. Biochem.– 1997.– V. 35.– P. 199-205.
4. Добродеева Л. К. Иммуно-метаболические корреляции при ИБС /Л. К. Добродеева, О. А. Миролюбова, Л. В. Сенькова // Сб. Тр. 4-го конгресса РААКИ. М. 2001.– С. 108.
5. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin / J. Guetta, M. Strauss, N. S. Levy et al. // Atherosclerosis.– 2007.– V. 191.– P. 48-53.

THE IMMUNE SYSTEM AGAINST THE RAISED HAPTOGLOBIN CONCENTRATION IN BLOOD

Samodova A. V., Dobrodeeva L. K., Patrakeeva V. P., Stavinskaya O. A.

Federal State Institution of Science Institute of Environmental Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia

We investigated the influence of transport protein haptoglobin (Hp) on the immune system and the concentration of serum mediators of immune responses. It is established that increasing the concentration of Hp is associated with the activation of T-cell-mediated mainly by T cells with a receptor to transferrin, cell-mediated and antibody-dependent reactions, with the increase in the concentration of free L-selectin, glycoprotein CEA, IgE, IgA and CEC without altering the content in the serum pool of available clusters of differentiation and apoptosis sApo-1/Fas and sFasL.

Keywords: extracellular pool of receptors, haptoglobin, cytokines, immunoglobulins, T- and B-lymphocytes.

ЛАКТОФЕРРИН ЧЕЛОВЕКА МОДУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА РЕЦЕПТОРА TLR 4 В СЕЛЕЗЕНКЕ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕССА

Алешина Г. М., Янкелевич И. А., Кокряков В. Н.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Исследовано действие лактоферрина человека на стресс-индуцированные изменения уровня экспрессии гена рецептора TLR 4 в клетках селезенки крысы. Использована модель комбинированного стресса – плавание в холодной воде (1°–4 °С) в течение 2 мин. Уровень экспрессии гена TLR 4 определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Установлено, что превентивное внутрибрюшинное введение лактоферрина без дополнительного стрессирующего воздействия повышает экспрессию гена TLR 4 в клетках селезенки на 40 % через три часа после введения, и в то же время снижает до контрольного уровня 4-х кратное увеличение экспрессии, вызванное комбинированным стрессом. Полученные результаты позволяют сделать вывод об адаптогенном действии лактоферрина на организм при экспериментальном стрессе у крыс.

Ключевые слова: лактоферрин, стресс, врожденный иммунитет.

Одной из самых распространенных причин, вызывающих изменения иммунного ответа, являются стрессирующие воздействия, которые приводят к перераспределительным реакциям лейкоцитов крови, изменению гормонального уровня и продукции цитокинов. Несмотря на то, что нейтрофилез является одним из классических проявлений стресс-реакции, биологический смысл этого явления остается до конца не ясным. Поиски ведутся преимущественно в направлении изучения стресс-индуцированных изменений функциональной активности этих клеток. В то же время можно предположить, что те антимикробные белки, которые секретируются из нейтрофилов, в частности, лактоферрин, обладают не только антибиотическим действием, но и в соответствии с принципами регуляции физиологических реакций могут оказывать влияние на развитие стресс-реакции и иммунного ответа.

Паттерн-распознающие рецепторы традиционно рассматриваются как звенья рекогносцировочной системы противоинфекционной защиты. Однако последние данные о том, что лигандами паттерн-распознающих рецепторов могут являться нейтрофильные белки и пептиды заставляют взглянуть на этот вопрос по-новому [1]. В связи с этим изучение динамики экспрессии гена паттерн-распознающего рецептора TLR 4 и влияния на этот процесс белков нейтрофилов является важным аспектом оценки реализации стресс-реакции. Мы исследовали влияние введения лактоферрина на стресс-индуцированные изменения экспрессии гена TLR 4 в селезенке крыс.

Эксперименты выполнены на крысах-самцах гетерозиготного штамма линии «Wistar» массой 150-200 г.

Использовался лактоферрин (ЛФ) молока человека, чистота не менее 98 %, насыщенность железом – 10-15 %. В качестве белкового контроля сравнения использовали овальбумин (ОА). Для удаления примесей ЛПС белки инкубировали с полимиксин-агарозой (“Sigma”, США), контроль осуществляли с помощью Лимулюс теста (Lonza Walkersvile, США).

В качестве экспериментальной модели стресса использовали комбинированный эмоционально-физический стресс – плавание в холодной воде (1°-4 °С) в течение двух минут. Белки разводили в воде для инъекций и вводили животным внутрибрюшинно непосредственно перед стрессирующим воздействием в объеме 500 мкл в концентрации 200 мкг/кг веса животного.

Экспрессию генов в клетках селезенки оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Последовательности праймеров 5′-3′: TLR-4 sense – cctgaagatcttaagaagctat; TLR-4 antisense – ccttgtcttcaattgtctcaat.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Достоверность различий между группами оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа по post-hoc t-критериям по методу Бонферрони.

Результатом проведенного исследования стало установление факта 4-х кратного повышения экспрессии гена рецептора TLR 4 на сроке 3 часа после аппликации стресса по сравнению с контролем, что хорошо согласуется с литературными данными, показывающими, что такой вид стрессирующего воздействия как физические упражнения на выносливость также вызывает увеличение экспрессии гена рецептора TLR 4 в нейтрофильных гранулоцитах на сроке 3 часа после стресса [2]. Авторы связывают это явление с увеличением в плазме крови миоглобина, как алармина (сигнальной молекулы тревоги), указывающего на процесс повреждения мышц.

Учитывая многообразие механизмов регуляции врожденного иммунитета, связанных с системой паттерн-распознающих рецепторов и недостаточность их изученности, роль установленного факта повышения экспрессии гена паттерн-распознающего рецептора TLR 4 спленоцитов крыс в реализации стресс-реакции пока до конца не ясна. В то же время показано, что кортикотропин-рилизинг фактор является необходимым компонентом, усиливающим экспрессию гена TLR 4 в макрофагах [3]. Это указывает на наличие взаимосвязи между уровнем стрессорных гормонов и степенью мобилизации молекулярных факторов врожденного иммунитета.

В нашей работе установлено, что введение ЛФ человека, но не ОА, индуцировало повышение экспрессии гена TLR 4 на 40 % по сравнению с контролем через 3 часа после введения. Можно предположить, что появление в плазме крови повышенной концентрации нейтрофильных компонентов является сигналом, имитирующим отдельные стороны стрессорного воздействия и тем самым вызывающим индукцию экспрессии гена TLR 4. В то

же время показано, введение ЛФ достоверно снижало стресс-индуцированное повышение экспрессии гена TLR4 в спленоцитах крыс, наблюдаемое через 3 часа после аппликации стресса, в то время как ОА не оказывал подобного эффекта.

Механизмы такого иммуномодулирующего действия ЛФ пока не ясны. Это могут быть центральные механизмы, реализуемые благодаря способности ЛФ аккумулироваться в структурах мозга, таких как гиппокамп [4], так и периферические, обусловленные взаимодействием с различными сайтами связывания на иммунных клетках [5].

Полученные результаты указывают на то, что молекулярные механизмы системы врожденного иммунитета, мобилизующиеся в первые минуты и часы воздействия на организм неблагоприятных факторов, вовлечены не только в противоинфекционую защиту, но и в более широкий круг адаптивных механизмов, в которых антимикробные белки могут выполнять функцию эндогенных иммуномодуляторов и адаптогенов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-06471а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Piccinini, A.M. DAMPening inflammation by modulating TLR signaling / A. M. Piccinini // Mediators of Inflammation.– 2010.– V. 2010.– P. 1-22.
2. Transcriptome analysis of neutrophils after endurance exercise reveals novel signaling mechanisms in the immune response to physiological stress / O. Neubauer, S. Sabapathy, R. Lazarus et al. // J Appl Physiol.– 2013.– V.114.– P. 1677-1688.
3. Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1 / C. Tsatsanis, A. Androulidaki, T. Alissafi et al. // J Immunol.– 2006.– V. 176, No 3.– P. 1869-1877.
4. Lactoferrin-modified PEG-co-PCL nanoparticles for enhanced brain delivery of NAP peptide following intranasal administration / Z. Liu, M. Jiang, T. Kang et al. // Biomaterials.– 2013.– V. 34, No 15.– P. 3870-3881.
5. Legrand, D. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes / D. Legrand // Biochem Cell Biol.– 2012.– V. 90, No 3.– P. 252-268.

HUMAN LACTOFERRIN MODULATES THE TLR4 GENE EXPRESSION IN THE RAT SPLEEN UNDER EXPERIMENTAL STRESS

Aleshina G. M., Yankelevich I. A., Kokryakov V. N.

Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

The effect of human lactoferrin on the stress-induced alterations of the TLR4 gene expression in rat spleen has been studied. The model of acute stress – swimming in cold water (1° –4 °C) for 2 minutes has been used. The intensity of mRNA expression of TLR4 in rat splenocytes has been evaluated using real-time RT-PCR. It has been established that preventive intraperitoneal administration of lactoferrin without additional stress exposure increased the expression of TLR4 gene in spleen cells of 40 % three hours after the administration, and at the same time lactoferrin reduced the 4-fold stress-induced increase in TLR4 gene expression to the reference level. The results suggest the adaptogenic effect of lactoferrin on the organism during the development of the stress response.

Key words: lactoferrin, stress, innate immunity.

РОЛЬ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ BREG

Орлова Е. Г., Логинова О. А., Ширшев С. В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Исследованы эффекты гормонов лептина и грелина в концентрациях, сопоставимых с их уровенем в периферической крови при беременности, на экспрессию молекул, отражающих функции Breg. Установлено, что грелин в концентрации I-II триместра беременности усиливает экспрессию FOXP3 CD 19^{+}CD 25^{high}-клетками, а комбинация лептина и грелина увеличивает количество CD 19^{+}CD 25^{high}IL-10^{+}-лимфоцитов. Лептин усиливает, а грелин угнетает экспрессию PD-L1 на CD 19^{+}CD 25^{high}-лимфоцитах. Таким образом, можно полагать, что исследуемые гормоны будут способствовать формированию Breg, что раскрывает новый механизм участия гормонов в формировании периферической толерантности в аспекте беременности.

Ключевые слова: CD 19^{+}CD 25^{high}-лимфоциты, В-регуляторные лимфоциты (Breg), лептин, грелин, беременность.

Лептин и грелин – пептидные гормоны, разнонаправленно регулирующие метаболизм жировой ткани, энергетический гомеостаз и пищевое поведение человека [1]. Данные гормоны принимают активное участие на всех этапах гестации, а также обладают выраженными иммунорегуляторными свойствами [1]. Лептин является провоспалительным гормоном, а грелин, напротив, оказывает противовоспалительные эффекты [2]. Беременность характеризуется состоянием толерантности иммунной системы к генетически чужеродному плоду [3]. Уровень лептина и грелина при беременности нарастает и меняется по триместрам, поскольку оба гормона вырабатываются плацентой [2, 4]. Нарушение жирового и энергетического обмена приводят к срыву иммунной толерантности [3], что подразумевает важную роль лептина и грелина в контроле функций клеток иммунной системы.

В недавних исследованиях показано, что регуляторная субпопуляция В-лимфоцитов (Breg), модулируя созревание дендритных клеток и формирование адаптивных регуляторных Т-лимфоцитов (aTreg), играет важнейшую роль в формировании иммунной толерантности [5]. В-лимфоциты экспрессируют рецепторы к лептину и грелину [1, 5], но лишь в единичных работах описаны модулирующие эффекты лептина на функции В-лимфоцитов [5].

Поэтому **цель работы** – исследовать участие лептина и грелина в концентрациях, сопоставимых с содержанием гормонов в периферической крови по триместрам беременности, в контроле экспрессии молекул Breg, отражающих их регуляторную функцию.

Материалы и методы. Объектами исследования являются CD 19^{+}CD 25^{high}-лимфоциты, полученные из периферической крови условно здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. CD 19^{+}CD 25^{high}-клетки выделяли методом иммуномагнитной сепарации (MagCellect Human B Cell Isolation Kit, CD 25^{+} Isolation Kit «R&D», США), затем инкубировали в ППС (среда RPMI-1640, содержащая 10 % ЭТС, 1 мМ буфера HEPES, 2 мМ L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина) с гормонами 72 ч при 37°С в условиях 5 % CO_2. Грелин («Sigma», Израиль) вносили в концентрациях 1,25 нг/мл и 0,83 нг/мл, сопоставимых с уровнем гормона в I-II и III триместрах беременности, соответственно [4]. Лептин («Sigma», Израиль) добавляли в концентрации 35 нг/мл, отражающей его уровень в периферической крови в II-III триместрах беременности [2]. Для исследования совместных эффектов гормонов, лептин и грелин в культуры вносили одномоментно в сочетаниях, соответствующих их содержанию в периферической крови во II-III (лептин 35 нг/мл + гре-

лин 1,25 нг/мл) триместрах беременности. По окончании инкубации оценивали количество Breg как процент CD 19^{+}CD 25^{high}-лимфоцитов (CD 19, clone CatNFAB 486F, «R&D», США; CD 25, clone BC 96, «eBioscience», США), экспрессирующих IL-10 (IL-10, clone JES 3-9D 7, «eBioscience», США), либо транскрипционный фактор FOXP3 (FoxP3, clone 236A/E7, «BD Pharmingen™», США) [5]. На Breg определяли экспрессию CD 86 (CD 86 (B 7-2), clone IT2.2, «eBioscience», США), выполняющего роль костимулирующей молекулы в реализации антигенпрезентирующей функции Breg [5] и PD-L1 (CD 274 (B 7-H1), clone MIH1, «eBioscience», США), отражающей супрессорные функции Breg [5]. Результаты выражали в виде средней арифметической и ее среднего отклонения (M±m). Достоверность различий между группами оценивали по критерию Вилкоксона для парных зависимых выборок. Различия считались статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Установлено, грелин в концентрации I-II триместра беременности повышает число CD 19^{+}CD 25^{high}-клеток, экспрессирующих FOXP3 (таблица). Тогда как, лептин и комбинация лептина с грелином не влияют на количество CD 19^{+}CD 25^{high}FOXP3^{+}-лимфоцитов. Действуя самостоятельно, гормоны не оказывают эффекта на экспрессию IL-10 CD 19^{+}CD 25^{high}-лимфоцитами, а комбинация гормонов увеличивает число CD 19^{+} CD 25^{high}IL-10^{+}-лимфоцитов. Следует отметить, что экспрессия IL-10 и FOXP3 отражает иммуносупрессорную функцию Breg. IL-10 является основным активатором формирования супрессоров иммунного ответа – aTreg периферической крови, а FOXP3 способствует усилению экспрессии CTLA-4 на Treg [5]. Исследуемые гормоны не влияют экспрессию CD 86 на CD 19^{+}CD 25^{high}-клетках, и разнонаправленно регулируют присутствие молекулы PD-L1. Лептин в концентрации II-III триместра беременности усиливает, а грелин в концентрации I-II триместра угнетает экспрессию PD-L1 на CD 19^{+}CD 25^{high}-лимфоцитах. Комбинация гормонов не оказывает влияния на количество CD 19^{+}CD 25^{high}PD-L1^{+}-лимфоцитов. Экспрессия молекул PD-L1,2 характеризует супрессорные свойства Breg, т.к. взаимодействие PD-L1,2 с лигандами на CD 4^{+} Т-лимфоцитах угнетает их пролиферацию, индуцирует апоптоз и способствует трансформации в Treg [5].

Выводы. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые гормоны, действуя как самостоятельно, так и в комбинации, способствуют формированию Breg и регулируют их супрессорные свойства, что раскрывает новый механизм участия лептина и грелина в формировании иммунной толерантности в аспекте беременности.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-05670

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tena-Sempere M. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function / M. Tena-Sempere. // Neuroendocrinology.– 2007, V.86,– P. 229-241.
2. Hardie L., Trayhurn P. Circulating leptin in women: longitudinal study in menstrual cycle and during pregnancy / L. Hardie, P. Trayhurn // Clin. Endocrinol.– 1997.– V.47.– P. 101-106.
3. Ширшев С. В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий / С. В. Ширшев // УрО РАН.– Екатеринбург.– 2009.– 582 с.
4. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy / J. Fuglsang, C. Skjaerbaek, U. Espelund et al. // Clin. Endocrinol.– 2005.– V. 62.– P. 554-559.
5. Human CD 19(+)CD 25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD 4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells / A. Kessel, T. Haj, R. Peri et al. // J. Autoimmun. Rev.– 2012.– V. 11.– P. 670-677.

Таблица. Влияние лептина и грелина на экспрессию молекул на CD 19^{+}CD 25^{high}-лимфоцитах (n=6).

Экспериментальное воздействие	IL-10+,%	FOXP3+,%	PD-L1+,%	CD 86+,%
Контроль	1,82±0,86	49,5±3,3	6,50±2,00	3,60±1,43
Лептин 35 нг/мл	2,95±1,44	57,1±5,2	7,85±2,17*	3,12±1,20
Лептин 35 нг/мл + Грелин 1,25 нг/мл	3,56±1,07*	55,1±3,6	6,96±3,01	3,68±1,19
Грелин 1,25нг/мл	2,46±0,89	54,5±2,3*	5,43±1,57*	3,64±1,10
Грелин 0,83 нг/мл	2,66±1,24	41,5±1,2	7,40±2,61	4,03±1,52

Примечание: * – p<0,05 по критерию Вилкоксона.

ROLE OF LEPTIN AND GHRELIN IN REGULATION OF BREG FUNCTIONS

Orlova E. G., Loginova O. A., Shirshev S. V.

Institute of ecology and genetics of microorganisms, Ural Branch of RAS, Perm, Russia

The effects of leptin and ghrelin hormones at concentrations that reflect their level in the peripheral blood during pregnancy, on the expression of molecules that reflect Breg functions were studied. It was found that I-II trimester ghrelin concentration increase the expression of FOXP3 on CD 19^{+}CD 25^{high}-cells, and the combination of leptin and ghrelin increased the number of CD 19^{+}CD 25^{high} IL-10^{+}- lymphocytes. Leptin strengthened and ghrelin inhibited PD-L1 expression on CD 19^{+}CD 25^{high}-lymphocytes. Thus, it can be assumed that these hormones would promote the formation of Breg that reveals a new mechanism of hormones' participation in the formation of peripheral tolerance in the context of pregnancy.

Keywords: CD 19^{+}CD 25^{high}-lymphocytes, Breg, leptin, ghrelin, pregnancy.

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА МАКРОФАГОВ НА СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В УСЛОВИЯХ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА

Гетте И. Ф., Данилова И. Г.

ФГАОУ ВПО Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

При моделировании аллоксанового сахарного диабета у крыс обнаружено увеличение количества лимфоцитов периферической крови и содержания в них ДНК, вероятно, в качестве компенсации отсутствия накопления РНК. Действие иммуномодулятора макрофагов 3-аминофталгидразида сопровождалось нормализацией уровня лимфоцитов и ДНК, а также характерных для сахарного диабета показателей.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, лимфоциты, иммуномодуляция.

Применение модуляторов активности макрофагов является перспективным направлением стимуляции регенерации различных тканей у больных сахарным диабетом 1 типа (СД1), поскольку макрофаги играют ключевую роль как в координации аутоиммунных реакций в отношении инсулиноцитов, так и в регуляции восстановительного роста различных тканей [1, 2]. В ранее проведенных экспериментах при моделировании СД1 была показана эффективность иммуномодулятора 3-аминофталгидразида (3-АМФ), которая проявлялась в коррекции деструктивных изменений различных органов [1, 2] и в уменьшении количества лимфоцитов периферической крови, но не в нормализации фракций гистоновых белков лимфоцитов [3]. Известно, что 3-АМФ обладает свойством антиоксиданта и способствует уменьшению выделения провоспалительных факторов макрофагами [1], что должно сопровождаться, в свою очередь, изменением регуляции деятельности лимфоцитов. Однако остается открытым вопрос, возможна ли коррекция измененного в условиях СД1 содержания нуклеиновых кислот в лимфоцитах крови посредством модуляции активности макрофагов, поскольку эти показатели могут определять как недостаточную

резистентность к инфекционным заболеваниям, так и избыточную экспрессию провоспалительных факторов.

Цель исследования. Определить содержание РНК и ДНК в лимфоцитах периферической крови крыс с аллоксановым диабетом и при модуляции активности макрофагов на фоне аллоксанового диабета.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 30 беспородных крысах-самцах массой 200-220 г в соответствии с рекомендациями международных этических комитетов (Директива Совета ЕС 2010/63/EU). Животные были разделены на 3 группы по 10 крыс в каждой группе: 1 – интактные животные; 2 – аллоксановый диабет – модель СД1 по авторской методике [1]; 3 – СД1 и введение 3-АМФ.

В крови определяли содержание глюкозы и гликозилированного гемоглобина (HbA1c) с использованием наборов реактивов соответственно Витал-диагностикс (С-Пб) и «Диабет-тест» ФОСФОСОРБ и спектрофотометра СФ-56; содержание инсулина (Elisa, UK) на анализаторе Adaltis (Италия). Анализ периферической крови проводили на гематологическом анализаторе Celly 70 Biocode Hycel. В лимфоцитах, после их выделения из крови центрифугированием в смеси фиколл-верографин, определяли содержание РНК и ДНК методом Маркушевой Л. И. и соавторов, 2000 г [4]. Статистический анализ проводили с помощью программ Statistica 6.0 (Stat.Soft.Inc.), Microsoft Exel 2003 и непараметрического критерия Манна-Уитни. При проверке статистических гипотез учитывали уровень значимости 5 % ($P < 0,05$).

Результаты. Через 60 суток после введения аллоксана в количестве 30 мг/100 г массы тела крыс наблюдали повышение уровня глюкозы и HbA1C и уменьшение содержания инсулина в крови (соответственно с 5,9±0,2 ммоль/л до 26,4±2,3 ммоль/л; с 3,8±0,2 % до 9,3±0,4 %; с 1,22±0,21 мкг/л до 0,46±0,08 мкг/л), что соответствовало декомпенсированной форме СД1. В третьей группе крыс после действия аллоксана и 3-АМФ (введение иммуномодулятора по схеме в течение 30 суток) содержание глюкозы уменьшалось до 16,0±2,5 ммоль/л и нормализовалось количество HbA1C и инсулина (соответственно до 4,1 % и 2,52±0,60 мкг/л) относительно показателей 2 группы. Во 2 группе крыс по сравнению с контролем было отмечено увеличение общего количества лейкоцитов (с 13,2±0,7 тыс./мкл до 24,3±0,7 тыс./мкл) и фракции лимфоцитов (с 10,5±0,6 тыс./мкл до 18,3±2,0 тыс./мкл) с последующим снижением этих показателей у леченных животных относительно показателей 2 группы (соответственно до 10,7±0,8 тыс./мкл и 7,4±0,5 тыс./мкл).

Содержание РНК в лимфоцитах, при подсчете в мкг/миллион клеток, достоверно не отличалось у крыс 2 и 3 экспериментальных групп (0,195±0,019 и 0,195±0,037) от показателя интактных животных (0,155±0,012). Однако почти двукратное увеличение фракции лимфоцитов у крыс СД1 свидетельствует о возрастании количества РНК всех лимфоцитов в этой группе почти в два раза относительно контроля, что может быть связано с повышенной экспрессией генов, предположительно генов провоспалительных факторов, так как моделирование СД1 согласно предыдущим исследованиям сопровождалось деструктивными процессами в различных тканях [1, 2]. Следовательно, усиление провоспалительной деятельности лимфоцитов, вероятно, связано с увеличением количества этих клеток, а не уровня РНК в отдельной клетке.

Содержание ДНК относительно одного миллиона клеток у крыс с аллоксановым диабетом (0,281±0,033 мкг/млн) было увеличено почти в 2 раза по сравнению с показателем интактных крыс (0,127±0,007 мкг/млн), что соответствует увеличению количества ДНК не только в каждой отдельной клетке, но и во всех лимфоцитах, так как количество этих клеток увеличилось. Согласно данным литературы полиплоидизация лимфоцитов периферической крови может происходить в качестве компенсаторной реакции на различные повреждения [5]. В 3 группе после применения 3-АМФ количество ДНК снизилось относительно показателя нелеченных животных почти до уровня контроля (0,158±0,005 мкг/млн).

Выводы. Таким образом, при аллоксановом сахарном диабете установлено увеличение суммарного количества РНК всех лимфоцитов за счет возрастания количества этих клеток при неизменном содержании РНК в каждой клетке и компенсаторное накопление ДНК в лимфоцитах. Модуляция активности макрофагов посредством введения 3-АМФ сопровождается снижением общего количества лейкоцитов, лимфоцитов и содержания ДНК в лимфоцитах, уменьшением проявления воспалительного процесса и нормализа-

цией характерных для сахарного диабета показателей.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ, № проекта 16-15-00039.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Macrophages as the Stimulators of B-cells Proliferation in the Pancreas / I. Danilova, T. Bulavintseva, I. Gette et al. // FASEB J.– 2015.– V. 29.
2. Morphological restructuring of myocardium during the early phase of experimental diabetes mellitus / I. G. Danilova, P. A. Sarapultsev, S. U. Medvedeva et al. // Anat Rec (Hoboken).– 2015.– V. 298(2).– P. 396-407.
3. Гетте И. Ф. Содержание гистоновых белков в лимфоцитах крыс с аллоксановым диабетом в условиях модулирования активности макрофагов / И. Ф. Гетте // Вестник Уральской медицинской академической науки.– 2014.– № 3(49).– С. 19-20.
4. Ядерные белки хроматина в оценке эффективности лечения больных псориазом / Л. И. Маркушева, М. И. Савина, В. М. Решина и др. // Клиническая лабораторная диагностика.– 2000.– № 7.– С. 18-20.
5. Особенности содержания гиподиплоидных и гиперплоидных лимфоцитов у новорожденных детей различного гестационного возраста с клинической картиной срыва адаптации в раннем неонатальном периоде / Д. И. Шегурова, В. В. Софронов, И. Г. Мустафин и др. // Практическая медицина.– 2012.– № 7 (62).– С. 104-108.

IMPACT OF THE MACROPHAGAL IMMUNOMODULATOR ON THE NUCLEIC ACIDS CONTENT IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN CONDITIONS OF ALLOXAN DIABETES

Gette I. F., Danilova I. G.

Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

In the simulation of alloxan diabetes an increase in the number of rat peripheral blood lymphocytes and their content of DNA was revealed, the increase was likely to compensate the lack of RNA accumulation. Macrophage immunomodulatory impact of the 3- aminophthalhydrazide was accompanied by normalization of the lymphocyte and DNA level, as well as specific indicators for diabetes.

Keywords: nucleic acids, lymphocytes, immunomodulation.

ДЕЙСТВИЕ ОКСИДА АЗОТА НА АПОПТОЗ И СИНТЕЗ ЛЕЙКОТРИЕНОВ В ФАГОЦИТИРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛАХ ЧЕЛОВЕКА

Вирясова Г. М., Голенкина Е. А., Судьина Г. Ф.

НИИ ФХБ им. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Исследование влияние оксида азота (II) на апоптоз нейтрофилов человека и синтез лейкотриенов *in vitro* при взаимодействии их с объектом фагоцитоза – частицами опсонизированного зимозана. Показано, что NO влияет на индуцированный зимозаном апоптоз и на каскад арахидоновой кислоты, сдвигая его в сторону образования 5-охо-ETE, что играет важную роль в развитии апоптоза фагоцитирующих нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, оксид азота, апоптоз, фагоцитоз, лейкотриены.

Первую линию защиты высшего организма от бактериальной инфекции составляют специализированные фагоциты, к которым относятся и нейтрофилы. Фагоциты осущест-

вляют захват (фагоцитоз) микроорганизмов и чужеродных частиц, синтез активных форм кислорода и азота, липидных медиаторов воспаления, высвобождение цитокинов и протеолитических ферментов во внеклеточную среду. [1]. Ранее было показано, что фагоцитоз запускает в нейтрофилах синтез 5-липоксигеназных метаболитов арахидоновой кислоты [2] и что оксид азота играет важную регуляторную роль в синтезе лейкотриенов [3]. Большое значение LTs в иммунологических процессах в настоящее время не вызывает сомнений. Терапевтические подходы, блокирующие образование лейкотриенов, как правило, благоприятны в лечении воспалительных заболеваний и аллергических реакций.

Молекула NO является ключевым физиологическим внутри- и межклеточным мессенджером, участвующим в регуляции многих процессов в организме, в частности, в поддержании тонуса сосудов, сигнализации между нейронами и иммунном ответе высшего организма на инфекцию. NO способен модулировать функции нейтрофилов. NO может поступать в нейтрофилы экзогенно, так как продуцируется клетками эндотелия и макрофагами. В данной работе исследовалось влияние оксида азота (II) на апоптоз нейтрофилов и синтез лейкотриенов *in vitro* при взаимодействии нейтрофилов с объектом фагоцитоза – частицами опсонизированного зимозана.

Материалы и методы. Полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы) выделяли из свежеотобранной донорской крови по методике, описанной ранее [4]. Для моделирования процесса фагоцитоза микроорганизмов нейтрофилами *in vitro* использовали частицы зимозана A (OZ) – опсонизированные клеточные стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В качестве донора NO для нейтрофилов в данной работе использовали 3,3-диэтил-1,2-диокситриазен аммония (Dea NONOate). Процент апоптотических клеток определяли при помощи проточной цитофлуориметрии по экспозиции и связыванию фосфатидилсерина с флуоресцентно меченным Annexin V, по окрашиванию PI фрагментированной ДНК (метод subG1 фракции) и по активации каспазного каскада. Изменения в синтезе метаболитов арахидоновой кислоты детектировались обращенно-фазовой ВЭЖХ [4].

Результаты. Количество апоптотических клеток в популяции под действием экзогенного NO увеличивалось в 2-3 раза. Повышение концентрации NONOate с 250 до 500 мкМ приводило к значимому ускорению развития апоптоза нейтрофилов. Последующее повышение концентрации NONOate до 1000 мкМ приводило к снижению числа клеток в состоянии апоптоза. Нелинейность зависимости индукции апоптоза от концентрации NONOate может объясняться включением компенсаторных клеточных механизмов, которые препятствуют преждевременной гибели клеток и обеспечивают выполнение ими защитных функций.

В ходе предыдущих исследований было установлено, что фагоцитоз опсонизированного зимозана нейтрофилами – достаточно быстрый процесс, который достигает насыщения в течение первых 15 мин инкубации. При этом фагоцитируют практически все клетки в популяции, поглощая от 1 до 5 частиц OZ на клетку [5]. В ходе данной работы было подтверждено, что PMA (форбол миристат), NONOate и OZ являются мощными индукторами апоптоза, увеличивая процент апоптотических клеток по сравнению с контролями в 2-4 раза. Также было отмечено, что экспозиция фосфатидилсерина на ранних стадиях апоптоза происходит быстрее, чем фрагментация ДНК и активация каспазного каскада.

Мы предположили, что совместное добавление двух сильных индукторов апоптоза, таких как NO и OZ должно приводить к еще большему увеличению количества апоптотических клеток. Однако, добавление NO вместе с OZ приводит к снижению апоптоза. Такой же эффект наблюдается и при добавлении NO через 5 минут после начала взаимодействия нейтрофилов с зимозаном.

Опсонизированный зимозан OZ при взаимодействии с нейтрофилами вызывает активацию 5-липоксигеназы (5-LO) и запускает 5-липоксигеназный каскад трансформации арахидоновой кислоты. Поскольку синтез 5-LO метаболитов, как и фагоцитоз, достаточно быстрый процесс (5-20 мин), то 5-LO продукты могут участвовать в сигнальных каскадах, ведущих клетку к апоптозу.

С помощью ВЭЖХ хроматографии было показано, что в контрольных пробах и в присутствии PMA синтеза метаболитов арахидоновой кислоты не происходит. Добавление опсонизированного зимозана приводит в основном к синтезу LTB4 (лейкотриен B4)

и 5-HETE, причем в присутствии PMA их синтез резко возрастает. Добавление NO приводит к увеличению количества минорного метаболита 5-охо-ETE.

На основании полученных экспериментальных данных мы предположили, что NO сдвигает 5-липоксигеназный каскад в сторону образования 5-HETE и 5-охо-ETE, что может опосредовать эффекты NO, связанные с уменьшением уровня апоптоза «фагоцитирующих» нейтрофилов. Экзогенное добавление 5-охо-ETE к фагоцитирующим клеткам ингибирует развитие апоптоза. Это подтверждает гипотезу о том, что эффекты NO могут быть частично опосредованы действием 5-охо-ETE.

Выводы. Показано, что NO стимулирует апоптоз нейтрофилов и выявлен стимулирующий эффект опсонизированного зимозана на апоптоз нейтрофилов человека. Добавление NO к фагоцитирующим клеткам частично ингибирует индуцированный зимозаном апоптоз нейтрофилов и сдвигает каскад арахидоновой кислоты в сторону образования 5-охо-ETE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Swanson J. A. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis / J. A. Swanson, A. D. Hoppe // J Leukoc Biol.– 2004.– V.76, № 6.– P. 1093-1103.
2. Yamaoka K. A. Leukotriene B 4 enhances activation, proliferation, and differentiation of human B-lymphocytes / K. A. Yamaoka, H. E. Claesson, A. Rosen // J Immunol.– 1989.– V.143, № 6.– P. 1996-2000.
3. Fialkow L. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function / L. Fialkow, Y. Wang, G. P. Downey // Free Radic Biol Med.– 2007.– V.42, № 2.– P. 153-164.
4. Regulation of 5-oxo-ETE synthesis by nitric oxide in human polymorphonuclear leucocytes upon their interaction with zymosan and Salmonella typhimurium / G. M. Viryasova, S. I. Galkina, T. V. Gaponova et al. // Biosci. Rep.– 2014.– V.34, № 3.– P. 207-216.
5. Nitric oxide mediates distinct effects of various LPS chemotypes on phagocytosis and leukotriene synthesis in human neutrophils / A. N. Zagryazhskaya, S. C. Linder, Z. V. Grishina et al. // Int. J. Biochem. Cell Biol.– 2010.– V. 42 – P. 921-931.

EFFECT OF NITRIC OXIDE ON LEUKOTRIENES SYNTHESIS AND APOPTOSIS IN HUMAN PHAGOCYTING NEUTROPHILS

Viryasova G. M., Golenkina E. A., Sud'ina G.F.

The A. N. Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The effect of nitric oxide (II) on apoptosis of human neutrophils and the synthesis of leukotrienes in vitro in phagocyting neutrophils was investigated. Particles of opsonized zymosan were used as phagocytosis object. It is assumed that NO affects the zymosan induced apoptosis and arachidonic acid cascade, shifting it towards the formation of 5-oxo-ETE, and this plays an important role in the apoptosis of phagocyting neutrophils.

Keywords: neutrophils, nitric oxide, apoptosis, phagocytosis, leukotrienes.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТУЧНЫХ КЛЕТОК В СЕМЕННИКАХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ИХ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Храмцова Ю. С.[1,2], Бухарина А. Ю.[2], Иванова И. Г.[2]

[1]Институт иммунологии и физиологии УрО РАН; [2]Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Проведено исследование количества и функциональной активности тучных клеток в семенниках при острой и тупой травмах, а также при экспериментальном варикоцеле. Показано, что характер травмы влияет не только на ход репаративной регенерации семенников, но и на морфофункциональные показатели тучных клеток. Распределение и функциональная активность мастоцитов сильно варьируют в зависимости от типа повреждения, и выявить однотипной реакции тучных клеток на травму семенников не удалось.

Ключевые слова: тучные клетки, регенерация, семенники, иммунопривилегированный орган.

Проведено исследование количества и функциональной активности тучных клеток в семенниках при острой и тупой травмах, а также при экспериментальном варикоцеле. Показано, что характер травмы влияет не только на ход репаративной регенерации семенников, но и на морфофункциональные показатели тучных клеток. Распределение и функциональная активность мастоцитов сильно варьируют в зависимости от типа повреждения, и выявить однотипной реакции тучных клеток на травму семенников не удалось.

Бесплодие у мужчин – не только важная медицинская, но и серьезная социальная проблема. Среди множества причин, которые приводят к бесплодию, наиболее частыми являются варикоцеле, травмы яичек (острые и тупые), крипторхизм, опухоли и ряд других. Яичко является иммунопривелигированным органом, и на пути к достижению полноценного восстановления его структуры и функций после различных повреждений лежит пока всё еще непреодолимый барьер – аутоиммунные процессы, развивающиеся в ответ на любую травму [1].

Иммунная система играет важную роль в физиологической регенерации семенников, обеспечивая иммунный гомеостаз в яичках и нормальный сперматогенез. Неотъемлемым компонентом иммунного микроокружения семенников являются тучные клетки (ТК), которые, безусловно, играют важную роль в поддержании иммунной привилегии яичек. Вместе с тем, выявляется отчетливая отрицательная корреляция между такими показателями, как число мастоцитов и состояние сперматогенеза [2, 3]. В связи с вышесказанным поиск возможных путей ослабления аутоиммунных реакций и повышение эффективности регенерации семенников является одной из важнейших проблем репродуктивной физиологии.

Цель работы. Оценить морфофункциональные показатели ТК в семенниках в зависимости от характера травмы яичек.

Материалы и методы. Исследование проводили на 40 половозрелых крысах самцах линии Вистар массой 200-300 г. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали Директиве Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, которых используют для научных целей» (2010/63/EU). Экспериментальных животных делили на 4 группы: 1) интактные крысы (n = 10); 2) крысы, которым наносили острую травму, прокалывая левый семенник иглой диаметром 3 мм (n = 10); 3) крысы, которым наносили тупую травму, сдавливая левый семенник пинцетом (n = 10); 4) крысы с экспериментальной моделью варикоцеле (n=10). Животных выво-

дили из эксперимента через 7 и 30 суток путем передозировки эфирного наркоза. На препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, оценивали состояние сперматогенеза и измеряли ряд показателей, свидетельствующих о ходе репаративной регенерации. Для оценки функционального состояния семенников проводили исследование уровня общего тестостерона в крови хемилюминесцентным методом на анализаторе «ADVIA Centaur XP» (Siemens, США). Для подсчета ТК срезы семенников окрашивали Азуром II и толуидиновым синим. Подсчет ТК проводили на единицу площади с пересчетом на 1 мм^2. Далее типировали ТК с последующим расчетом показателей среднего гистохимического коэффициента и индекса дегрануляции, свидетельствующих о синтетической и функциональной активности мастоцитов. Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрических методов статистики («Statistica 6.1»). Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Результаты. ТК в семенниках по большей части локализованы в оболочке вокруг сосудов, но встречаются и в интерстициальном пространстве. При острой травме через 7 суток после прокола повышается синтетическая (с 1,62±0,04 у интактных до 1,95±0,05 усл. ед.) и функциональная активность мастоцитов (с 11,2±0,85 до 15,7±1,95 усл. ед.) при их неизменном количестве в поврежденном органе. На 30 сутки после повреждения снижается количество ТК при высоком уровне их синтетической активности. Данные изменения со стороны ТК сопровождаются интенсивно развивающимися деструктивными изменениями в семенниках. Появляются некротизированные канальцы, происходит формирование семенных шаров, а также уменьшение количества зародышевых клеток и отсутствие сперматозоидов в части канальцев. К 30-м суткам после прокола наблюдается ухудшение картины.

Тупая травма семенника приводит к еще большим изменениям со стороны ТК в яичках. Так, на 7 сутки после повреждения наблюдается повышение количества этих клеток в семеннике (с 10,22±0,28 у интактных до 16,04±0,54 на 1 мм^2), растет синтетическая (с 1,62±0,04 до 1,92±0,01 усл. ед.) и функциональная активность мастоцитов (с 11,2±0,85 до 17,2±1,39 усл. ед.). Таким образом, ТК активизируют свою деятельность за счет двух различных механизмов, увеличивая количество синтезируемых гранул в своей цитоплазме и активнее выпуская их в межклеточное пространство. На 30 сутки после тупой травмы отмечается снижение количества и синтетической активности ТК, однако функциональная активность остается на высоком уровне, о чем свидетельствует высокий индекс дегрануляции. При данных изменениях ТК в поврежденном семеннике после тупой травмы развиваются деструктивные процессы, что проявляется в снижении количества зародышевых клеток в канальцах, появлении канальцев с некрозом и отсутствием сперматозоидов в части канальцев. На 30 сутки в целом сохраняется аналогичная гистологическая картина.

Через 7 суток после развития варикоцеле у крыс на фоне отсутствия количественных изменений ТК в семенниках наблюдается повышение их синтетической и функциональной активности. Через 30 суток отмечается резкое снижение и количества мастоцитов (с 10,22±0,28 у интактных до 3,24±0,4 на 1 мм^2), и их активности. Эти данные противоречат литературным данным, где описано повышение количества ТК при варикоцеле [4]. Возможно, эти различия связаны с разными сроками и объектами исследования, а также окраской на ТК. В самом семеннике после формирования варикоцеле появляются некротические изменения в некоторых канальцах, наблюдается плазматическое пропитывание коллагеновых структур и интерстициальный отек, исчезают сперматозоиды из части извитых канальцев.

Несмотря на значительные изменения в морфологических показателях поврежденного семенника, содержание тестостерона в сыворотке крови остается на уровне интактных животных на все сроки после всех воздействий, за исключением 30 суток после тупой травмы. На данном сроке наблюдается резкое падение содержание этого гормона в крови. Данные изменения, возможно, связаны с повреждением клеток Лейдига, вследствие сдавления органа и их последующим разрушением на поздний срок, а также снижением их активности в неповрежденном органе.

Выводы. Тучноклеточная популяция в семенниках совершенно по-разному реагирует на различные виды его повреждения, и выявить однотипную реакцию со стороны ТК не

удалось. Эта разница касается, как количественных, так и функциональных показателей мастоцитов, которые сильно варьируют при различных травмах яичек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity / S. Zhao, W. Zhu, S. Xue et al. // Cell Mol. Immunol.– 2014.– V.11, № 5.– P. 428-437.
2. Тучные клетки. Физиология и патофизиология / Б.Г. Юшков, В.А. Черешнев, В.Г. Климин и др.– Москва: Медицина, 2011.– 240 с.
3. Are testicular mast cells involved in the regulation of germ cells in man? /S. Windschüttl, D. Nettersheim, S. Schlatt et al. // Andrology.– 2014.– V. 2, № 4.– P. 615-622.
4. Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility / K. Yamanaka, M. Fujisawa, H. Tanaka et al. // Hum. Reprod.– 2000.– V. 15, № 7.– P. 1543-1547.

THE MORFOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF MAST CELLS IN TESTICLES AT DIFFERENT TYPES OF THEIR DAMAGE

Khramtsova Y.S.[1,2], Bukharina A.Y.[2], Ivanova I.G.[2]

[1]Institute of Immunology and Physiology UB RAS, [2]Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

Research of quantity and functional activity of mast cells in testicles is conducted at sharp and stupid injuries, and also at the experimental varikotsela. It is shown that character of injury influences not only on the course of reparative regeneration of testicles, but also on morfofunctional indicators of mast cells. Distribution and functional activity of mastocytes strongly vary depending on damage type, and the same reaction of mast cells to an injury of testicles didn't manage to reveal.

Keywords: mast cells, regeneration, testicles, immuneexclusive organ.

РОЛЬ NFATc1 В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВИЗАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Патракеева В.П., Добродеева Л.К., Самодова А.В., Ставинская О.А.

ФГБУН Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН, Архангельск, Россия

Повышение уровня NFATc1 в лизате ассоциировано с активизацией пролиферации моноцитов и Т-клеток, на ранней стадии. Не установлено значимых различий в содержании дифференцированных фенотипов Т- и В- клеток, что свидетельствует о том, что влияние NFATc1 распространяется только на процессы пролиферации. Активизация апоптоза, заканчивающая развитие любой иммунной реакции, не сопровождается повышением содержания сывороточного NFATc1, что фактически подтверждает факт неучастия NFATc1 в активизации процессов дифференцировки лимфоцитов.

Ключевые слова: активация, ядерные белки, пролиферация, иммунокомпетентные клетки, апоптоз.

NFAT экспрессируется Т- и В-лимфоцитами, NK, моноцитами, а также не иммунными клетками (мышечной ткани, сердца и нейронами). Активация NFATc1 является Ca^{2+} зависимой, кальциневрин способствует прохождению молекулы NFATc1 в ядро. Белку NFATcl принадлежит важнейшая роль в регуляции развития Т-лимфоцитов при переходе от стадии

двойных негативных клеток к двойным позитивным [2]. Известно, что совместно с другими транскрипционными факторами (AP-1, NF-kB, c-Fos, c-Jun/c-Fos, EGR 1, Egr) NFAT индуцирует экспрессию генов TNF, CD 154 и Fas-лиганд [4]. Ядерный белок NFAT впервые был идентифицирован как фактор, связывающий промотер IL-2. Есть данные о том, что NFAT снижает активность апоптоза иммунокомпетентных клеток. Однако неизвестно, влияет ли содержание NFAT на дифференцированные иммунокомпетентные клетки, на различные этапы активации; нет данных о соотношениях свободного, клеточного NFAT и уровня активности апоптоза лимфоцитов.

Цель. Выявить роль NFATc1 в процессах активации, дифференцировки и апоптоза Т- и В-лимфоцитов периферической крови.

Методы. Проведено иммунологическое обследование 50 клинически здоровых человек трудоспособного возраста (20-50 лет). Содержание фенотипов лимфоцитов определяли методом непрямой иммунопероксидазной реакции (ООО «Сорбент», г. Москва). Количество и соотношение клеток гемограммы, нейтрограммы, моноцитограммы (О. Н. Григорова, 1956) и лимфоцитограммы (И. А. Кассирский, 1970) подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Романовского-Гимзе. Методом ИФА определяли содержание: NFATc1 в сыворотке и лизате лимфоцитов (Cusabio, Китай); IL-6, IL-2, IL-10, гаптоглобин (Bender MedSystems, Австрия). Реакцию оценивали на автоматическом анализаторе «Elisa» (BioRad). Статистический анализ результатов проведен с помощью программы «SPSS for Windows. Версия 13». Различия считались достоверными при $p<0,05$.

Результаты. При увеличении уровня содержания NFATc1 в лимфоцитах с 219,10(35,40-358,90) до 3477(1441-6693) пг/мл ($p<0,0001$) не происходит изменения общего количества лимфоцитов в периферической крови, соответственно 2,23(1,80-2,94) и 2,20(1,93-3,78)$\times 10^9$ кл/л. Не отмечается достоверных различий в структуре лимфоцитограммы: содержание больших лимфоцитов 0,09(0,03-0,33) и 0,15(0,04-0,49); средних – 1,32(1,08-1,58) и 1,61(1,42-2,45); малых – 0,38(0,22-0,75) и 0,50(0,43-0,68)$\times 10^9$ кл/л фактически не имели различий. Нет заметного изменения в уровне нейтрофилов, общее их содержание в первой группе составило 3,77(3,02-5,35), во второй – 4,62(3,50-6,41)$\times 10^9$ кл/л. Отмечается увеличение концентрации моноцитов с 0,51(0,37-0,80) до 0,94(0,49-1,17)$\times 10^9$ кл/л, $p<0,05$. В структуре моноцитограммы растёт число промоноцитов (соответственно 0,06(0,05-0,07) и 0,13 (0,10-0,25)$\times 10^9$ кл/л, $p<0,05$). Уровень содержания зрелых и полиморфноядерных моноцитов практически не изменяется (соответственно 0,58(0,014-0,68 и 0,51(0,24-0,82); 0,12(0,05-0,17) и 0,12(0,07-0,35)$\times 10^9$ кл/л). При оценке активации лимфоцитов по наличию ядрышек установлено, что в группе с более высоким содержание NFATc1 число таких клеток увеличивается в 1,7 раза (с 1,78±0,88 до 3,01±1,18 %). Таким образом, увеличение внутриклеточного содержания NFATc1 проявляется морфологическим признаком с увеличением содержания ядрышек.

При повышении уровня внутриклеточного NFATc1 увеличивается число клеток с ранним маркером активизации ($CD\,71^+$) с 0,48 (0,24-0,560 до 0,69(0,33-0,88) $\times 10^9$ кл/л ($p<0,05$). Реакция со стороны поздних маркеров активации, таких как $CD\,25^+$ и $HLADRII^+$ отсутствовала. Концентрации клеток с рецептором к IL-2 составили соответственно 0,49(0,37-0,67) и 0,33(0,29-0,64)$\times 10^9$ кл/л, уровни $HLADRII^+$ – 0,51(0,43-0,68) и 0,40(0,26-0,70)$\times 10^9$ кл/л. Таким образом, можно сказать, что NFATc1 участвует в регуляции самых ранних этапов активации лимфоцита на уровне экспрессии CD 71. Известно, что экспрессия CD 71 клеткой происходит при дефиците в ней железа, является энергозатратной и сопровождается снижением уровня АТФ [1]. Действительно, на фоне активации NFATc1 регистрируется заметное повышение транспортного белка гемоглобина – гаптоглобина (с 1970(700-2780) до 2930(1800-3320) мг/л), обеспечивающего сохранение доступного железа и предотвращения его выделения из организма. Не установлено статистически значимых различий в содержании дифференцированных фенотипов Т- и В-клеток, что свидетельствует о том, что влияние NFATc1 распространяется только на процессы пролиферации, а для дальнейшего развития иммунной реакции с дифференцировкой лимфоцитов требуются дополнительные стимулы. Содержание сывороточного NFATc1 в зависимости от его активности в лимфоцитах фактически не изменяется (соответственно 57,25(32,90-268,45) и 87,50(55,00-128,00) пг/мл). Освобождение NFATc1 возможно только в результате апоптоза лимфоцитов, уровень

которого растет по содержанию в крови CD 95$^+$ (с 0,43(0,27-0,64) до 0,79(0,51-1,43)×10^9 кл/л, p<0,05). Отсутствие изменения содержания сывороточного NFATc1 можно объяснить преимуществом апоптоза дифференцированных клеток, количество которых не повышается при активации NFATc1.

В регуляции активности NFATc1 участвует не только трансферрин; регистрируется снижение уровня содержания IL-10 с 20,04±1,62 пг/мл до 12,56±4,95. Известна способностью данного цитокина ингибировать активность NFATc1, подавляя экспрессию mRNA и его ядерную транслокацию [3]. Причиной снижения секреции IL-10 может быть низкое содержание TOLLR-4 на моноцитах.

Итак, повышение содержания NFATc1 в лимфоцитах ассоциировано с активизацией Т-клеток, преимущественно на ранней стадии активации пролиферации с повышением концентрации промоноцитов и клеток с рецептором к трансферрину. Увеличение концентраций гаптоглобина на фоне повышенных уровней NFATc1 в лимфоцитах подтверждает повышенную потребность в железе в период пролиферативной активности. Не установлено статистически значимых различий в содержании дифференцированных фенотипов Т- и В- клеток, что свидетельствует о том, что влияние NFATc1 распространяется только на процессы пролиферации. Активизация апоптоза, заканчивающая развитие любой иммунной реакции, не сопровождается повышением содержания сывороточного NFATc1, что фактически подтверждает факт неучастия NFATc1 в активизации процессов дифференцировки лимфоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Участие рецепторов к трансферрину в метаболических процессах / Л. К. Добродеева, А. В. Самодова, И. С. Зубаткина и др. // Российский аллергологический журнал.– 2013.– № 2(2).– С. 84-85.
2. Constitutively Nuclear Form of NFATx Shows Efficient Transactivation Activity and Induces Differentiation of CD 4$^+$CD 8$^+$ T cells / Y. Amasaki, S. Adachi, Y. Ishida et al. // J. Biol. Chem.– 2002.– V. 227, No. 28.– P. 25640-25648.
3. Evans K. E., Fox S. W. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus / K. E. Evans, S. W. Fox // http://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-8-4.
4. NFAT control of innate immunity / J. Fric, T. Zelante, A. Y. W. Wong et al. // Blood.– 2012.– V. 120 (7).– P. 1380-1389.

NFATc1 ROLE IN REGULATION OF ACTIVATION PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Patrakeeva V. P., Dobrodeeva L. K., Samodova A. V., Stavinskaya O. A.

The Institute of Environmental Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Archangelsk, Russia

It is found that increasing the level of NFATc1 in lymphocytes is associated with the activation of T-cells, preferably at an early stage of proliferation, and increased concentration promonocytes. Not found no significant differences in the content of the differentiated phenotype of T and B cells, which suggests that the impact of NFATc1 applies only to processes of proliferation. Activation of apoptosis ending development of any immune reaction is not accompanied by an increase of serum NFATc1, which actually confirms the non-participation of NFATc1 in the revitalization processes of differentiation of lymphocytes.

Keywords: activation, nuclear proteins, proliferation, immune cells, apoptosis.

ДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ НА АКТИВАЦИЮ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Берлов М. Н.[1,2], Умнякова Е. С.[1], Леонова Т. С.[2], Пашинская Л. Д.[2], Кокряков В. Н.[1,2]

[1]ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

В работе изучено влияние антимикробных пептидов дефенсина HNP-1 и ареницина-1 на активацию системы комплемента в гемолитическом и бактериолитическом тестах. Мы показали, что оба пептида ингибируют комплемент-зависимый гемолиз. В зависимости от условий эксперимента, в частности, от ионной силы, характер влияния данных пептидов на бактериолиз различается.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, дефенсины, ареницины, система комплемента, C1q.

Антимикробные пептиды (АМП) являются одними из важнейших молекулярных факторов врожденного иммунитета человека и животных. Помимо собственно антимикробной активности многие из этих пептидов обладают широким спектром иммуномодулирующих свойств. Одним из таких свойств является модулирующее действие АМП на активацию системы комплемента, которое может реализовываться через взаимодействие с белками комплемента, в частности с C1q.

Впервые способность АМП к формированию комплекса с C1q была показана для α-дефенсинов человека [1, 2], аналогичные данные были получены и в нашей работе [3]. В зависимости от выбранной экспериментальной модели действие дефенсинов на комплемент оказывалось либо активирующим, либо ингибирующим. Таким образом, вопрос о характере влияния дефенсинов на систему комплемента по-прежнему остается открытой проблемой в имммунологии. Впоследствии было описано взаимодействие с C1q человека и гетерологичного АМП, тахиплезина из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus trindentatus* [4]. Мы впервые показали формирование комплексов C1q с кателицидином свиньи протегрином PG-1, а также с гомологичным тахиплезину пептидом, ареницином-1 из целомоцитов кольчатого червя пескожила *Arenicola marina* [3, 5]. Следует отметить, что все экспериментальные данные о взаимодействии АМП с C1q относятся к пептидам, для которых характерно доминирование в молекуле β-структуры, стабилизированной дисульфидными связями. Возможно, эти структурные особенности благоприятствуют формированию комплексов пептидов с C1q.

Изучение взаимодействия пептидных молекул с C1q осуществляется и в прикладных целях. Известно, что система комплемента играет существенную роль в патогенезе целого ряда заболеваний. Исследование механизмов модуляции комплемента АМП связано, таким образом, с перспективой разработки на их основе новых медицинских препаратов для направленного воздействия на систему комплемента.

Целью работы было изучение характера влияния дефенсина HNP-1 и ареницина-1 на активацию системы комплемента в различных экспериментальных условиях.

Методы. Уровень активации комплемента оценивали по лизису клеток-мишеней сывороткой крови человека. В качестве мишеней использовали сенсибилизированные антителами эритроциты барана и клетки грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*, штамм ML-35p. В системе с использованием эритроцитов интенсивность гемолиза определяли фотометрически по уровню высвобождения гемоглобина. Комплемент-зависимый бактериолиз оцени-

вали с помощью теста на увеличение проницаемости наружной и внутренней (цитоплазматической) мембран *E. coli* по доступности синтетических субстратов для периплазматического фермента (β-лактамазы) и цитоплазматического фермента (β-галактозидазы).

Результаты и обсуждение. Показано, что и дефенсин (в концентрациях 10-100 мкг/мл), и ареницин (7-20 мкг/мл) ингибируют комплемент-зависимый гемолиз. Характер влияния данных АМП на лизис клеток *E. coli* зависит от условий эксперимента (ионная сила, концентрация пептида). Так, в условиях физиологической концентрации хлорида натрия (0,15 M NaCl) дефенсин HNP-1 в концентрации 100 мкг/мл заметно ингибирует литическую активность сыворотки в отношении этих клеток. В то же время, как было показано нами ранее [3], при снижении концентрации хлорида натрия HNP-1 в некоторой степени ускоряет повышение проницаемости цитоплазматической мембраны бактерии. Ареницин даже в условиях физиологической ионной силы проявлял активирующую активность на комплемент по отношению к бактериям (то есть противоположный эффект по сравнению с результатами гемолитического теста), выраженную в ускоренном повышении проницаемости наружной и цитоплазматической мембран *E. coli*. Стоит отметить, что в использованных концентрациях (2,5-40 мкг/мл) ареницин сам по себе обладает заметной мембранолитической активностью, что затрудняет изучение его действия на активацию комплемента в присутствии бактерий в среде с низкой ионной силой.

Анализ полученных результатов в совокупности с литературными данными позволяет сформулировать гипотезу, объясняющую разнонаправленный характер действия АМП на активацию системы комплемента. В соответствии с этой гипотезой β-структурные АМП взаимодействуют с C1q в участке коллагеноподобного домена. С учетом олигомерной структуры C1q (6 субъединиц, содержащих по 3 полипептидные цепи каждая) возможно олиговалентное связывание пептидов с этим белком. Можно предположить, что связывание АМП с молекулой C1q препятствует взаимодействию с ним протеиназ классического пути активации комплемента (C1r и/или C1s). Однако при низких концентрациях пептида, а также если пептид преимущественно находится не в жидкой фазе, а сорбирован на поверхности (например, на поверхности бактериальной клетки при пониженной ионной силе), он лишь частично будет нарушать контакты протеиназ с C1q. Полное нарушение контактов протеиназ C1r/C1s с C1q будет приводить к ингибированию комплемента; частичное – к независимой от антител активации. Таким образом, АМП, сорбируясь на поверхности бактериальных клеток, могут служить «посадочной площадкой» для C1q и способствовать его связыванию с клетками и активации комплемента независимо от антител.

Выводы. В настоящей работе охарактеризовано влияние дефенсина HNP-1 и ареницина-1 на активацию системы комплемента. Результаты работы создают перспективу для использования изучаемых пептидов в качестве прототипов новых лекарственных средств – регуляторов комплемента.

Работа поддержана РФФИ, гранты № 15-04-06471а и № 16-34-00136 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Defensins purified from human granulocytes bind C1q and activate the classical complement pathway like transmembrane glycoprotein gp41 of HIV-1 / Z. Prohászka, K. Németi, P. Csermely et al.// Mol. Immunol.– 1997.– V. 34.– P. 809-816.
2. Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins / H.R. van den Berg, M.C. Faber-Krol, S. Wetering, et al.// Blood.– 1998.– V. 92.– P. 3898-3903.
3. Умнякова Е.С., Дефенсины как регуляторы системы комплемента / Е.С. Умнякова, М.Н. Берлов, В.Н. Кокряков // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8 (17), № 3.– С. 414-417.
4. Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells / J. Chen, X.M. Xu, C.B. Underhill, S. Yang, L. Wang, Y. Chen, S. Hong, K. Creswell, L. Zhang // Cancer Res.– 2005.– V. 65.– P. 4614-4622.
5. Взаимодействие ареницина-1 с белком C1q / М.Н. Берлов, Е.С. Умнякова, Т.С. Леонова и др. // Биоорганическая химия.– 2015.– Т. 41, № 6.– С. 664-668.

EFFECT OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES ON COMPLEMENT SYSTEM ACTIVATION

Berlov M. N.[1,2], Umnyakova E. S.[1], Leonova T. S.[2], Pashinskaya L. D.[2], Kokryakov V. N.[1,2]

[1]FSBSI "Institute of Experimental Medicine"; [2]Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

In this work effect of antimicrobial peptides, defensin HNP-1 and arenicin-1, was studied by hemolytic and bacteriolytic tests. We found that both peptides inhibit complement-dependent hemolysis. Depending on experimental conditions, such as ionic strength, the mode of action of these peptides on bacteriolysis differs.

Key words: antimicrobial peptides, defensins, arenicins, the complement system, C 1q.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ АГОНИСТОВ TLR9 И НАТРИЕВОЙ СОЛИ ДНК ПОЗВОНОЧНЫХ В НОРМЕ И ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Русинова Т. В., Колесникова Н. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Каплина Э. Н.

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

Сходство по направленности эффектов агониста TLR9 (ODN 2395) и натриевой соли нативной ДНК из молок осетровых рыб (Дерината) в отношении рецепторного аппарата нейтрофилов (CD11b-, CD16-рецепторов и плотности их экспрессии – MFI) в норме и при инфекционном процессе, позволяет предположить наличие общего механизма их действия на фагоциты, опосредованного TLR9. Важно отметить, что перераспределение субпопуляционного состава нейтрофилов, одновременно экспрессирующих CD11b-, CD16-рецепторы, индуцированное *in vitro* инкубацией с ODN 2395 и с Деринатом, имеет иммуномодулирующий характер, что позволяет предположить участие нуклеиновых кислот в нормализации функциональной активности НГ при воспалительных процессах.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, иммуномодуляторы, инфекции.

Известные гемопоэтические и иммунотропные эффекты натриевой соли нативной ДНК из молок осетровых рыб (Дерината) обуславливают целесообразность не только широкого использования препаратов, созданных на ее основе при различных инфекционных, воспалительных, дегенеративных и других заболеваниях [1], но и изучения механизмов их многосторонней активности и высокой терапевтической безопасности. Содержащиеся в препаратах нуклеиновых кислот короткие и средние цепи ДНК, оканчиваются CpG-мотивами, распознавание которых Толл-подобными рецепторами 9-го типа (TLR9) клеток врожденного иммунитета во много раз усиливает ответ организма даже на низкоиммуногенные антигены [2, 3, 4]. При этом распознавание патогенов происходит в кооперации TLR9 с рецептором CD11b, способным как позитивно, так и негативно регулировать TLR9-опосредованные механизмы [5]. Недавними исследованиями показано, что Деринат в условиях *in vitro* способен снижать исходно высокое содержание нейтрофильных грануло-

цитов (НГ), эндосомально экспрессирующих TLR 9 (CD 289) у пациентов с острой бактериальной и вирусной инфекцией, а также изменять плотность внутриклеточной экспрессии данного рецептора [6].

Цель. Изучение *in vitro* иммунотропных эффектов натриевой соли ДНК животного происхождения (Дерината) в сравнении с CpG-агонистами TLR 9(ODN 2395) на экспрессию CD11b- и CD16-рецепторов НГ в норме и при остром инфекционном процессе.

Материалы и методы. Периферическую кровь 28 взрослых пациентов с острым инфекционным мононуклеозом, ассоциированным с Эпштейн-Барр-вирусной инфекцией (ОВЭБИ), 25 больных с острым бактериальным тонзиллитом (ОБТ) и 25 практически здоровых субъектов инкубировали в течение 1 часа в CO_2-инкубаторе «New Brunswick Scientific Galaxy 170S» (Великобритания) с синтетическим агонистом TLR 9 – ODN 2395 («Invitrogen» LifeTechnologies, США), а также с инъекционной формой препарата Деринат («Техномедсервис», Россия) при температуре 37 °С. Для этого к 1 мл крови добавляли 5 мкл ODN 2395 (500 мкмоль/л), или 10 мкл 1,5 % Дерината (30,82 мкмоль/л), или 5 мкл 0,9 % NaCl. Исследование рецепторной функции НГ включало определение поверхностных CD16-, CD11b-антигенов с использованием МкАТ CD16-FITC, CD11b-PC 5, и соответствующих изотипических контролей, а также расчет плотности экспрессии (MFI) рецепторов осуществляли на проточном цитометре CytomicsFC-500 («BeckmanCoulter», США). Статистическую обработку данных проводили в программном пакете StatSoft Statistica 6, выражая результаты как среднее арифметическое для анализируемой группы показателей ± стандартное отклонение. Для сравнения групп по количественным признакам использовали непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни и критерий Вилкоксона. Различие групп полагали статистически значимым при $P<0,05$.

Основные результаты. Исследованиями установлено однонаправленное усиление плотности экспрессии CD11b-рецепторов (MFI-CD11b), обусловленное инкубацией цельной крови всех обследуемых в условиях *in vitro* как с агонистом TLR 9 (ODN 2395), так и с Деринатом.

Учитывая тот факт, что среди популяции НГ, одновременно экспрессирующих рецепторы CD16 и CD11b, имеет место распределение на субпопуляции, отличающиеся степенью плотности данных рецепторов (CD16bright-CD11b-bright, C16b-bright-CD11b-dim, CD16dim-CD11b-bright), интерес представляла оценка влияния в системе *in vitro* Дерината, относительно влияния ODN 2395 на указанный субпопуляционный состав НГ в норме и при инфекционных заболеваниях. В частности, показано, что в условиях *in vitro* как агонист TLR 9, так и Деринат достоверно увеличивают содержание CD16brCD11bbr-НГ в цельной крови здоровых лиц в 1,5 раза и в 18 раз, соответственно; при ОВЭБИ – однонаправлено снижают их относительное содержание CD16brCD11bbr-НГ, и не влияют на данный показатель при инкубации цельной крови больных острым бактериальным тонзиллитом (ОБТ). При определении величины MFI рецепторов CD16- и CD11b в субпопуляции CD16brCD11bbr-НГ были обнаружены сходные эффекты ODN 2395 и Дерината в отношении НГ здоровых лиц в виде достоверного увеличения показателей. Между тем при острой вирусной инфекции ODN 2395 снижал *in vitro* величину MFI-CD16 и MFI-CD11b, а Деринат увеличивал MFI-CD16 при тенденции к увеличению MFI-CD11b.

Наряду с этим установлена способность Дерината, как и агониста TLR 9, в условиях *in vitro* увеличивать относительное содержание субпопуляции CD16brCD11bdim-НГ при инфекционном процессе вирусного и бактериального (наиболее выраженно) генеза, а у здоровых лиц – снижать ее содержание в 3,6 раза. При исследовании плотности экспрессии рецепторов в субпопуляции CD16brCD11bdim-НГ было установлено влияние Дерината на величину MFI-CD11b при его инкубации с интактными НГ здоровых субъектов и на величину MFI CD16 при ОВЭБИ, тогда как влияния Дерината на данные показатели у больных ОБТ выявлено не было. Между тем было установлено, что в условиях инкубации крови больных ОБТ с агонистом TLR 9 – ODN 2395 имеет место увеличение плотности экспрессии CD11b и CD16.

Исследование влияния агониста TLR 9 (ODN 2395) и Дерината в условиях *in vitro* на содержание CD16dimCD11bdim-НГ в периферической крови больных ОВЭБИ, ОБТ, а также у здоровых лиц также продемонстрировало сходство его направленности. Так при

инкубации цельной крови здоровых лиц и пациентов с ОБТ с препаратами выявлено достоверное снижение относительного содержания CD16dimCD11bdim-НГ, тогда как при ОВЭБИ выявлено повышение содержания данной субпопуляции лишь под действием ODN 2395. Наряду с этим обнаружено достоверное влияние агониста TLR 9 и Дерината на уменьшение величины MFI-CD16 и MFI-CD11b при исследованиях периферической крови здоровых лиц, MFI-CD11b – при острой вирусной инфекции и MFI CD16 – при острой бактериальной инфекции.

Выводы. Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что натриевая соль нативной ДНК из молок осетровых рыб (Деринат) в условиях *in vitro* во многом проявляет сходный характер действия с известным агонистом TLR 9 – ODN 2395 в отношении модулирования рецепторной функции НГ в норме и при остром инфекционном процессе. Принимая во внимание перекрестную активацию («cross talking») CD11b и TLR 9 в процессе распознавания ДНК [5], можно предположить, что Деринат оказывает иммуномодулирующие эффекты, опосредованные как включением TLR 9 посредством CpG, так и через взаимодействие с CD11b, а также одновременно используя оба механизма, что подтверждается полученными в ряде случаев более выраженными эффектами Дерината в сравнении с агонистом TLR 9 в экспериментах *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Позднякова Ю. М. Технология биологически активных добавок к пище на основе ферментативного гидролиза гонад гидробионтов Текст.: Дис. канд. технич. наук / Владивосток: ТИНРОцентр, 2003.– 125 с.
2. Морфофизиологические принципы иммунологического действия ДНК эукариот / О. Ю. Филатов, О. В. Кашаева, Д. Ю. Бугримов и др. // Российский иммунологический журнал.– 2013.– Т. 7 (16), № 4.
3. CpG-C immunotherapeutic efficacy is jeopardized by ongoing exposure to stress: Potential implications for clinical use / Y. Goldfarb, B. Levi, L. Sorski et al. // Brain, Behavior and Immunity – 2011.– V. 25.– P. 67-76.
4. Серебряная Н. Б. Нуклеотиды как регуляторы иммунного ответа / Н. Б. Серебряная // Иммунология.– 2010.– № 5.– С. 273-281.
5. Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with Leishmania infantum / M. M. Figueiredo, I.FG. Amorim, A. JW. Pinto et al. // BMC Immunology.– 2013.– V. 14(22).
6. Влияние дерината на экспрессию TLR 9 в норме и при инфекционном процессе / Н. В. Колесникова, Т. В. Русинова, Г. А. Чудилова и др. // Медицинская иммунология – 2015.– Т. 17.– С. 269-270.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF IMMUNOTROPIC EFFECTS OF TLR 9 AGONISTS AND SODIUM SALT VERTEBRATE DNA IN NORMAL AND IN INFECTIOUS PROCESS

Rusinova T. V., Kolesnikova N. V., Chudilova G. A., Lomtatidze L. V., Kaplina E. N.

Kuban state medical University, Krasnodar, Russia

The similarity in orientation effects of the TLR 9-agonist (ODN 2395) and sodium salt of native DNA from Molok sturgeon (Derinat) in respect of the receptor apparatus neutrophils (CD 11b-, and CD 16 receptors and the density of their expression – MFI) in normal and in infectious process suggests a common mechanism of their action on the phagocytes, mediated by TLR 9. It is important to note that the redistribution of subpopulation composition neutrophils expressing both CD 11b, CD 16 receptors, induced in vitro by incubation with ODN 2395 and Derinat has immunomodulatory in nature, which may suggest the involvement of nucleic acids in the normalization of functional activity of NG in inflammatory processes.

Keywords: nucleic acids, immunomodulators, infection.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИММУННЫХ ПРОТЕАСОМ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ И РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРЫСЫ

Шарова Н. П., Карпова Я. Д., Астахова Т. М., Люпина Ю. В.

ФГБУН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Проанализирована динамика экспрессии иммунных протеасом в раннем развитии селезенки и печени крысы. Увеличение содержания иммунных протеасом в селезенке к третьей постнатальной неделе связано с формированием белой пульпы, а в печени – с увеличением их экспрессии в гепатоцитах. Эти процессы сопровождаются повышением уровня молекул главного комплекса гистосовместимости класса I. По-видимому, регуляция экспрессии иммунных протеасом в печени осуществляется по сигнальному пути с участием нейрональной NO-синтазы.

Ключевые слова: иммунные протеасомы, иммунная система, раннее развитие.

Выявление молекулярных и клеточных механизмов развития органов иммунной системы и регуляции иммунных реакций у млекопитающих остается одной из актуальных задач современной биологии и медицины. Значительный прогресс в решении данной задачи стал возможен благодаря открытию протеасом, отмеченному Нобелевской премией 2004 года [1]. Являясь мультикаталитическими мультисубъединичными протеиназами, протеасомы гидролизуют до 80-90 % клеточных белков. Особое место среди множественных форм протеасом млекопитающих занимают иммунные протеасомы, содержащие протеолитические иммунные субъединицы LMP7 (β5i), LMP2 (β1i) и LMP10 (MECL1, β2i) вместо протеолитических субъединиц X(β5), Y(β1) и Z(β2) конститутивных протеасом. Иммунные протеасомы, наряду с конститутивными, гидролизуют как свои, так и чужеродные белки, однако с различным сродством к одним и тем же пептидным связям, что обусловлено разной структурой их субстратсвязывающих карманов. Благодаря этому иммунные протеасомы образуют в несколько раз больше антигенных эпитопов для молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса I, что делает их необходимыми участниками Т-клеточного звена иммунитета [2]. Вместе с тем, оставалось неясным, какие периоды формирования органов иммунной системы связаны с экспрессией иммунных протеасом и, следовательно, с возможностью развития Т-клеточных иммунных реакций. В этой связи целью данной работы явилось исследование изменения содержания иммунных протеасом в эмбриональном и раннем постнатальном развитии селезенки и печени крыс в сравнении с динамикой экспрессии молекул ГКГ класса I. Кроме того, мы проанализировали особенности экспрессии нейрональной NO-синтазы (nNOS), участвующей в сигнальном пути, направленном на увеличение уровня иммунных протеасом.

Работу проводили на крысах Вистар в эмбриональном развитии (Э14–Э21) и в раннем постнатальном развитии (П1–П26) в соответствии с требованиями Комиссии по биоэтике ФГБУН Института биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН. День рождения обозначали как П0. Воспаление индуцировали у беременных крыс инъекцией липополисахарида (LPS) на 12-й день беременности внутрибрюшинно из расчета 18 мкг на 1кг веса животного. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Экспрессию иммунных протеасом в осветленных гомогенатах селезенки и печени изучали с помощью Вестерн-блоттинга с применением антител

к субъединицам LMP7 (β5i) и LMP2 (β1i), как описано ранее [3]. Аналогично исследовали экспрессию молекул ГКГ класса I и nNOS с использованием соответствующих антител. Распределение иммунных субъединиц протеасом в Т- и В-лимфоцитах анализировали методом двойного иммуногистохимического мечения.

Показано, что экспрессия как субъединицы LMP7, так и субъединицы LMP2 повышается в постнатальном развитии селезенки по сравнению с эмбриональным периодом в несколько этапов, на П1, П18 и П21. Примечательно, что на третьей постнатальной неделе в селезенке повышается и экспрессия молекул ГКГ класса I.

Кроме того, к концу третьей постнатальной недели завершается формирование белой пульпы В- и Т-лимфоцитами, обогащенными иммунными протеасомами. В целом, проведенное исследование позволило нам описать неизвестные ранее пути миграции В- и Т-лимфоцитов, обогащенных иммунными протеасомами, в развивающейся селезенке крысы. На Э21-П0 В- и Т-лимфоциты располагаются равномерно в красной пульпе. На П8-П9 В-лимфоциты занимают маргинальную зону. Интересной и необычной представляется выявленная нами двухэтапная миграция Т-лимфоцитов. На П8-П9 Т-лимфоциты выстраиваются плотным тяжом у белой пульпы, как будто готовясь к «прыжку», в конце третьей постнатальной недели (П18-П19) «прыжок» завершается. Миграция лимфоцитов из красной пульпы в белую пульпу является характерной чертой развивающейся селезенки.

В печени крысы иммунные субъединицы LMP7 и LMP2 протеасом выявляются начиная с Э16. На Э18 их количество удваивается и поддерживается на том же уровне до П3, на П5 – падает на 40 % и значительно не изменяется по П18. На П21 содержание иммунных субъединиц протеасом в печени снова увеличивается. С чем связаны такие изменения?

На Э21 в печени выявлены В-лимфоциты, обогащенные иммунными протеасомами, содержащими субъединицу LMP7 и/или субъединицу LMP2. На первой постнатальной неделе их количество значительно уменьшалось. В эмбриогенезе печень представляет собой первичный лимфоидный орган иммунной системы, из которого лимфоциты мигрируют во вторичные лимфоидные органы, в том числе, в селезенку. Вероятнее всего, что и молекулы ГКГ класса I, выявляемые в печени в эмбриональный период, принадлежат В-лимфоцитам. В пользу этого предположения свидетельствует факт одновременного исчезновения молекул ГКГ класса I из печени и появления их в селезенке на П1, куда в этот период мигрируют В-лимфоциты. Следующий период возрастания уровня иммунных протеасом в печени, к П21, связан с повышением их экспрессии в гепатоцитах. Какие факторы могут влиять на формирование базового уровня иммунных протеасом в гепатоцитах? К числу сигнальных молекул, индуцирующих экспрессию иммунных субъединиц протеасом, относится окись азота. Мы показали, что к концу третьей постнатальной недели содержание nNOS в печени возрастает в 1,7 раза по сравнению с П7. Этот результат указывает на возможность индукции экспрессии иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 в гепатоцитах по сигнальному пути с участием nNOS.

Вместе с тем, важно понять, возможно ли увеличение экспрессии иммунных протеасом в эмбриональной печени при воспалении подобно тому, что происходит у взрослых особей. Для ответа на этот вопрос самкам на 12-й день беременности вводили LPS и через 5 и 7 дней исследовали изменения в пуле протеасом печени плодов. Оказалось, что повышенная экспрессия иммунных протеасом при воспалении возможна в печени уже на 17 и 19 день эмбрионального развития, несмотря на то, что вторичные лимфоидные органы в этот период еще не сформированы. Полученный результат указывает на высокую пластичность иммунных реакций на уровне иммунных протеасом.

Работа поддержана РФФИ, грант № 15-04-03494-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ротанова Т. В., Абрамова Е. Б., Шарова Н. П. От парадокса – к Нобелевской премии / Т. В. Ротанова, Е. Б. Абрамова, Н. П. Шарова // Биологические мембраны.– 2005.– Т. 22.– С. 146-151.
2. Шарова Н. П. Иммунные протеасомы и иммунитет / Н. П. Шарова // Онтогенез.– 2006.– Т. 37.– С. 171-178.
3. Особенности экспрессии иммунных протеасом в развитии центральной нервной системы у крыс / А. Ш. Орлова, Ю. В. Люпина, С. Б. Абатурова и др. // Биоорганическая химия.– 2014.– Т. 40.– С. 703-711.

IMMUNE PROTEASOME PATTERN IN EMBRYONAL AND EARLY POSTNATAL DEVELOPMENT OF RAT IMMUNE SYSTEM

Sharova N. P., Karpova Ya.D., Astakhova T. M., Lyupina Yu.V.

Koltsov N. K. Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The dynamics of the immune proteasome expression in early development of rat spleen and liver was analyzed. The increase of the immune proteasome content in the spleen by the third postnatal week is connected with the white pulp formation, and in the liver – with the increase of their expression in hepatocytes. These processes are accompanied by the enhancement of the MHC class I molecules level. The regulation of the immune proteasome expression in the liver is likely to be realized through the signal path with neuronal NO synthase participation.

Keywords: immune proteasomes, immune system, early development.

МЕЛАТОНИН В КОНТРОЛЕ БАЛАНСА TH17/TREG: ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ В РАЗВИТИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Глебездина Н. С.

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

Исследована роль мелатонина в регуляции баланса регуляторных Т-клеток (Treg) и Th17, которые осуществляют диаметрально противоположные функции, а именно формирование периферической толерантности материнского организма к генетически чужеродному (полуаллогенному) плоду или «срыв» ее и, как следствие, аборт, соответственно. Показано, что у здоровых доноров гормон в физиологических дозах индуцирует формирование Th17 в культуре интактных Т-лимфоцитов, но не оказывает статистически значимого действия на дифференцировку Treg, сдвигая баланс Th17/Treg в направлении Th17. В активированном варианте статистически значимого влияния физиологических доз мелатонина на формирование Th17/Treg не выявлено.

Ключевые слова: мелатонин, Th17, Treg, беременность.

Гормон мелатонин, основным источником синтеза которого является эпифиз, участвует в регуляции широкого спектра биологических реакций в организме. В период гестации мелатонин активно синтезируется также яичниками и плацентой. Сывороточная концентрация гормона повышена при беременности, она последовательно нарастает в ходе гестации [1]. Показано, что мелатонин свободно проходит через плаценту и защищает от окислительного повреждения плод, а также материнские ткани и плаценту. Наряду с антиоксидантным действием, гормон регулирует циркадные ритмы (в том числе у плода), контролирует гормональный фон при беременности, выступает как цитопротективный агент, а также обладает выраженным иммуномодулирующим действием [1]. На важную роль мелатонина в развитии беременности указывает тот факт, что снижение уровня данного гормона ассоциировано с нарушениями или осложнениями в течении беременности, в частности, с преэклампсией, которая часто сопровождается преждевременными родами, а также является причиной материнской или младенческой смертности [2]. В настоящее время мелатонин

рассматривается как перспективный препарат для предупреждения развития преэклампсии у пациентов с повышенным риском развития данного отклонения [3].

В то же время известно, что гормон способен эффективно регулировать функции клеток иммунной системы: практически все основные типы иммуноцитов экспрессируют рецепторы для мелатонина и чувствительны к действию данного гормона [4]. В первую очередь это относится к субпопуляции CD 4$^+$ Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17), поскольку один из двух ключевых факторов дифференцировки Th17, RORα, служит одновременно рецептором для мелатонина. Мы в недавнем исследовании продемонстрировали способность гормона регулировать дифференцировку данной Т-клеточной субпопуляции [5]. Учитывая, что RORα участвует и в контроле другой Т-клеточной субпопуляции, регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), а также тот факт, что Th17 и Treg развиваются из общего Т-клеточного предшественника, и выбор клеткой пути развития зависит от контекста, в котором она активируется антигеном, мы в настоящей работе оценили роль мелатонина в регуляции баланса Th17/Treg. Исследование проводили на фракционированных CD 4$^+$ Т-лимфоцитах здоровых доноров, которые культивировали без активатора (спонтанный вариант) и на фоне стандартной поликлональной активации (анти-CD 3/CD 28). Показано, что гормон в физиологических дозах индуцирует формирование Th17 в культуре интактных Т-лимфоцитов (что подтверждается как повышением уровня CD 4$^+$RORγι$^+$ Т-клеток (процент CD 4$^+$RORgt$^+$ Т-клеток в культуре: 0,75 ± 0,063 в контроле без гормона, 1,39 ± 0,268 для концентрации мелатонина 10 пкг/мл, $p < 0,05$ – в сопоставлении с контролем), так и данными по внутриклеточной экспрессии IL-17A (процент CD 4$^+$ IL-17A$^+$-клеток в культуре: 0,718 ± 0,057 в контроле без гормона, 2,34 ± 0,507 для концентрации мелатонина 10 пкг/мл, 1,52 ± 0,211 для концентрации мелатонина 100 пкг/мл, $p < 0,05$ – в сопоставлении с контролем)), но не оказывает статистически значимого действия на дифференцировку Treg, сдвигая баланс Th17/Treg в направлении Th17. В активированном варианте статистически значимого влияния физиологических доз мелатонина на формирование Th17/Treg не выявлено.

Полученные данные ставят на повестку дня вопрос о роли мелатонина в регуляции иммунной системы во время беременности, в частности, в контроле баланса Th17/Treg: с одной стороны, активация данных Т-клеточных субпопуляций играет ключевую роль в формировании иммунной толерантности материнского организма к генетически чужеродному (полуаллогенному) плоду, причем Treg обеспечивают формирование периферической толерантности, а гиперактивация Th17, напротив, приводит к ее «срыву» и, как следствие, к аборту; с другой стороны, уровень мелатонина, как упоминалось выше, изменяется в период беременности и последовательно увеличивается в ходе ее развития [1]. А перспектива фармакологического использования мелатонина у беременных [3] указывает на необходимость исследования роли в этом процессе доз гормона, соответствующих его концентрации в крови при мелатонин-зависимой терапии, что в итоге позволит обосновать целесообразность (или, напротив, нецелесообразность) такой терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-60094.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Melatonin and pregnancy in the human / H. Tamura, Y. Nakamura, M. P. Terron et al. // Reprod Toxicol.– 2008.– V. 25 (3).– P. 291-303.
2. Lanoix D., Guérin P., Vaillancourt, C. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy / D. Lanoix, P. Guérin, C. Vaillancourt // J. Pineal Res.– 2012.– V. 53 (4).– P. 417-425.
3. Phase I pilot clinical trial of antenatal maternally administered melatonin to decrease the level of oxidative stress in human pregnancies affected by preeclampsia (PAMPR): study protocol / S. R. Hobson, R. Lim, E. E. Gardiner et al. // BMJ Open.– 2013.– V. 3 (9).– e003788.
4. Melatonin counteracts alterations in oxidative metabolism and cell viability induced by intracellular calcium overload in human leucocytes: changes with age / J. Espino, I. Bejarano, S.D Paredes et al. // Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.– 2010.– V. 107 (1).– P. 590-597.
5. Куклина Е. М. Роль мелатонина в контроле дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкин-17 (Th17) / Е. М. Куклина, Н. С. Глебездина, И. В. Некрасова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2015.– Т. 160, № 11.– С. 604-607.

MELATONIN IN THE TH17/TREG BALANCE CONTROL: POTENTIAL ROLE IN THE DEVELOPMENT OF PREGNANCY

Glebezdina N. S.

Federal State Budget Establishment of Science Institute of ecology and genetics of microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

The role of melatonin in the balance regulation of regulatory T-cell (Treg) and Th17 has been studied. These T-cell subpopulations implement opposite functions, namely the formation of peripheral tolerance of maternal organism genetically alien (semiallogenic) fetus or "failure" of it and, as a consequence, abortion. It is shown that for the hormone of healthy donors in physiological doses induces formation of Th17 in a culture of intact T lymphocytes, but doesn't have statistically significant effect for the differentiation of Treg, shifting Th17/Treg balance toward Th17. Statistically significant influence of physiological doses of melatonin for the formation of Th17 / Treg has not been identified for the activated form.

Keywords: melatonin, Th17, Treg, pregnancy.

ОСОБЕННОСТИ РЕСТРУКТУРИЗАЦИИ ХРОМАТИНА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ПАТОЛОГИИ И ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Евглевский А. А., Нестерова И. В., Ковалева С. В.

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

Методом поляризационной микроскопии изучен уровень реструктуризации хроматина нейтрофильных гранулоцитов у больных с различными видами патологии. Показано, что уровень реструктуризации хроматина нейтрофильных гранулоцитов тесно связан с характером и тяжестью патологического процесса.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, реструктуризация хроматина, оптическая анизотропия.

В настоящее время нейтрофильные гранулоциты (НГ) рассматриваются как уникальная мультипотентная популяция клеток иммунной системы, относящаяся к врожденному иммунитету и обладающая при этом другими очень важными функциональными возможностями, позволяющими активировать и регулировать адаптивный иммунитет, а также способствовать его полноценной реализации [1]. Установлено, что НГ способны к транскрипционно-зависимому синтезу белка теплового шока [2] и к экспрессии РНК-кодированных фагоцитарных рецепторов [3]. В то же время существует метод поляризационной микроскопии, использующий оптический анизотропный эффект для изучения топологических свойств ядерного хроматина. Он позволяет эффективно выявлять структурные характеристики ядерного материала на разных этапах функционирования клетки [4]. Величина выявляемой анизотропии ядра отражает структурно-молекулярную упорядоченность хроматина, основного носителя генетической информации в клетке. Снижение уровня анизотропии может интерпретироваться как показатель деспирализации хроматина, сопровождающейся ослаблением химических связей комплекса ДНК-гистон в ядрах

клеток. Подобные явления указывают на биологическую активацию хроматина, что является предпосылкой для появления матричной активности ДНК с последующей экспрессией нескольких сотен генов и дальнейшим белковым синтезом.

Целью исследования являлось изучение особенностей реструктуризации хроматина (РХ) ядер НГ у больных с различными видами патологии и определение их диагностического значения.

В исследование были включены пациенты с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБ ДПК) – 54 пациента; ревматоидным артритом (РА) – 19 пациентов; колоректальным раком (КРР) – 17 пациентов; хроническим миелолейкозом (ХМЛ) – 17 больных; острым деструктивным панкреатитом (ОДП)-28 пациентов; флегмонами челюстно-лицевой области (ФЧЛО) – 100 больных; лептоспирозом (ЛСП) – 16 пациентов. Диагноз заболеваний устанавливался с использованием комплекса методов, включающих клиническое, инструментальное и лабораторное обследование и соответствующих стандартам оказания медицинской помощи больным с данными видами патологии. Контролем для каждой из перечисленных групп пациентов служили репрезентативные контрольные группы здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту, численностью от 18 до 50 человек.

В соответствии с поставленными задачами нами были исследованы особенности реструктуризации хроматина (РХ) ядер НГ по уровню оптической анизотропии (ОА) хроматина ядер НГ с использованием модифицированного метода Нестеровой и соавт. [4]. Для определения уровня реструктуризации хроматина НГ мазки крови окрашивали: толуидиновым синим при pH-5,0. Изучение уровня ОА проводили с помощью поляризационного микроскопа МП-8 при скрещенном анализаторе и поляризаторе. Для учета интенсивности анизотропного эффекта в ядрах НГ использовали модификацию полуколичественного метода Астальди и Верга, адаптированного для изучения ядер. Все ядра были разделены по уровню оптической анизотропии (ОА) на 5 групп, каждой из которых была присвоена определенная величина ОА (степень ОА «0» означала полное отсутствие анизотропии, что соответствовало наибольшей степени активации хроматина ядра; степень ОА «4» означала, что анизотропно все ядро, что соответствовало отсутствию активности хроматина; степени анизотропии от «1» до «3» соответствовали промежуточным значениям анизотропии ядра. Учитывая вышесказанное уровень РХ является величиной обратной ОА и рассчитывался по формуле – РХ= 1/ОА. Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов вариационной статистики с расчетом средних величин (M), ошибок средних величин (±m), средних квадратичных отклонений (±σ), коэффициента вариации (CV), Вычисления проводились с использованием компьютерной программы Biostat 4.0 для Windows и DOS IBM-PC [Primer of Biostatistics, 4th Edition, S. A. Glantz, McGraw-Hill].Отличие от контрольных значений во всех случаях было статистически значимо (уровень значимости не ниже $p<0,05$).

Было установлено, что уровень РХ НГ связан с характером и тяжестью патологического процесса. Так при ЯБ ДПК, осложненной стенозом, наблюдается выраженная РХ ядер НГ. У пациентов с РА РХ свидетельствует о существенной гиперактивации НГ, как периферической крови, так и синовиальной жидкости. Было также установлено, что при ФЧЛО НГ экссудата обнаруживают высокий уровень РХ, снижающийся по мере нарастания репаративных процессов в ране. Аналогично вели себя НГ при ОДП и ЛСП, при этом в случае тяжелого течения заболевания уровень РХ снижался. При неопластических заболеваниях, таких как ХМЛ и КРР, в целом наблюдалась противоположная, относительно друг друга, картина динамики РХ. Если при ХМЛ наблюдалось увеличение уровня РХ, то при КРР, напротив, имело место ослабление явлений РХ, вплоть до полной блокады этого процесса. Анализ всей совокупности результатов исследований показал, что показатель РХ ниже 0,33 свидетельствует о сниженной активационной готовности НГ, а показатель, превышающий значения РХ равное 0,61, свидетельствует об адекватной реакции системы НГ на индуцирующее воздействие факторов патогенности.

Таким образом, определение уровня РХ НГ по уровню ОА представляет новый подход к определению функциональной активности НГ и может быть перспективным в диагностическом аспекте и использоваться в качестве диагностического и прогностического критерия при различных видах патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нейтрофильные гранулоциты – ключевые клетки иммунной системы / И. В. Нестерова, И. Н. Швыдченко, В. А. Роменская и др. // Аллергология и иммунология – 2008. Т. 9(4).– С. 432-435.
2. Eid N. S., Kravrilli K. E., Lanks K. W. Heat-shock protein synthesis by humam polymorphonuclear cells / N. S. Eid, K. E. Kravrilli, K. W. Lanks // J. Exp. Med.– 1987.– V. 165(5).– C. 1448-1452.
3. Jack R. M. Selective synthesis of m RNA and proteins by human peripheral blood neutrophils / R. M. Jack, D. T. Fearon // J. Immunol.– 1988.– V. 140(12).– C. 4286-4293.
4. Нестерова И. В. Особенности активационного потенциала ядер нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии / И. В. Нестерова, А. А. Евглевский, Е. В. Фомичева // Цитокины и воспаление.– 2004.– Т. 3(2).– С. 52-55.

FEATURES OF RESTRUCTURING CHROMATIN OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN DIFFERENT TYPES OF PATHOLOGY AND DIAGNOSTIC VALUE

Evglevsky A. A., Nesterova I. V., Kovaleva S. V.

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Polarization microscopy method studied the level of chromatin restructuring neutrophilic granulocytes in patients with different types of pathology. It is shown that level of chromatin restructuring of neutrophilic granulocytes is closely linked to the nature and severity of the disease process.

Keywords: neutrophil granulocytes restructuring of the chromatin, the optical anisotropy.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ ПРЕЭКЛАМПСИИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Панова И. А., Рокотянская Е. А., Хлипунова Д. А., Сытова Л. А.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

Изучены особенности экспрессии молекул клеточной адгезии (CD11b, CD11c, CD31, CD49b, CD56, CD62L, CD99) нейтрофилами и моноцитами венозной крови у беременных женщин с хронической артериальной гипертензией и с преэклампсией на фоне хронической артериальной гипертензии. Выявлено, что дополнительными критериями для диагностики преэклампсии у беременных женщин с хронической артериальной гипертензией могут служить уровень экспрессии моноцитами молекул $CD11b^+$ и показатель экспрессии нейтрофилами молекул $CD49b^+$.

Ключевые слова: беременность, хроническая артериальная гипертензия, преэклампсия, молекулы клеточной адгезии.

Актуальность проблемы поиска новых критериев диагностики присоединения преэклампсии (ПЭ) у женщин с хронической артериальной гипертензией (ХАГ) связана с тем, что артериальная гипертензия (АГ) у беременных является очень распространенным и опасным состоянием среди осложнений гестационного процесса. В последнее время отмечено увеличение распространенности АГ во время беременности за счет ее хронических форм [1]. По данным зарубежных авторов у 78 % женщин с тяжелой ХАГ и у 20-25 % беременных с АГ 1 степени возникает ПЭ [2]. Затруднения в диагностике присоединившей-

ся ПЭ у беременных с ХАГ могут возникнуть в связи с волнообразными изменениями артериального давления в течение беременности, его выраженным подъемом в конце гестационного срока [3]. Ни обострение гипертензии, ни отеки не являются надежными показателями развивающейся ПЭ. Нами ранее было показано, что развитие гипертензивных нарушений у беременных сопровождается изменением экспрессии молекул адгезии нейтрофилами, что может применяться для дифференциальной диагностики АГ различного генеза [4].

Цель настоящего исследования – разработать диагностические критерии присоединения ПЭ у беременных женщин с ХАГ на основании изучения экспрессии молекул клеточной адгезии (CD11b, CD11c, CD31, CD49b, CD56, CD62L, CD99) нейтрофилами и моноцитами венозной крови.

Материал и методы исследования. На базе ФГБУ "ИвНИИ МиД им. В. Н. Городкова" Минздрава России было обследовано 114 беременных женщин в сроке 20-37 недель. Первую группу составили 36 женщин с ХАГ (шифр по МКБ-Х – О10), вторую – 33 пациентки с ХАГ с присоединившейся ПЭ (шифр по МКБ-Х – О11). В контрольную группу вошли 45 женщин с неосложненным течением беременности без гипертензивных расстройств.

Материалом для исследования являлась периферическая венозная кровь. Определение содержания моноцитов и нейтрофилов, экспрессирующих молекулы адгезии проводилось методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson, США). В нейтрофильном ($CD14^-CD45^+$) и моноцитарном ($CD14^+CD45^+$) гейтах определяли относительное содержание $CD62L^+$, $CD11b^+$, $CD11c^+$, $CD49b^+$, $CD31^+$, $CD56^+$, $CD99^+$ клеток. Статистический анализ полученных результатов осуществлялся в пакете прикладных лицензионных программ "Microsoft Office 2010", "Statistica for Windows 6.0" и "MedCalc v7.4.4.1". Проверка рядов данных на нормальность распределения осуществлялась с помощью критериев Колмогорова и Шапиро-Уилка. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивалась по непараметрическому критерию U (Манна-Уитни) и t-критерию Стьюдента (уровень значимости $p<0,05$ считался достоверным).

Результаты. По результатам исследования экспрессии молекул клеточной адгезии нейтрофилами выявлено, что в группе женщин с ХАГ в периферической крови отмечался более высокий уровень $CD11c^+$, $CD99^+$ и $CD31^+$ нейтрофилов ($p<0,05$ во всех случаях по сравнению с контрольной группой). При ПЭ на фоне ХАГ, уровень $CD62L^+$ нейтрофилов был снижен, а относительное содержание $CD49b^+$, $CD99^+$ и $CD31^+$ клеток повышено по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$, $p<0,001$, $p<0,001$ и $p<0,001$ соответственно). Уровни $CD49b^+$ и $CD99^+$ нейтрофилов у женщин с ПЭ на фоне ХАГ были достоверно выше, а значение $CD11c^+$ достоверно ниже, чем в группе с ХАГ ($p<0,001$, $p<0,001$ и $p<0,05$ соответственно).

Содержание клеток, экспрессирующих молекулы CD62L, CD11b, CD99, CD49b, CD31 в популяции моноцитов в обеих группах по сравнению с неосложненной беременностью не изменялось ($p>0,05$ во всех случаях). Уровень $CD11c^+$ моноцитов в группе с ХАГ снижался по сравнению с контрольной группой ($p<0,02$). У женщин с ПЭ и ХАГ в крови определялся сниженный уровень клеток $CD11c^+$ и повышенное содержание $CD56^+$ в популяции моноцитов по сравнению с контрольной группой ($p<0,02$ в обоих случаях). Уровень $CD11b^+$ клеток в популяции моноцитов у женщин с ПЭ на фоне ХАГ был достоверно повышен по сравнению с пациентками, имеющими ХАГ без ПЭ ($p<0,05$). Выявленные нами разнонаправленные изменения экспрессии молекул адгезии периферическими фагоцитами обусловлены различными патогенетическими механизмами формирования гипертензии при ПЭ и при ХАГ [5].

С целью выявления наиболее чувствительных и специфичных критериев диагностики присоединения ПЭ к ХАГ был проведен ROC-анализ. Выявлено, что наиболее информативными показателями в качестве диагностических критериев данной патологии являются: пограничное значение показателя экспрессии моноцитами молекул $CD11b^+$ – 80,5 % (площадь под ROC-кривой AUC=0,801, чувствительность 68,2 %, специфичность 76,2 %) и пограничное значение уровня экспрессии нейтрофилами молекул $CD49b^+$ – 73,0 % (AUC=0,893, чувствительность 88,5 %, специфичность 91,7 %).

Таким образом, дополнительными критериями для диагностики ПЭ у беременных женщин с ХАГ могут служить определяемые в периферической венозной крови уровень экспрессии моноцитами молекул $CD11b^+$ и показатель

экспрессии нейтрофилами молекул CD49b+, что позволит своевременно выявить развитие такого грозного осложнения гестационного процесса, как ПЭ и выбрать необходимую тактику ведения пациентки с ХАГ.

Работа поддержана Грантом Президента РФ № МК-6885.2015.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лечение АГ у беременных / О. В. Макаров, Е. В. Волкова, И. Н. Винокурова и др. // Проблемы репродукции.– 2011.– Т. 6.– С. 87-92.
2. Audibert F., Benchimol Y., Benattar C. Prediction of preeclampsia or intrauterine growth restriction by second trimester serum screening and uterine Doppler velocimetry / F. Audibert, Y. Benchimol, C. Benattar // Fetal Diagn Ther.– 2005.– V. 20.– P. 48.
3. Шехтман М. М. Рук-во по экстрагенитальной патологии у беременных / М. М. Шехтман // М.: Триада-Х.– 2005.– 816 с.
4. Характеристика зрелости и адгезионной способности нейтрофилов при преэклампсии / И. А. Панова, А. В. Кудряшова, Д. А. Хлипунова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8(17).– С. 360-364.
5. Lindheimer M. D., Taler S. J., Cunningham F. G. Hypertension in pregnancy / M. D. Lindheimer, S. J. Taler, F. G. Cunningham. // Journal of the American Society of Hypertension.– 2010.– Т. 4(2).– С. 68-78.

IMMUNOLOGICAL CRITERIA FOR DIAGNOSIS OF PREECLAMPSIA IN PREGNANT WOMEN WITH CHRONIC ARTERIAL HYPERTENSION

Panova I. A., Rokotyanskaya E. A., Khlipunova D. A., Sytova L. A.

Federal State Budget Establishment Ivanovo's Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V. N. Gorodkov of Ministry of Health Care of Russian Federation, Ivanovo, Russia

The peculiarities of expression of cell adhesion molecules (CD11b, CD11c, CD31, CD49b, CD56, CD62L, CD99) neutrophils and monocytes venous blood in pregnant women with chronic arterial hypertension and preeclampsia on the background of chronic arterial hypertension. It is revealed that supplementary criteria for the diagnosis of preeclampsia in pregnant women with chronic arterial hypertension can be a level of expression of molecules by monocytes CD11b+, and the rate of expression by neutrophils of molecules CD49b+.

Keywords: pregnancy, chronic arterial hypertension, preeclampsia, a cell adhesion molecule.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС И ИНДУКЦИИ ДОНОРСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ

Карпова Я. Д.[1], Устиченко В. Д.[2], Божок Г. А.[2], Степанова А. А.[1], Люпина Ю. В.[1], Шарова Н. П.[1]

[1]ФГБУН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия, [2]Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

В данной работе изучались клеточный иммунный ответ и особенности распределения субъединиц иммунных протеасом LMP7 и LMP2 и активатора протеасом PA28α в аллотрансплантатах щитовидной железы крыс при индукции донорспецифической иммунологической толерантности через 7, 14 и 28 дней после трансплантации. Показано, что нормальное функционирование ткани щитовидной железы трансплантатов сопровождается общим снижением экспрессии иммунных протеасом, сниженной экспрессией активатора PA28α в клетках фолликула щитовидной железы и снижением количества антигенпредставляющих клеток на фоне сохраняющейся инфильтрации CD8+ Т-лимфоцитами.

Ключевые слова: иммунологическая толерантность, иммунные протеасомы, аллотрансплантация.

Одним из решений проблемы отторжения при трансплантации органов и тканей является адресное переключение иммунной системы с выработки иммунного ответа на выработку донорспецифической толерантности (ДСТ). Такую толерантность можно запустить введением антигенов донора в портальную вену печени реципиента. Данный метод используется в экспериментальных моделях для пролонгирования жизни трансплантатов различных тканей и органов, мы же впервые использовали его при трансплантации эндокринных желез. В настоящем исследовании мы описали клеточные и молекулярные процессы, происходящие при трансплантации щитовидной железы с индукцией ДСТ и без индукции ДСТ. Акцент был на изучении важных участников иммунологических реакций – иммунных протеасом, протеолитических комплексов, образующих антигенные эпитопы для МНС класса I. Роль иммунных протеасом в поддержании толерантности до сих пор не определена, однако литературные данные и наши собственные исследования [1] позволяют утверждать, что функционирование иммунных протеасом связано с поддержанием невосприимчивости к чужеродному материалу.

Индукция ДСТ проведена введением спленоцитов крыс доноров Вистар в портальную вену печени крыс реципиентов Август. Параллельно удаляли щитовидную железу реципиентов. Через 7 дней трансплантировали ткань щитовидной железы от крыс Вистар под капсулу почки крыс Август. Для дополнительного контроля были проведены аналогичные операции и трансплантации между крысами Вистар. Через 7, 14 и 28 дней после трансплантации радиоизотопным методом определяли уровень Т4 общего в крови реципиентов и исследовали трансплантаты щитовидной железы гистологически и методом иммунофлуоресцентного мечения клеток на криосрезах с применением первичных антител к иммунокомпетентным клеткам: CD 3, CD 4, CD 8, маркерам макрофагов, дендритных клеток, CD 90, MHCII; антител к субъединицам иммунных протеасом LMP7 и LMP2; активатору протеасом PA28α и соответствующих вторичных антител, меченных флуорохромами. Методом иммуноблоттинга были исследованы трансплантаты через 28 дней после трансплантации с применением антител к субъединицам LMP7, LMP2 и PA28α, общий пул протеасом оценивали с помощью антител к сумме субъединиц α.

Методом иммуноблоттинга показано, что в трансплантатах щитовидной железы всех исследованных экспериментальных групп животных происходит значительное увеличение количества иммунных протеасом с субъединицами LMP2 и LMP7 по сравнению с трансплантатами контрольной группы. Количество активатора PA28α больше в трансплантатах крыс без индукции ДСТ, чем с индукцией ДСТ, а в трансплантатах контрольной группы он практически отсутствует.

В группе животных без индукции ДСТ на 7 день после трансплантации наблюдается активное отторжение трансплантата: присутствует большое количество антигенпредставляющих клеток (АПК), в частности макрофагов и дендритных клеток, начинается инфильтрация $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитами. Фолликулы щитовидной железы еще присутствуют, но в крови всех животных наблюдается низкий уровень общего Т4. Иммунные протеасомы с субъединицами LMP7 и LMP2 присутствуют во всех иммунокомпетентных клетках и в клетках сохранившихся фолликулов щитовидной железы, причем везде экспрессируются на высоком уровне. На 14 день после трансплантации в ткани трансплантата функционирующих фолликулов уже нет, еще присутствуют АПК, $CD8^+$ Т-лимфоцитов становится значительно больше. Иммунные протеасомы с LMP2 и LMP7 субъединицами присутствуют во всех иммунокомпетентных клетках, причем появляются $CD4^+$ клетки, экспрессирующие иммунные субъединицы на очень высоком уровне. К 28 дню трансплантат полностью замещается соединительной тканью, в которой встречаются единичные макрофаги и лимфоциты.

В группе крыс с индукцией ДСТ на 7 день после трансплантации у крыс наблюдается вариативность иммунного ответа. Часть трансплантатов находится в терминальной стадии отторжения, клеток фолликулов щитовидной железы практически нет, присутствует большое количество инфильтрирующих $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов. Стоит отметить, что АПК значимо меньше, чем на 7 день в трансплантатах аналогичной группы животных без индукции толерантности. Все это свидетельствует об ускоренном протекании процессов отторжения. На 14 день после трансплантации такие

трансплантаты уже полностью замещаются соединительной тканью.

Другая часть трансплантатов группы животных с индукцией ДСТ остается функционально активной на всех исследуемых сроках, что подтверждается наличием в крови таких животных нормального уровня общего Т4 и сохраняющимися фолликулами щитовидной железы. Однако всегда присутствует инфильтрация $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитами, обширная на 7 и 14 дни, несколько снижающаяся на 28 день. На 7 день после трансплантации наблюдается уменьшение количества макрофагов и других АПК, которое увеличивается к 14 дню и снова снижается к 28 дню. В регионах с сохранившимися фолликулами наблюдается снижение количества АПК и общего уровня иммунных протеасом с субъединицами LMP7 и LMP2 по сравнению с аналогичной группой без индукции ДСТ, что свидетельствует об уходе от иммунного ответа, несмотря на присутствие значительного количества инфильтрованных лимфоцитов. Стоит также отметить, что на 14 день, как и в группе животных без индукции толерантности, наибольшее количество иммунных субъединиц наблюдается в CD4 экспрессирующих клетках, на 28 день после трансплантации такие клетки больше не выявляются.

Стоит отдельно отметить особенности экспрессии активатора протеасом PA28α. Активатор присутствует в некоторых АПК всех исследуемых групп животных, однако, основным сайтом его экспрессии на всех исследуемых сроках в группе животных без индукции ДСТ являются функционирующие клетки фолликулов щитовидной железы или же остаточные островки с фолликулярными клетками. В группе же животных с индукцией ДСТ не выявлено повышенного уровня экспрессии PA28a в фолликулярных клетках.

Таким образом, сниженный уровень экспрессии иммунных протеасом и активатора PA28α в функционирующих регионах трансплантата может являться способом ухода от иммунного ответа и, параллельно с уменьшение количества АПК, замедлять отторжение, способствуя временному приживлению трансплантата. Работа поддержана РФФИ, грант № 16-34-60083 мол_а_дк.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Изменение функции протеасом после индукции донор-специфической толерантности у крыс при аллотрансплантации ткани яичника / Я. Д. Карпова, А. А. Степанова, Ю. В. Богомягкова и др. // Известия РАН, Серия биологическая.– 2012.– Т. 3.– С. 244-249.

IMMUNE RESPONSE IN THYROID ALLOTRANSPLANTATION UNDER DONOR SPECIFIC IMMUNE TOLERANCE INDUCTION

Karpova Ya.D.[1], Ustichenko V. D.[2], Bozhok G. A.[2], Stepanova A. A.[1], Lyupina Y. V.[1], Sharova N. P.[1]

[1]N. K. Koltsov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia,
[2]Institute of Cryobiology and Cryomedicine NASU, Kharkov, Ukraine

We study the cellular immune response, immune proteasome subunits and the proteasome activator PA28α distribution into thyroid rat allotransplant in case of donor specific immune tolerance induction on 7th, 14th and 28th days after transplantation. The overall decrease in immune proteasome expression, the decrease of PA28α expression in follicular thyroid cells and the decrease of antigen-presenting cells corresponds the normal functioning of thyroid transplant even under $CD8^+$ T-lymphocyte infiltration.

Keywords: immune tolerance, immune proteasome, allotransplantation.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛАСТЕРА TLR10–TLR1–TLR6 В ПОПУЛЯЦИИ РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ И ПОПУЛЯЦИЯХ ЕВРОПЕЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Евдокимов А. В.

ФГБОУ ВПО Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

Статья посвящена рассмотрению генного кластера TLR10–TLR1–TLR6 в популяции русских Челябинской области. Впервые получены данные о распределении в популяции русских трёхлокусных гаплотипов по заменам 721A>C TLR10, 1805T>G TLR1 и 745C>T TLR6. Выявлены значимые различия с популяциями тосканцев и иберийцев, в то время как от популяций Северо-Запада Европы русские Челябинской области достоверно не отличались. Эти данные могут быть использованы при определении предикторов аутовоспалительных и инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: толл-подобные рецепторы, кластер TLR10 — TLR1 — TLR6, однонуклеотидные полиморфизмы, русские, Челябинская область.

На протяжении всей истории своего эволюционного развития человечество сталкивалось с проблемой адаптации к условиям обитания. Одним из ведущих факторов окружающей среды являлся микробный спектр и микробная нагрузка, характерные для конкретной территории [1]. Таким образом, точкой приложения действия естественного отбора становились гены, отвечающие за взаимодействие организма человека и микроорганизмов. На первый план в таком взаимодействии выходят толл-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLRs), отвечающие за первичное «узнавание» иммуноцитами компонентов микробных клеток. Полногеномные исследования показали, что следы действия адаптивного отбора распределены среди генов TLRs неравномерно. Одной из «точек концентрации» действия отбора является генный кластер TLR 10–TLR 1–TLR 6 [2]. Этот кластер расположен на коротком плече 4 хромосомы и содержит множество генетических полиморфизмов, ассоциированных с развитием различных заболеваний инфекционной или аутоиммунной природы. Изучение функциональной активности вариантов молекул TLR 1, 6, 10, обусловленных данными полиморфизмами, показало, что эти варианты определяют различный уровень выработки про- и противовоспалительных цитокинов в ответ на стимуляцию соответствующими лигандами, а значит и иммунореактивность в целом.

Челябинская область – это территория проживания популяций совершенно различного происхождения. С давних пор эта территория являлась своего рода перекрёстком путей миграции народов между Европой и Азией. В настоящее время, в эпоху глобализации происходит постепенное смешение разных популяций, и потому остро встаёт необходимость в проведении иммуногенетических исследований популяций. Изучение генетического профиля популяций позволит получить не только сведения об инфекционной нагрузке, которой подвергалась данная популяция в прошлом, но и предсказать реакцию иммунной системы индивидуального организма в современных условиях (выработка иммунитета при вакцинации, риск возникновения аутоиммунных заболеваний) [3].

Цель работы. Определить частоту встречаемости трёхлокусных гаплотипов TLR 10–TLR 1–TLR 6 по точковым полиморфизмам 721A>C (ген TLR 10), 1805T>G (ген TLR 1) и 745C>T (ген TLR 6) в популяции русских Челябинской области и провести сравнение

с аналогичными данными для некоторых мировых европейских популяций.

Материалы и методы. В исследование включены представители популяции русских (n=167), проживающих постоянно на территории Челябинской области (ЧО). ДНК была выделена из образцов венозной крови реагентами Axygen (Quiagen, Германия). Типирование по точковым полиморфизмам 1805T>G гена TLR 1 и 721A>C гена TLR 10 проводилось с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (рестриктазы AluI и NlaIII соответственно). Определение полиморфизма 745C>T гена TLR 6 проводилось аллель-специфической ПЦР (реагенты НПФ «Литех», Москва). Результаты детектированы в ходе гель-электрофореза с последующей визуализацией в ультрафиолете. Для сравнения с популяцией русских были использованы данные о распределении гаплотипов TLR 10–TLR 1–TLR 6 в 5 европейских популяциях: британцев (n=91), финнов (n=99), смешанной популяции европейцев северо-западного происхождения (европейцы С-З; n=99), иберийцев (n=107) и тосканцев (n=107). Информация о частотах взята из открытой базы данных 1000genomes (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/). Статистическая обработка данных проведена в программе Arlequin v. 3.5: 1) проверка распределения генных частот на соответствие закону Харди–Вайнберга; 2) оценка частот трёхлокусных гаплотипов (hf) TLR 10–TLR 1–TLR 6; 3). расчёт коэффициента неравновесного сцепления (Δ) для трёх локусов; 4). сравнение частот трёхлокусных гаплотипов между популяциями с использованием критерия χ^2 с поправкой Бонферрони: статистически значимыми считались различия при p<0,01.

Результаты. Распределение генных частот для популяции русских статистически достоверно не отличается от равновесного закона Харди-Вайнберга: (p=0,895, p=0,820 и p=0,897 для генов TLR 10, TLR 1 и TLR 6 соответственно). Расчёт частот трёхлокусных гаплотипов показал, что из 8 гаплотипов, обнаруженных в популяции русских ЧО, наиболее часто встречаются 4 гаплотипа: 721*A-1805*G-745*T (hf=0,362), 721*A-1805*G-745*C (hf=0,240), 721*C-1805*T-745*C (hf=0,198) и 721*C-1805*G-745*C (hf=0,150). Частота остальных гаплотипов составляет менее 0,100. Два гаплотипа (721*A-1805*G-745*T и 721*C-1805*T-745*C) характеризовались положительными значениями коэффициента Δ (0,177 и 0,145 соответственно), что свидетельствует о неравновесном сцеплении локусов в данных гаплотипах. Применение критерия Пирсона для сравнения популяции русских с мировыми популяциями по распределению гаплотипов позволило выявить достоверные различия ($\chi^2_{[35]}$=157,30, p<0,0001). В ходе множественных сравнений изучаемой популяции русских с каждой из европейских популяций было обнаружено, что популяция русских ЧО достоверно отличается от популяций иберийцев и тосканцев ($\chi^2_{[14]}$=86,85, p<0,001) и, в то же время, не имеет отличий от популяций финнов, британцев и европейцев С-З ($\chi^2_{[21]}$=25,90, p=0,210).

Выводы. В целом, относительные частоты трёхлокусных гаплотипов TLR 10–TLR 1–TLR 6 в популяции русских ЧО близки к аналогичным значениям европейских популяций северо-западного происхождения. Это согласуется с данными генотипирования популяции русских по генам митохондриальной ДНК и системы HLA. В соответствии с этими данными, генофонд русской популяции близок к генофондам западно-европейских популяций, что отражает историю формирования популяции русских, включавшую значительный европейский компонент [4, 5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barreiro L. B. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defense genes. / L. B. Barreiro, L. Quintana-Murci // Nature Review Genetics.– 2010.– № 11.– P. 17-30.
2. Dannemann M. Introgression of Neandertal- and Denisovan-like Haplotypes Contributes to Adaptive Variation in Human Toll-like Receptors / M. Dannemann, A. M. Andres, J. Kelso // The American Journal of Human Genetics.– 2016.– № 98.– P. 22-33.
3. Casanova J.– L. Human TLRs and IL-1Rs in Host Defense: Natural Insights from Evolutionary, Epidemiological, and Clinical Genetics / J.– L. Casanova, A. Laurent, L. Quintana-Murci // Annu. Rev. Immunol.– 2011.– № 29.– P. 447-491.
4. Балановская Е. В. Русский генофонд на Русской равнине / Е. В. Балановская, О. П. Балановский.– Москва: Луч, 2007.– 416 с.
5. Чернова М. С. Иммуногенетический профиль популяций Челябинской области (русские, татары, башкиры, нагайбаки) в структуре мировых популяций: автореф. дис. … канд. биол. наук (14.03.09) / Чернова Мария Сергеевна.– Челябинск.– 2014.– 22 с.

A COMPARATIVE ANALYSIS OF THE TLR 10–TLR 1–TLR6 CLUSTER IN CHELYABINSK REGION RUSSIANS AND POPULATIONS OF EUROPEAN ANCESTRY

Evdokimov A. V.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

The article is devoted to the concideration of TLR 10–TLR 1–TLR 6 gene cluster in Chelyabinsk Region Russians. The three-locus haplotype frequencies on 721A>C TLR 10, 1805T>G TLR 1 и 745C>T TLR 6 in Russians were obtained for the first time. There were found significant differences with Toscans and Iberians, while North-West populations did not differ significantly from Russians. Such data could be useful to determine the predictors of autoimmune and infectious diseases.

Keywords: toll-like receptors, TLR 10 — TLR 1 — TLR 6 cluster, single nucleotide polymorphisms, Russians, Chelyabinsk Region.

ИММУННОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ И ЦИТОКИНЫ В ФОРМИРОВАНИИ УРОВНЯ ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЫШЕЙ (СВАхС 57BL/6) F1 В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА

Аникеева О. С., Абрамова Т. Я., Пашкина Е. А., Маркова Е. В., Козлов В. А.

ФГБУ «НИИФКИ» СО РАН, Новосибирск, Россия

Формирование сложных программ поведения в постнатальном онтогенезе связано с функциональной активностью иммунокомпетентных клеток и их способностью продуцировать цитокины, осуществляющие межсистемное взаимодействие.

Ключевые слова: цитокины, иммунные клетки, поведение, онтогенез.

Как известно, развитие поведения в процессе онтогенеза, согласно эпигенетической концепции, находится под влиянием как генетических, так и эпигенетических факторов [1]. С этой точки зрения, взаимозависимый характер функционирования нервной и иммунной систем предполагает необходимость комплексного изучения механизмов влияния трансплантируемых клеток (ИКК) не только на иммунную систему, но и на центральную нервную систему (ЦНС) реципиента в процессе применения методов клеточной терапии. Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о возможности иммуноопосредованного воздействия на формирование уровня поведенческой активности неполовозрелых животных – мышей (СВАхС 57BL/6) F1 в период становления ВНД и иммунной системы в процессе постнатального онтогенеза [2]. Из возможных вариантов влияния вводимых ИКК доноров на ЦНС реципиентов, важнейшим является механизм взаимодействия цитокинов, продуцируемых трансплантируемыми клетками, со специфическими рецепторами клеток мозга и их активация [3, 4].

Материалы и методы. Исследование выполнено на 590 мышах-самцах, гибридах первого поколения (СВАхС 57BL/6) F1 различного возраста, из которых 243 особи составили группу «доноры» (10-12 недельного) и 347 – группу «реципиенты» (4-5 недельного) возраста. Всем животным проводилось определение уровня ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) в тесте «открытое поле» [5].

Схема эксперимента: реципиентам с 4-5 недельного возраста до 10-12 недель проводилась трехкратная трансплантация спленоцитов (в/в, $5{,}0x10^6$ клеток в 0,4 мл RPMI) от мышей-доноров 3-х месячного возраста. Были сформированы 2 опытные группы: группа 1 – реципиенты, получавшие клетки от доноров с высоким уровнем поведенческой активности (n=81); группа 2 – реципиенты, получавшие клетки от доноров с низким уровнем поведенческой активности (n=71); контрольная 3 группа – мыши, которым вводили 0,4 мл RPMI (n=131).

Продукцию интерферона-γ (ИНФ-γ) и интерлейкина-10 (IL-10) оценивали в лизатах головного мозга и селезенки мышей-реципиентов (CBAxC57BL/6) F1. Концентрацию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Для математической обработки полученных данных использовалась статистическая компьютерная программа STATISTICA 10.0 for Windows (StatSoft, USA).

Результаты. Было установлено, что ИКК половозрелых мышей с высоким (гр.1) и низким (гр.2) уровнем ОИП, трансплантируемые сингенным мышам в ювенильный (препубертатный) период их развития, вызывают значимые сдвиги в содержании цитокинов селезенки и мозга реципиентов относительно контрольной группы животных. Так, при трансплантации спленоцитов 4-5 недельным мышам от половозрелых животных с высоким уровнем ОИП, не только способствовал увеличению доли высокоактивных животных в 1 группе реципиентов относительно 3 контрольной группы (28,4 % *vs* 11,7 %; p=0,003;), но и сопровождался сочетанным повышением в селезенке и в мозге реципиентов уровня IL-10 (r=0,69; p=0,013; n=12). При этом содержание IL-10 в селезенке реципиентов 1 группы было выше уровня контрольных животных (26,1 (5,03÷68,3) *vs* 3,2(0,12÷6,9) pg/ml; соответственно, p=0,035). Ранее нами было показано, что спленоциты доноров с высоким уровнем ОИП отличает повышеное содержания клеток, экспрессирующих рецепторы к M-CSF, который, как известно, обладает стимулирующим действием на клетки-предшественники гемопоэза моноцитарно-макрофагального ростка и усиливает цитотоксические свойства зрелых моноцитов. Кроме клеток моноцитарно-макрофагального ростка, рецепторы к M-CSF имеются на клетках нервной системы [3]. В свою очередь, секретируемый активированными моноцитами, макрофагами и другими клетками IL-10 подавляет продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1β, IFNγ) в мозге, которые, как показано ранее, ингибируют двигательную, коммуникативную, исследовательскую активность, а также пищевое и половое поведение животных.

В наших экспериментах трехкратный внутривенный перенос в процессе формирования поведенческой активности 4-5 недельным реципиентам 2 группы спленоцитов от половозрелых животных с низким уровнем ОИП способствовал увеличению доли животных с низким уровнем ОИП: 36,6 % *vs* 23,4 %; относительно группы контроля p=0,05; 36,6 % *vs* 2,5 %, p=0,0001 в сравнении с 1 опытной группой. В указанной второй группе реципиентов была определена прямая корреляционная зависимость между повышением уровня IFNγ в селезенке и в лизатах мозга (r=0,69; p=0,013; n=12). В отличие от 1 группы, где была выявлена обратная функциональная связь между уровнями IFNγ в селезенке и мозге (r= –0,59; p=0,01; n=12) после трансплантации ИКК от доноров с высоким ОИП. Следует также отметить, что нами была установлена прямая корреляционная связь между уровнями IL-10 в селезенках 1 и 2 опытных групп животных (r=0,69; p=0,013) и отсутствие подобной зависимости в лизатах мозга, что свидетельствует о различных механизмах формирования уровня поведенческой активности в данных группах. Кроме того, было выявлено значимое повышение содержания IFNγ в мозге мышей 2 группы относительно 3 контрольной группы животных (2205(2095,5÷2322,5) *vs* 1975,8(1832,4÷2103,4) pg/ml; p=0,023). Ранее нами было показано, что спленоциты доноров с низким уровнем ОИП характеризовались количественной и функциональной активацией Т-лимфоцитов: повышением пролиферативной активности и содержания зрелых Т-клеток. Выделяющиеся при активации Т-клеток цитокины (в том числе, IFNγ, β) служат основными индукторами клеточно-опосредованного иммунного ответа и ассоциированных с ним воспалительных реакций. Нефракционированная взвесь спленоцитов доноров с низким уровнем ОИП, содержащая активированные Т-лимфоциты, способна повлиять на формирование преимущественно низкого уровня поведенческой активности

в группе реципиентов, поскольку указанные цитокины помимо индукции воспаления подавляют поведенческую активность, определяя «болезненное поведение».

Формирование сложных программ поведения в постнатальном онтогенезе связано с функциональной активностью иммунокомпетентных клеток и их способностью продуцировать цитокины, осуществляющие межсистемное взаимодействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дьюсбери Д. Поведение животных: Сравнительные аспекты / Д. Дьюсбери // М: Мир.– 1981.– 480 с.
2. Аникеева О. С., Абрамова Т. Я., Козлов В. А. Формирование поведенческой активности мышей (CBAxC 57BL6) F1 в условиях многократного переноса иммунокомпетентных клеток от сингенных животных / О. С. Аникеева, Т. Я. Абрамова, В. А. Козлов // Бюллетень сибирской медицины.– 2015.– Т. 14 – № 1.– С. 5-11.
3. The immune system and hypertension / M. V. Singh, M. W. Chapleau, S. C. Harwani et al. // Immunologic Research.– 2014.– V. 59(1-3).– P. 243-253.
4. Malashchenko, T. Multistability in Neuronal Models / T. Malashchenko // Dissertation by Georgia State University.– 2012.– V. 02-07.– P. 123.
5. Маркова Е. В. Механизмы нейроиммунных взаимодействий в реализации поведенческих реакций / Е. В. Маркова.– Красноярск: Научно-инновационный центр.– 2012.– 236 с.

IMMUNE CELLS AND CYTOKINES IN THE FORMATION OF THE LEVEL OF BEHAVIORAL ACTIVITY IN (CBAxC 57BL/6) F1 MICE IN ONTOGENESIS

Anikeeva O. A., Abramova T. Ya., Pashkina E. A., Markova E. V., Kozlov V. A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

During postnatal ontogenesis formation of complex behavioral programs is associated with the functional activity of immune cells and their ability to produce cytokines, performing inter-system interactions.

Keywords: cytokines, immune cells, behavior, ontogenesis.

ИЗМЕНЕНИЯ ЗАЩИТНЫХ ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОСТВИРУСНОЙ УСТАЛОСТИ

Филатенкова Т. А., Шанин С. Н., Фомичева Е. Е.

Федеральное Государственное Научное Учреждение «Институт Экспериментальной Медицины», Санкт-Петербург, Россия

В работе были изучены взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем в условиях экспериментальной модели поствирусной усталости, также отягощенной жестким стрессом. Выявлен угнетающий эффект аппликации Poly I: C на цитотоксичность естественных киллерных клеток как в экспериментах на животных, так и в культуре клеток. Показано длительное повышение концентрации кортикостерона в крови животных, в том числе на фоне стресса, что свидетельствует о значительной и чрезмерной активации функций системы ГГАКС. Соматическими проявлениями развития усталости было повышение утомляемости крыс в тесте «Принудительное плаванье». Полученные в работе данные свидетельствуют о комплексных причинах развития нарушений взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем.

Ключевые слова: ЕК клетки, экспериментальная поствирусная усталость, кортикостерон, стресс.

Синдром поствирусной или хронической усталости является самостоятельной нозологической единицей в современной классификации болезней. Развитие синдрома на фоне вирусных инфекций стало основанием для заключения о том, что это заболевание связано с перенесенной вирусной инфекцией и характеризуется хронической, не проходящей слабостью. Согласно литературным данным, именно нарушение взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем является одним из основных механизмов возникновения синдрома.[1]

Потенциал защитных функций организма в значительной степени определяется уровнем цитотоксической активности естественных киллерных клеток (ЕК), являющихся первым барьером на пути развития инфекционных и онкологических заболеваний. Анализ функциональных резервов иммунокомпетентных клеток в совокупности с другими показателями активности защитных функций, таких как активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАКС), позволяет раскрыть механизмы их нарушений при различных дестабилизирующих воздействиях.

Целью настоящего исследования явилось изучение некоторых показателей активности нейроэндокринной и иммунной систем, в частности изменение содержания кортикостерона в крови экспериментальных животных, цитотоксической активности ЕК клеток, а так же соматических проявлений в условиях моделирования поствирусной усталости на фоне стресса.

Материалы и методы. Работа выполнена на взрослых крысах-самцах породы Wistar массой 200-250 г. Для индукции синдрома поствирусной усталости животным внутрибрюшинно вводили препарат Poly I:C в дозе 3 мг/кг массы в 0,5 мл раствора NaCl. В качестве стрессорного воздействия использовали плавание животных в ледяной воде в течение 3-х минут. Инъекции Poly I:C осуществляли через 1 час после аппликации стресса. Для определения утомляемости животных применяли тест «Принудительное плаванье» с утяжелением, составляющим 10 % веса животного. Концентрацию кортикостерона в крови животных определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа. Анализ цитотоксической активности ЕК клеток осуществлялся в отношении опухолевых клеточных линий K-562 и RPMI8226. Клетки эффекторы смешивались с клетками-мишенями в соотношениях 25:1 и 12:1 и инкубировались в течение 4-х часов. Анализ цитотоксичекой активности ЕК клеток производился при помощи набора Delfia PercinElmer.

Результаты. Синдром поствирусной усталости характеризуется резким снижением работоспособности и физической активности. В экспериментах на животных было показано, что их физическая активность при аппликации экспериментальной поствирусной усталости снижается более чем на 50 %, достигая минимального значения на 7-10-е сутки. Однако при сочетании введения Poly I:C с жестким стрессом было показано, что физическая активность, хоть и остаётся сниженной относительно контрольной группы, но достоверно выше, чем в группе животных получавших только Poly I:C.

Как известно, одним из основных признаков поствирусной усталости у больных является снижение циркулирующего кортизола в крови [2]. Однако, в работе было показано увеличение концентрации кортикостерона в крови на 5-7-е сутки ($P<0,05$). При сочетанном действии введения препарата Poly I:C и жестком стрессе концентрация этого гормона оставалась значительно повышенной на все сроки исследования, вплоть до 14-х суток. Таким образом, стрессорное воздействие на фоне введения Poly I:C приводило к еще большей активации функций системы ГГАКС. В качестве наиболее характерных проявлений дисфункций иммунной системы при синдроме поствирусной усталости можно считать угнетение цитотоксической активности естественных киллерных клеток, а также уменьшение их количества [3]. Угнетение функциональной активности ЕК клеток в свою очередь связывают с нарушениями активности ферментативных систем клеток: снижение уровня перфорина, падение уровня продукции INF-γ, а так же распад интерферонзависимой РНКазы. Так, по одной из версий, развитие синдрома поствирусной усталости может быть связано с накоплением фрагментов разрушенной РНКазы [4].

Установлено, что спленоциты интактных животных оказывают цитотоксическое действие на клетки опухолевой линии К-562, усиливающееся при увеличении количества клеток эффекторов, приходящихся на одну мишень. При соотношении эффектор:мишень

12:1 специфическая цитотоксичность равняется 13,8±1,5 %; 25:1-25,2±2,3 %. Однократное внутрибрюшинное введение крысам Poly I:C в дозе 3 мг/кг массы тела вызывает усиление цитотоксической активности НК клеток селезенки на 3-и сутки при соотношении эффектор: мишень 25:1. К 7-м–10-м суткам после введения Poly I:C, срокам развития экспериментальной усталости, при том же соотношении эффектор:мишень 25:1, наблюдается значительное угнетение специфической цитотоксичности НК-клеток селезенки. К 14-м суткам после введения препарата происходит восстановление цитотоксической активности НК-клеток селезенки. Таким образом, при определенном соотношении эффектор:мишень в период формирования экспериментальной поствирусной усталости наблюдается значительное угнетение специфической цитотоксичности НК-клеток, что согласуется с данными клинических наблюдений [3].

Для оценки возможного непосредственного действия препарата Poly I:C на ЕК клетки были проведены эксперименты *in vitro*. К линии клеток NK-92 добавляли 20 мкг раствора Poly I:C, после инкубации с клетками-мишенями – K-562 и RPMI8226 – было показано снижение цитотоксической активности эффекторов в среднем на 10-13 % для обеих культур клеток-мишеней. Однако, в контрольных пробах, не содержащих клетки-эффекторы, также было отмечено незначительное снижение процента мёртвых клеток. Полученные данные позволяют предположить, что, несмотря на вероятное стимулирующее действие Poly I:C на клетки-мишени, непосредственно на ЕК клетки этот препарат оказывает угнетающее действие. Сходные данные были получены в опытах, где в качестве клеток-эффекторов были взяты спленоциты крысы.

Полученные в работе данные могут свидетельствовать о комплексных причинах развития нарушений взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем в условиях экспериментальной модели поствирусной усталости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нарушения функций нейроэндокринной и иммунной систем при синдроме хронической усталости в эксперименте и их коррекция иммуномодулирующими препаратами/ Е. Е. Фомичева, С. Н. Шанин, Т. А. Филатенкова и др. // Нейроиммунология. – 2011. – Т. 9, № 1-2 – С. 47-55.
2. Синдром хронической усталости и иммунной дисфункции у лиц с рецидивирующими вирусными инфекциями: клинико-иммунологические черты и особенности серотонинергической регуляции / Нестерова И. В., Балмасова И. П., Козлов В.А и др. // Цитокины и воспаление. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 3-14.
3. Fletcher M. A., Maher K., Klimas N. G. Natural killer cell function in chronic fatigue syndrome / M. A. Fletcher, K. Maher, N. G. Klimas // Clin Appl Immunol Rev. – 2002. – V.2. – P. 129-139.
4. Chronic fatigue syndrome: a risk factor for osteopenia? / J. Nijs K. De Meirleir, P. Englebienne et al. // Med Hyp. – 2003. – V.60(1). – P. 65-68.

CHANGES OF PROTECTIVE FUNCTIONS UNDER EXPERIMENTAL POSTVIRAL FATIGUE

Filatenkova T. A., Shanin S. N., Fomicheva E. E.

Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

Changes of neuroendocrine and immune systems' activity parameters under the model of post viral fatigue accompanied with stress were studied. Vastly oppression of specific cytotoxicity of NK-cells after injection of post viral fatigue inductor Poly I:C was shown, both *in vivo* and *in vitro*. Increasing of corticosterone level in blood, which indicates about significant activation of HPA axis functions, and decreasing of physical activity of rats also were shown. Received data indicate about complex changings in immune and neuroendocrine systems interaction under the model of experimental post viral fatigue.

Keywords: NK-cells, post viral fatigue, corticosterone, stress.

ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ АПОПТОЗА У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ СТРОНЦИЕВОЙ ГЕОХИМИЧЕСКОЙ ПРОВИНЦИИ

Долгих О. В.[1,2], Зайцева Н. В.[1,2], Дианова Д. Г.[1], Кривцов А. В.[1], Бубнова О. А.[1], Гусельников М. А.[2], Безрученко Н. В.[1,2], Отавина Е. А.[1]

[1]ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; [2]ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Проведено изучение особенностей показателей апоптоза Т-лимфоцитов у детей, проживающих в эндемичной зоне, характеризующейся повышенным содержанием стронция в подземных водах. Установлено, что у детей при содержании стронция в крови выше референтных значений отмечается ингибирование апоптоза, снижается готовность лимфоцитов к реализации иммунного ответа. В условиях экспозиции стронцием снижается p53-регулируемый апоптоз, рецептор-зависимый сигнальный путь апоптоза с участием TNFRI и FAS, при этом повышается гибель клетки по пути некроза, что является дополнительным механизмом в регуляции иммунного ответа в условиях повышенной антигенной (гаптенной) нагрузки.

Ключевые слова: ген TNF альфа, ген TLR 4.

Значительная распространенность иммунологических нарушений в детском и подростковом периоде обуславливается в первую очередь загрязнением окружающей среды химическими соединениями [1, 2]. Основой многих проявлений иммунных нарушений является дисбаланс гибели клеток иммунной системы [2]. Своевременная диагностика апоптогенных нарушений в условиях влияния неблагоприятных техногенных химических факторов позволит выявить ранние изменения состояния иммунологического здоровья у детей [1].

Цель работы – оценка нарушений апоптоза иммуноцитов у детей, проживающих на территории стронциевой геохимической провинции.

Материалы и методы. Всего, включая группу контроля, обследовано 140 детей. Группа наблюдения – 80 детей, проживающих в эндемичной зоне, характеризующейся повышенным содержанием стронция в подземных водах. Группа контроля – 60 детей проживающих на территории, характеризующейся допустимым уровнем качества воды по содержанию стронция. Группа наблюдения и контрольная группа были сопоставимы по этническому, гендерному и возрастному составу, соматической заболеваемости и социальному статусу. Выборка обследуемых была достаточна для достоверного определения межгрупповых отличий. Исследование биосред (кровь) на содержание металлов (стронций) выполнено на атомно-абсорбционном спектрофотометре фирмы «Perkin Elmer 3110» (США) в соответствии МУК МЗ РФ № 763-99-4.1.779-99.

Идентификацию мембранных и внутриклеточных маркеров апоптоза, детекцию апоптоза проводили на проточном цитометре FACS Calibur фирмы «Becton Dickinson» («BD», USA). Определение $CD95^+$ (FAS) проводили методом мембранной иммунофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител (МКАТ) к мембранным CD-рецепторам («BD», USA). Для определения внутриклеточного транскрипционного фактора p53 использовалась суспензия мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина, окрашивание проводили согласно протоколу фирмы-производителя «Beckman Coulter» («BC», USA). Определение уровня экспрессии белка bcl-2 и bax проводили с использованием соответствующих МКАТ («BC», USA) и одновременным проведением процедуры отрицательного изотипического контроля. Для определения уровня экспрессии TNFRI использовали цитофлюориметри-

ческий метод, основанный на взаимодействии соответствующих МКАТ с мембранным рецептором к TNFα на лимфоцитах («BC», USA). Уровень апоптоза лимфоцитов определяли с помощью окрашивания аннексином V-FITC (Annexin V-FITC) и пропидиум йодидом (PI (Propidium Iodide)) («BD», USA).

Обработка данных проводилась в пакете статистического анализа Statistica 6.0 и специально разработанных программных продуктах, сопряженных с приложениями MS-Office. При соответствии данных нормальному распределению использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты исследования представлены в виде среднего значения (*M*) и ошибки средней (*m*) изученных показателей. Причинно-следственные связи между воздействием химического вещества и ответной реакцией организма, описывали при помощи модели логистической регрессии. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (*p*), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Обнаружено, что детей группы наблюдения в биологических средах статистически значимо ($p = 0{,}001$) повышено содержание стронция 0,151± 0,022 мг/дм^3 по сравнению с референтным уровнем 0,01-0,077 мг/дм^3 и статистически значимо ($p = 0{,}001$) повышено относительно значений, полученных у детей группы контроля 0,035±0,0048 мг/дм^3.

Цитофлюориметрический анализ биомаркеров апоптоза показал, что у детей группы наблюдения статистически значимо ($p = 0{,}001$-0,040) снижено количество TNFRI 0,31±0,13 % и CD 95$^+$ 11,27±1,9 % на Т-лимфоцитах по сравнению с результатами, полученными у детей группы контроля 0,87±0,28 % и 16,71±3,49 % соответственно. Установлено, что у детей группы наблюдения статистически значимо (p = 0,0001-0,030) снижена экспрессия bcl-2 0,09±0,03 % и p53 0,65±0,16 % относительно контрольных значений 0,72±0,42 % и 1,41± 0,75 % соответственно. Оценка иммунного статуса продемонстрировала, что у детей группы наблюдения уровень экспрессии bax (8,82± 5,33 %) идентифицируется в диапазоне контрольных величин (9,94±5,98 %). Анализ показателей иммунограммы выявил, что у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции, статистически значимо (p = 0,040) снижено процентное содержание Annexin V-FITC$^+$PI$^-$-клеток 1,44±0,21 % и статистически значимо (p = 0,010) повышено количество Annexin V-FITC$^+$PI$^+$-клеток 10,04± 1,10 % по отношению к значениям, зафиксированным у детей группы контроля 2,07±0,21 % и 6,96±0,37 % соответственно. В условиях, когда снижается p53-регулируемый апоптоз, рецептор-зависимый сигнальный путь апоптоза с участием TNFRI и FAS, другим возможным направлением развития апоптоза является митохондриальный сигнальный путь, о чем свидетельствует экспрессия основного проапоптозного белка bax. Экспрессия bax приводит к связыванию с белком bcl-2, соответственно существует высокая вероятность активации митохондриального пути индукции апоптоза [4]. По результатам математического моделирования установлена ассоциация изменений количества Annexin FITC$^+$PI$^+$-клеток с содержанием стронция (R^2 = 0,68; F = 277,35; p = 0,001), а CD 95$^+$, TNFRI, p53, bax, Annexin V-FITC$^+$PI$^-$ негативно связаны с содержанием в крови металла (R^2 = 0,49-0,68; F^2 = 213,3-616,62; p = 0,001).

Таким образом, у детей, проживающих в условиях воздействия стронция, установлены изменения в иммунной системе, характеризующиеся снижением готовности лимфоцитов к реализации иммунного ответа и процедурой угнетения передачи апоптотического сигналинга, маркерами которого выступают: мембранные рецепторы FAS, TNFRI; внутриклеточные транскрипционные факторы – p53, bcl-2. Установлено, что при содержании в крови стронция в диапазоне 0,0560-0,3710 мг/дм^3 отмечается ингибирование апоптоза, при этом повышается гибель клетки по пути некроза, что является дополнительным механизмом в регуляции иммунного ответа в условиях повышенной антигенной (гаптенной) нагрузки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г. Регуляция стронцием апоптотического сигнала в иммуноцитах / О. В. Долгих, Н. В. Зайцева, Д. Г. Дианова//Биологическиемембраны.– 2016.– Т. 33.– № 1.– С. 1-5.
2. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г. Особенности клеточного звена иммунной системы у детей в условиях экспозиции формальдегидом и фенолом / О. В. Долгих, Н. В. Зайцева, Д. Г. Дианова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2013.– Т. 7 (16).– № 2-3.– С. 196.

DETECTION OF VIOLATIONS IN APOPTOSIS IN CHILDREN LIVING IN STRONTIUM GEOCHEMICAL PROVINCE

Dolgikh O.V.[1,2], Zaitseva N.V.[1,2], Dianova D.G.[1], Krivtsov A.V.[1], Bubnova O.A.[1], Gusel'nikov M.A.[1], Bezruchenko N.V.[1,2], Otavina E.A.[1]

[1]FBSI «Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»; [2]FBSEI HE «Perm State National Research University», Perm, Russia

The characteristics of apoptosis inducing factor of T lymphocytes in children, living in an endemic area with elevated content of strontium in groundwater, have been studied. It was found that children with strontium content in blood higher the reference values demonstrate inhibition of apoptosis and the reduction of the lymphocytes' readiness to implement the immune response. Strontium exposure reduces p53-regulated apoptosis, receptor-dependent signaling pathway of the apoptosis involving TNFRI and FAS, and upon this it increases cell death by necrosis way that is an additional mechanism in immune response regulation under high antigenic (haptenic) load.

Keywords: TNF-alpha gene, TLR 4 gene.

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ЗОНЕ ВЛИЯНИЯ ВОЛЬФРАМОВО-МОЛИБДЕНОВОГО КОМБИНАТА

Зайцева Н.В.[1,2], Старкова К.Г.[1], Гусельников М.А.[2], Отавина Е.А.[1], Рочев В.П.[1,2], Мазунина А.А.[2], Ланин Д.В.[1,2], Перминова И.В.[1]

[1]ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; [2]ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Проведенное исследование показателей иммунной регуляции у детей, проживающих в зоне техногенного загрязнения металлами, выявило увеличение содержания сывороточных иммуноглобулинов классов A, M и G, специфических IgG к вольфраму и свинцу, а также медиатора иммунной регуляции интерлейкина-17.

Ключевые слова: специфический IgG, гаптен, интерлейкины.

Интенсивная техногенная трансформация среды обитания определяет актуальность проведения исследований по выявлению особенностей реагирования, адаптивных возможностей и функционального резерва регуляторных систем организма, среди которых иммунная система играет важнейшую роль. Мониторинг изменений иммунорегуляторных показателей и выявление повышенной чувствительности к факторам внешнего окружения позволят своевременно реагировать на негативные тенденции в состоянии здоровья подрастающего поколения [1-3].

Цель работы – выявить особенности изменения иммунных показателей у детей, проживающих в условиях воздействия отходов вольфрамово-молибденового комбината.

Материалы и методы. Проведено иммунологическое диагностическое обследование детского населения, 136 детей (70 девочек и 66 мальчиков), посещающих детские образовательные учреждения и проживающих в зоне влияния отходов вольфрамово-молибденового комбината, связанного с техногенным загрязнением металлами атмосферного воздуха. Группу сравнения составил 31 ребенок анало-

гичного возраста (14 девочек и 17 мальчиков) из «условно чистого» района с отсутствием указанных факторов риска.

Содержание химических элементов в крови определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Уровни сывороточных иммуноглобулинов, IgE общего, интерлейкина-17, васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF) исследовали методом иммуноферментного анализа, специфические антитела к металлам – аллергосорбентным тестированием с ферментной меткой.

Статистический анализ проводили методом вариационной статистики с расчетом средней арифметической и её стандартной ошибки и t-критерия Стьюдента, оценку зависимостей между признаками с помощью корреляционно-регрессионного анализа, критерия Фишера и коэффициента детерминации (R 2). Различия между группами считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты. Оценки качества среды обитания на обследуемой территории указывают на присутствие в атмосферном воздухе и воде хозяйственно-питьевого водоснабжения примесей многих химических элементов, среди которых вольфрам, марганец, свинец, никеля, мышьяк, кадмия и их соединения. При этом анализ проб крови обследованных детей выявил достоверно более высокие значения по содержанию мышьяка и кадмия относительно показателей сравнения, кратность превышения составила в 1,5 и 2,1 раза соответственно ($p<0,05$). Также отмечены более высокие концентрации кадмия, мышьяка, никеля, свинца и хрома по сравнению с фоновыми региональными показателями ($p<0,05$).

Клинико-лабораторное исследование показало у 65,4-93,4 % детей группы наблюдения достоверно повышенные по сравнению с возрастной нормой уровни сывороточных иммуноглобулинов (IgG – 15,814±0,43 г/л при норме 9,81… 10,53 г/л; IgM – 1,928±0,089 г/л при норме 1,26… 1,56 г/л; IgA – 1,757±0,105 г/л при норме 0,99… 1,49 г/л, $p<0,05$). Применение математического моделирования зависимостей «маркер экспозиции – маркер эффекта» позволило установить вероятность дальнейшего возрастания концентрации показателя IgG при увеличении содержания ванадия, кадмия, мышьяка, никеля, хрома в крови (R^2=0,21-0,79 при $p<0,05$), IgM при повышении уровня марганца и свинца (R^2=0,24-0,32 при $p<0,05$), IgA при увеличении ванадия, марганца, мышьяка, никеля, свинца и хрома в крови (R^2=0,13-0,40 при $p<0,05$). При оценке общей сенсибилизации по содержанию IgE общего отмечено повышение показателя относительно референтных значений у 28,5 % обследованных (135,078±44,209 МЕ/мл, референтный уровень <100,0 МЕ/мл), однако достоверных отклонений относительно группы сравнения не наблюдалось. Увеличение уровня IgE общего связано с содержанием хрома и кадмия в крови (R^2=0,17-0,24 при $p<0,05$).

Установлен достоверно повышенный по сравнению с референтным диапазоном и группой сравнения уровень специфической сенсибилизации к вольфраму (содержание специфического IgG к вольфраму – 0,089±0,014 у.е.; группа сравнения 0,044±0,011 у.е.; референтный уровень <0,05 у.е., $p<0,05$), а также к свинцу (содержание специфического IgG к свинцу – 0,107±0,014 у.е.; группа сравнения 0,070± 0,016 у.е.; референтный уровень <0,1 у.е., $p<0,05$), причем кратность превышения аналогичных показателей сравнения по содержанию специфических антител к вольфраму у детей основной группы составила в 2,0 раза, а специфических антител к свинцу в 1,5 раза. Повышаются шансы возрастания IgG к свинцу при увеличении концентрации свинца в крови (R^2=0,24 при $p<0,05$).

Исследование особенностей межклеточной цитокиновой регуляции показало достоверное относительно референтного диапазона увеличение продукции интерлейкина-17 у 21,6 % обследованных детей (25,882±19,064 пг/мл; референтный диапазон 0… 5 пг/мл, $p<0,05$). Математическое моделирование указывает на повышение вероятности возрастания интерлейкина-17 при повышении уровня марганца, мышьяка, ванадия и хрома в крови (R^2=0,35-0,62 при $p<0,05$), а также снижение концентрации VEGF при увеличении содержания ванадия, кадмия, марганца, мышьяка, никеля и свинца в крови (R^2=0,23-0,99 при $p<0,05$).

Выводы. Таким образом, в результате проведенного исследования у детей, проживающих в зоне влияния отходов вольфрамово-молибденового комбината, выявлены изменения функциональных параметров иммунной активности, связанные с повышением уровня сывороточных иммуноглобулинов, специфической к металлам сенсибилизации организ-

ма, а также показателей межклеточного цитокинового механизма регуляции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дианова Д. Г., Предеина Р. А., Пирогова Е. А Оценка цитокинового статуса детей, проживающих в условиях хронического аэрогенного воздействия ванадия / Д. Г. Дианова, Р. А. Предеина, Е. А. Пирогова // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8 (17).– № 3.– С. 294-296.
2. Гены и медиаторы как маркеры нарушений иммунного ответа у детей в условиях контаминации биосред тяжелыми металлами /О.В. Долгих, Н. В. Зайцева, А. В. Кривцов и др. // Здоровье населения и среда обитания.– 2014.– № 12.– С. 27-29.
3. Долгих О. В., Лыхина Т. С. Особенности содержания специфического IGE и уровня раннего и позднего маркеров клеточной активации у детей с аллергопатологией в условиях техногенной нагрузки / О. В. Долгих, Т. С. Лыхина // Вестник уральской медицинской академической науки.– 2011.– № 2/2(35).– С. 84.

CHANGING OF IMMUNE PARAMETERS IN CHILDREN LIVING IN THE AREA OF INFLUENCE OF TUNGSTEN AND MOLYBDENUM PLANT

Zaitseva N. V.[1,2], Starkova K. G.[1], Gusel'nikov M.A.[1], Otavina E. A.[1], Rochev V. P.[1,2], Mazunina A. A.[2], Lanin D. V.[1,2], Perminova I. V.[1]

[1]FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies"; [2]FBSEI HE "Perm State National Research University", Perm, Russia

The study of immune regulation in children living in anthropogenic metal pollution area revealed an increase of serum immunoglobulins classes A, M and G, specific IgG to tungsten and lead as well as immune mediator interleukin-17.

Keywords: specific IgG, hapten, interleukins.

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ДИНАМИКУ КИСЛОРОДНОГО ВЗРЫВА ПРИ СТРЕССЕ. ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ

Шаравьева И. Л.[1], Волошина А. А.[2], Осипов А. Ю.[2], Тендрякова С. П.[1,2]

[1]Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; [2]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

У самцов и самок белых мышей по-разному происходит изменение продукции активных форм кислорода перитонеальными макрофагами в ответ на острый стресс. Блокада опиатых рецепторов значительно модифицировала эффекты стресса.

Ключевые слова: острый стресс, хемилюминесценция, опиоидные пептиды.

Воздействие стресса на организм сопровождается нарушением гомеостаза, колебанием гормонального фона, изменением уровня экспрессии различных функциональных молекул на клетках иммунной системы. [1]. Одной из важнейших систем, осуществляющей контроль за состоянием организма при стрессе, является опиоидная система, реализующая свои эффекты через взаимодействие с опиатными рецепторами (m, d, k). Развитие стресс-реакции, а так же исход взаимодействия биологически активных агентов с иммунной системой, могут сильно различаться в у разных индивидуумов. Уровень активации

опиоидной системы при стрессе может сильно варьировать в зависимости от пола [2, 3, 4].

Цель работы – исследование влияния ротационного и иммобилизационного стресса на продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами самцов и самок мышей в условиях блокады опиатных рецепторов *in vivo*.

Используемые методы. Эксперимент выполнен на половозрелых белых мышах обоего пола. Животных содержали в условиях лабораторного вивария, при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. В работе использовались две модели стресса – ротационный и иммобилизационный.

Ротация мышей производилась в течение 60 мин по 10 мин с перерывами по 5 мин при 78 об/мин, иммобилизация мышей проводилась в течение 6 часов (фиксация в положении на спине). Антагонист опиатных рецепторов налоксона гидрохлорид в дозе 0,2 мг/кг вводили подкожно за 20 мин до стресса, а так же через 3 ч после начала стресса у животных, подвергнутых иммобилизации.

Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я – контрольная, 2-я – ротационный или иммобилизационный стресс, 3-я – ротационный или иммобилизационный стресс; 4-я – однократное или двукратное введение налоксона. Оценку кислородзависимой микробицидной активности перитонеальных макрофагов осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных непрозрачных плоскодонных планшетах, каждая лунка содержала 10^5 клеток в 100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛЗХЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовался люминол (10^{-5}М), свечение которого неизбирательно по отношению к различным кислородсодержащим радикалам. Регистрация результатов проводилась в течение часа с интервалом в 5 мин с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия). Статистический анализ проводили с использованием непарного t-критерия Стьюдента.

Основные результаты. Установлено, что ротационный стресс у самцов стимулировал спонтанную и зимозан-стимулированную продукцию активных форм кислорода (АФК) макрофагами. Введение налоксона (на фоне стресса) приводило к отмене стимулирующего эффекта ротационного стресса на реакцию ЛЗХЛ. У самок не отмечалось действия ротационного стресса на спонтанную продукцию АФК. Повышение данного показателя отмечалось в группе стресс+налоксон. В стимулированных зимозаном культурах у самок ротация приводила к выраженному угнетению реакции ЛЗХЛ. В группе ротационный стресс+налоксон отмечалось частичная отмена данного эффекта. Однократное введение налоксона не оказывало влияния на продукцию АФК ни у самцов, ни у самок.

У самцов и у самок под действием иммобилизационного стресса в спонтанных культурах статистически значимого изменения продукции АФК зафиксировано не было. В стимулированных зимозаном культурах в третьей группе – иммобилизация на фоне блокады опиатных рецепторов приводила к значимому угнетению реакции ЛЗХЛ. У самок при активации клеток зимозаном, под действием иммобилизации происходило статистически достоверные угнетение продукции АФК, предварительная обработка налоксоном при иммобилизации полностью отменяла данное угнетение. Изолированное двукратное введение налоксона у самцов на продукцию макрофагами АФК влияния не оказывало, тогда как у самок проводило к угнетению продукции АФК.

Обращает на себя внимание различная интенсивность выраженности реакции ЛЗХЛ у самцов и самок. У самок данный показатель значительно выше, по сравнению с самцами, как в спонтанных, так и в стимулированных культурах.

Таким образом, у самцов и самок острый стресс модифицирует продукцию АФК перитонеальными макрофагами. Опиоидные пептиды принимают участие в регуляции эффектов стресса как у самцов, так и у самок.

Работа поддержана программой президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Симонова Е. Ю., Косырева А. М. Половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов и фагоцитарной активности гранулоцитов периферической крови у крыс Вистар / Е. Ю. Симонова, А. М. Косырева // Иммунология.– 2012.– № 2.– С. 120-123.
2. Motzer S.A., Hertig V. Stress, stress response, and health / S. A. Motzer, V. Hertig // Nurs Clin North Am.– 2004.– V. 39(1).– P. 117.

3. Gender-specific cold responses induce a similar body-cooling rate but different neuroendocrine and immune responses / R. Solianik, A. Skurvydas, A. Vitkauskienė et al. // Cryobiology.– 2014.– V. 69(1).– P. 26-33.

4. Cortisol Stress Response in Men and Women Modulated Differentially by the Mu-Opioid Receptor Gene Polymorphism OPRM1 A118G / W. R. Lovallo, M. A. Enoch, A. Acheson et al. // Neuropsychopharmacology.– 2015.– V. 40(11).– P. 2546-2554.

INFLUENCE OF OPIOID RECEPTORS BLOCKADE ON THE OXYGEN BURST DYNAMICS UNDER STRESS. SEX DIFFERENCES

Sharav'eva I.L.[1], Voloshina A. A.[2], Osipov A. U.[2], Tendryakova S. P.[1,2]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
[2]Perm State National Research University, Perm, Russia

The males and females white mice have different mechanisms of regulation of the reactive oxygen species production under acute stress. The blockade of opiate receptors significantly modified the effects of stress.

Keywords: stress, chemiluminescence, opioid peptides.

РОЛЬ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β1-ГЛИКОПРОТЕИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ мРНК TGF-β1 ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ

Заморина С. А.[1], Литвинова Л. С.[2], Юрова К. А.[2], Дунец Н. А.[2], Хазиахматова О. Г.[2], Тимганова В. П.[1], Бочкова М. С.[1], Храмцов П. В.[3], Раев М. Б.[1]

[1]Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь; [2]Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград; [3]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Изучали влияние трофобластического β1-гликопротеина (ТБГ) на экспрессию мРНК TGF-β1 периферическими мононуклеарными клетками и CD4$^+$-лимфоцитами человека в системе *in vitro*. ТБГ был получен по авторской методике, экспрессию мРНК TGF-β1 оценивали методом ПЦР real-time, совмещенным с обратной транскрипцией. Установлено, что ТБГ не оказывал влияния на экспрессию мРНК TGF-β1 в культуре мононуклеарных клеток. Однако, на уровне изолированных CD4$^+$-лимфоцитов ТБГ (1, 100 мкг/мл) стимулировал экспрессию мРНК TGF-β1. В целом, полученные данные можно интерпретировать как способность ТБГ индуцировать продукцию TGF-β1 Treg, что может являться одним из механизмов формирования иммунной толерантности в период беременности.

Ключевые слова: трофобластический β1-гликопротеин (ТБГ), Т-регуляторные лимфоциты (Treg), TGF-β1, лимфоциты, моноциты, CD4-лимфоциты.

Трофобластический β1-гликопротеин (ТБГ) является одним из онкофетальных белков. ТБГ продуцируется во время беременности клетками цито- и синцитиотрофобласта, а также при патологиях трофобласта злокачественного характера. Уровень ТБГ положительно коррелирует со сроком беременности и представляет собой биохимический маркёр формирования и функционирования фетоплацентарной системы. В то же время, роль ТБГ в индукции факторов толерантности на уровне клеток человека изучена не в полной мере. Прежде всего, это связано с отсутствием в открытом доступе нативного (не рекомбинантного) препарата

ТБГ человека. В Лаборатории экологической иммунологии (ИЭГМ УРО РАН, г. Пермь) разработана и запатентована авторская технология выделения и очистки ТБГ [1]. Ранее нами было показано, что ТБГ участвует в формировании иммунной толерантности, индуцируя дифференцировку CD 4$^+$-лимфоцитов в функционально активные Т-регуляторные лимфоциты (Treg) [2]. Одним из медиаторов активности Treg является трансформирующий фактор β-1 (TGF-β1), который регулирует также функции всех видов иммунокомпетентных клеток. Наиболее сильное действие TGF-β1 оказывает на Т-клетки, подавляя их пролиферацию, блокируя секрецию IL-2, ингибируя дифференцировку Th1/Th2 и стимулируя генерацию Treg. Таким образом, изучение функциональной взаимосвязи Treg и TGF-β1 открывает перспективы для понимания механизмов формирования иммунной толерантности в процессе гестации. В экспериментальной модели на мышах Dveksler G. с коллегами продемонстрировали, что рекомбинантный ТБГ индуцирует продукцию TGF-β1 клетками иммунной системы, а также способствует активации молекулы TGF-β [3]. Однако роль ТБГ в регуляции экспрессии TGF-β1 на клетках человека не изучена.

Целью работы являлась оценка роли ТБГ в регуляции экспрессии мРНК TGF-β1 периферическими мононуклеарными клетками и CD4$^+$-лимфоцитами человека в системе *in vitro*.

Материалы и методы. ТБГ человека получали авторским запатентованным методом [1]. В работе использовали физиологические концентрации ТБГ, соответствующие его уровню в периферической крови матери в динамике беременности: 1, 10 и 100 мкг/мл. Исследовали периферическую кровь небеременных женщин репродуктивного возраста (n=8). В эксперименте использовали суспензию мононукларных клеток, которые получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина. Затем методом позитивной иммуномагнитной сепарации ("InVitrogen", США) из суспензии мононуклеарных клеток изолировали CD 4$^+$-лимфоциты. Полученные клетки (мононуклеары (1*10^7 кл/пробе) и CD 4$^+$-лимфоциты (1*10^6 кл/пробе)) инкубировали с ТБГ в плоскодонном 24-луночном планшете в ППС в течение 18 ч при 37°С и 5 % CO_2 без дополнительных индукторов. Уровень экспрессии мРНК TGF-β1 определяли методом ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК клеточных культур выделяли с использованием набора реагентов «РНК-Экстран» («Синтол», Россия). Процедуру обратной транскрипции проводили с использованием Олиго(dT)15 и MMLV-ревертазы («Синтол», Россия).

Для определения уровня относительной экспрессии гена TGF-β1 была проведена мультиплексная ПЦР в реальном времени с применением реагентов для определения количества фрагментов кДНК гена TGF-β1 («Синтол», Россия). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена β-Actin («Синтол», Россия). Амплификацию кДНК проводили в амплификаторе LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария).

Уровень экспрессии мРНК гена TGF-β1 в контрольных и опытных пробах определяли относительно экспрессии референсного гена с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$, вычисляя значение $2^{-(Ct\ TGF\text{-}\beta1\ -\ Ct\ \beta\text{-актина})}$, где Ct – пороговый цикл реакции [4]. Результаты выражали в относительных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации гена β-актина). Данные представлены в виде медианы с нижним и верхним квартилем (Me(Q1-Q3)). Проверку статистических гипотез об отсутствии различий с контролем (проба без ТБГ) осуществляли с помощью u-критерия Манна-Уитни ($p<0,05$).

Результаты и обсуждение. На уровне мононуклеарных клеток не выявлено влияния ТБГ на экспрессию мРНК TGF-β1 (контроль 0,209 (0,085-0,277); ТБГ 1 мкг/мл 0,184 (0,068-0,178); ТБГ 10 мкг/мл 0,096 (0,063-0,122); ТБГ 100 мкг/мл – 0,187 (0,171-0,279). Однако, на уровне изолированных CD 4$^+$-лимфоцитов установлено, что ТБГ стимулировал экспрессию мРНК TGF-β1 как в низкой, так и в высокой концентрации (контроль 0,097 (0,050- 0,132); ТБГ 1 мкг/мл 0,209 (0,118-0,463) Pu<0,05; ТБГ 10 мкг/мл 0,110 (0,079-0,183); ТБГ 100 мкг/мл – 0,149 (0,107-0,269) Pu<0,05. Уровень экспрессии TGF-β1 в CD 4$^+$-лимфоцитах в данном случае может рассматриваться как показатель функционального состояния Treg. Таким образом, ТБГ (1 и 100 мкг/мл) усиливает экспрессию мРНК TGF-β1. Известно, что TGF-β1, в свою очередь, индуцирует дифференцировку CD 4$^+$Treg при активации наивных (CD 4$^+$CD 45RA$^+$) клеток периферической крови. Фенотип Treg, которые образуются в при-

сутствии TGF-β1, характеризуется экспрессией CD25, CTLA-4, CD122, GITR, CD103 и FOXP3 [5]. Такие Treg способны активно пролиферировать в ответ на стимуляцию аллоантигенами, секретировать TGF-β1 и IL-10, а также проявлять иммуносупрессорную активность в отношении цитотоксических Т-лимфоцитов [5]. В отношении Treg ранее нами было установлено, что ТБГ индуцирует генерацию Treg ($CD4^+FOXP3^+$) и их функциональную активность, ассоциированную с экспрессией CTLA-4 и GITR [2]. Молекулярный механизм действия ТБГ на уровне Treg связан с вовлечением молекул CD9 [2]. Активация CD9 вовлекает аденилат-циклазную систему (Ac/PKA/cAMP) в реализацию сигнала. В контексте нашего исследования важен тот факт, что cAMP-опосредованная трансдукция сигнала напрямую ведет к экспрессии как TGF-β, так и FOXP3.

В итоге, мы продемонстрировали, что ТБГ индуцирует экспрессию мРНК TGF-β1 $CD4^+$-лимфоцитами, не влияя на этот показатель на уровне мононукларных клеток. В целом, полученные данные можно интерпретировать как способность ТБГ индуцировать продукцию TGF-β1 Treg. Таким образом, ТБГ в полной мере способен индуцировать дифференцировку Treg, участвуя в формировании иммунной толерантности в период беременности.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-04-00591 и субсидией «Организация проведения научных исследований» (№ 603).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Раев М. Б. Способ выделения и очистки трофобластического β-1-гликопротеина. Патент РФ № 2367449 от 20.09.2009. / М. Б. Раев // «Изобретения. Полезные модели».– 2009.– № 26.
2. Заморина С. А., Раев М. Б. Трофобластический β1-гликопротеин человека как фактор дифференцировки минорных регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов (Treg, Th17). Роль молекул CD 9/ С. А. Заморина, М. Б. Раев // Биологические мембраны.– 2016.– Т. 33, № 3.– С. 1-9.
3. Induction and activation of latent transforming growth factor-β1 are carried out by two distinct domains of pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1)/ A. Ballesteros, M. M. Mentink-Kane, J. Warren et al. // J. Biol. Chem.– 2015.– V. 290, № 7.– P. 4422-4431.
4. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method/ Livak K. J., Schmittgen T. D. // Methods.– 2001.– V. 25.– P. 402-408.
5. Чуров А. В., Олейник Е. К., Олейник В. М. Роль трансформирующего фактора роста β в формировании иммуносупрессии в онкогенезе/ Чуров А. В., Олейник Е. К., Олейник В. М. // Цитокины и воспаление.– 2009.– Т. 8, № 3.– С. 11-15.

THE ROLE OF PREGNANCY SPECIFIC BETA-1-GLYCOPROTEIN 1 IN THE REGULATION OF TGF-b1 mRNA EXPRESSION BY IMMUNOCOMPETENT CELLS

Zamorina S. A. [1,3], Litvinova L. S.[2], Yurova K. A.[2], Dunets N. A.[2], Khaziakhmatova O. G.[2], Timganova V. P.[1], Bochkova M. S.[1], Khramtsov P. V.[3], M.B. Rayev[1,3]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm; [2]Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad; [3]Perm State National Research University, Perm, Russia

The effect of pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1 (PSG1) on the TGF-β1 mRNA expression by peripheral mononuclear cells culture and $CD4^+$ lymphocytes in the human in vitro system was studied. PSG has been received by the author's method, the expression of TGF-β1 mRNA was evaluated by reverse transcription real-time PCR. It is established, that PSG has no effect on the TGF-β1 mRNA expression in the mononuclear cells culture. However, at the level of isolated $CD4^+$ lymphocytes, PSG (1, 100 μg/ml) stimulated TGF-β1 mRNA expression. In general, the data can be interpreted as PSG ability to induce production of TGF-β1 Treg, what can be one of the mechanisms of immune tolerance during pregnancy.

Keywords: beta-1-glycoprotein 1 (PSG1), TGF-β1, Treg, lymphocytes, monocytes, CD4-lymphocytes.

ПРИЗНАКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И ЭКСПРЕССИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ДЕТСКИМ АУТИЗМОМ

Чудакова Ю. М., Пороховник Л. Н., Стукалов С. В., Сергеева В. А., Ершова Е. С., Вейко Н. Н., Костюк С. В., Шмарина Г. В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

Согласно данным современных исследований детский аутизм характеризуется не только поведенческими расстройствами, но и выраженными физиологическими нарушениями, в том числе оксидативным стрессом, который может оказывать генотоксический эффект, проявляющийся в возникновении одно- и двунитевых разрывов ядерной ДНК. Целью настоящей работы было исследование уровня поврежденности ДНК лимфоцитов периферической крови детей с аутизмом, а также оценка уровня экспрессии NF-kB и цитокинов этими клетками. Полученные результаты показывают, что уровень поврежденности ДНК у детей с аутизмом был значимо выше, чем у здоровых сверстников ($p<0,001$). Анализ уровня мРНК провоспалительных цитокинов в лимфоцитах периферической крови выявил повышение экспрессии ИЛ-8, ФНО-α и ИФН-γ у детей с аутизмом по сравнению с группой контроля.

Ключевые слова: аутизм, окислительный стресс, цитокины, ДНК-кометы.

Детский аутизм относится к гетерогенной группе заболеваний нервной системы, известных как расстройства аутического спектра (РАС), которые характеризуются нарушениями коммуникативной, когнитивной и речевой сфер и навязчивым стереотипным поведением. Рост случаев аутизма и РАС у детей вызывает серьезные опасения во всем мире и привлекает пристальное внимание к данной проблеме врачей и ученых различных специальностей. Согласно данным современных исследований детский аутизм характеризуется не только поведенческими расстройствами, но и выраженными физиологическими нарушениями, в том числе оксидативным стрессом, дисфункцией митохондрий, а также аберрантной воспалительной реакцией [1]. Окислительный стресс может оказывать генотоксичный эффект, который проявляется в возникновении одно- и двунитевых разрывов ядерной ДНК и активации апоптотической программы клеточной гибели. Кроме того, в условиях избытка свободных радикалов в клетке повышается уровень экспрессии NF-kB, что, в свою очередь, приводит к избыточной продукции провоспалительных цитокинов.

Целью настоящей работы было исследование уровня поврежденности ДНК лимфоцитов периферической крови детей с аутизмом, а также оценка уровня экспрессии NF-kB и цитокинов этими клетками.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие дети от 4 до 10 лет (n=21, 10 мальчиков) с расстройствами аутистического спектра, соответствующие критериям диагностики F 84.0, 84.1, 84.5 Международной классификации болезней (МКБ-10) и Американского общества психиатров (DSM-IV-TR) и проходившие стационарное лечение на базе Научно-практического центра детской психоневрологии департамента здравоохранения г. Москвы.

В исследование не включали детей, у которых аутистические проявления были связаны с другими заболеваниями, такими, как врожденные дефекты обмена веществ, хромосомные аномалии, прогрессирующие дегенеративные заболевания. Контрольная группа была сформирована из здоровых детей (n=21) того же возрастного диапазона, что и пациенты клинической группы. Всем детям контрольной группы проводили визуальный анализ ЭЭГ экспертного уровня и сравнительное ЭЭГ-картирование мозга для исключения любых субклинических состояний. От законного представителя каждого обследованного ребенка было получено информи-

рованное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ». Биологическим материалом в исследовании служили 3-4 мл венозной крови, взятые у каждого участника эксперимента. Лимфоциты выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла (ρ=1,077 г/см^3). Степень повреждения ДНК оценивали с помощью метода "ДНК-комет" (электрофорез индивидуальных клеток, заключенных в гель, на предметных стеклах с агарозной подложкой по стандартному протоколу [2] в щелочных условиях). Для каждого индивида на 100-150 клетках определяли долю ДНК в хвосте ДНК-кометы и вычисляли момент хвоста ДНК-кометы (усл. ед.) как произведение процента ДНК в хвосте кометы и длины хвоста кометы. Уровень экспрессии BCL2 оценивали методом прточной цитофлуориметрии с использованием PE-anti-BCL2 антител, меченных фикоэритрином (PE) (eB 72-1665, eBioscience, США).

Выделение РНК из лимфоцитов проводили по стандартной методике с использованием наборов YellowSolve (Клоноген, Санкт-Петербург). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента MuLV-RT обратной транскриптазы согласно стандартной методике. Для измерения уровня экспрессии генов использовали метод ПЦР в реальном времени, SYBRGreen PCRMasterMix (Applied Biosystems). В качестве гена внутреннего стандарта использовали TBP (TATAA-box binding protein). Результаты представлены в относительных единицах (экспрессия исследуемого белка в образце/экспрессии гена TBP). Для статистической обработки и анализа данных использовали пакет программ PAST версии 2.17c.

Результаты. Уровень поврежденности ДНК лимфоцитов периферической крови детей с аутизмом оказался значимо выше, чем в контрольной группе. В частности, значение медианы моментов ДНК-комет в клинической группе составило 627 у.е. (387 ÷ 2070), что приблизительно в 1,7 раза больше значения медианы данного параметра у здоровых детей (379 у.е. (177 ÷ 800); p< 0,001). Можно предполагать, что повреждение ДНК активирует программу апоптотической гибели, о чем свидетельствует двукратное снижение уровня экспрессии антиапоптотического белка BCL2 в лимфоцитах больных аутизмом по сравнению с контрольной группой (p=0,04). Лимфоциты периферической крови больных аутизмом характеризовались повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов. Однако вследствие высокой индивидуальной вариабельности показателей различия между пациентами и контрольной группой не достигали уровня статистической значимости. Так, значение медианы уровня экспрессии ИЛ-8 в группе пациентов достигало 68,1 отн. ед. (24,8 ÷259,0) *vs* 12,9 отн. ед. (1,8÷242,9) в контроле. Уровни экспрессии ФНО-α в лимфоцитах больных аутизмом и здоровых детей составили, соответственно, 9,7 отн. ед. (1,1÷42,9) *vs* 1,2 отн. ед. (0,3÷19,2). Медианы уровня экспрессии ИФН-γ у больных аутизмом и здоровых детей были сравнимы, и составили, соответственно, 7,3 отн. ед. (1,7÷20,5) *vs* 4,5 отн. ед. (0,2÷65,1). В то же время экспрессия ИЛ-10 лимфоцитами здоровых детей и пациентов с аутизмом была относительно низкой. Значение медианы в клинической группе не превышало 0,9 у.е. (0,3÷5, 7), а в контрольной группе этот показатель был еще ниже и составлял 0,5 у.е.(0,0÷41,5).

Заключение. Полученные нами данные поддерживают высказанное ранее предположение о тесной взаимосвязи оксидативного стресса, митохондриальной дисункции и аберрантной воспалительной реакции у пациентов, страдающих аутизмом [2]. Важным последствием хронического оксидативного стресса является постоянно возникающие одно- и двунитевые разрывы клеточной ДНК, активирующие PARP-1(poly (ADP-ribose) polymerase-1). Повышенная активность этого фермента, с одной стороны сопровождается истощением запасов АТФ и усугублением и оксидативного стресса и митохондриальной дисфункции, с другой стороны – способствует формированию провоспалительного иммунологического фенотипа за счет стимуляции М1 макрофагов и дифференцировки Th1 лимфоцитов [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rossignol D. A., Frye R. E. Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism/D.A. Rossignol //Frontiers in Physiology.– 2014.– V. 5.– P. 150.
2. The comet assay: topical issues / A. R. Collins, A. A. Oscoz, G. Brunborg, et al. // Mutagenesis.– 2008.– V. 23, № 3.– P. 143-151.
3. Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings / M. M. Rosado, E. Bennici, F. Novelli, C. Pioli // Immunology.– 2013.– V. 139, № 4.– P. 428-437.

OXIDATIVE STRESS AND PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Chudakova Y. M., Porokhovnik L. N., Stukalov S. V., Sergeeva V. A., Ershova L. S., Veiko N. N., Kostuyk S. V., Shmarina G. V.

FSBI «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russia

Autism spectrum disorders (ASDs) has traditionally been framed as a behavioral disorder. However, evidence is accumulating that ASD is characterized by certain physiological abnormalities, including oxidative stress. The latter can potentiate DNA strand break formation and pro-inflammatory cytokine production. This study aimed to assess level of DNA damage and NF-kB and cytokine expression in peripheral blood lymphocytes of ASDs patients and healthy controls. It has been found increased DNA damage and elevated expression of ИЛ-8, ФНО-α и ИФН-γ in ASDs group in comparison with healthy children.

Keywords: autism spectrum disorders, oxidative stress, cytokines.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ И ОКИСЛОВ АЗОТА В ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕЧЁНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Савкин И. В.

ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Целью настоящей работы было исследование динамики уровня цитокинов в сыворотке крови и уровня продукции окислов азота перитонеальными макрофагами и клетками печени в ответ на введение клеток костного мозга животным с хронической печёночной недостаточностью. Основные эффекты трансплантации ККМ сводятся к иммуносупрессии разворачивающейся на четвёртой неделе после введения ККМ, и опосредованной ИЛ-4,10 и окислами азота.

Ключевые слова: цирроз, костный мозг, цитокины, окислы азота.

Хроническое токсическое поражение печени четырёххлористым углеродом является основной биохимической и метаболической моделью цирроза печени. В настоящее время считается что, ключевая клетка, направляющая процессы фиброзирования в печени – звездчатая клетка печени (клетка Ито). Звёздчатая клетка здоровой печени фенотипически является липоцитом и располагается в пространстве Диссе [2]. При действии гепатоповреждающего агента звёздчатая клетка активируется, становится фенотипически подобной миофибробласту, приобретает высокую пролиферативную активностью, по продукции коллагена многократно превосходит портальные фибробласты и является основной причиной развития фиброза и цирроза. Согласно последним данным, основные цитокины, опосредующие активность звёздчатых клеток печени – это, в первую очередь, интерлейкин-10, фактор некроза опухоли-α, трансформирующий фактор роста-β, интерфероны-α, γ, фактор роста гепатоцитов, фактор роста нервов. Причём, ИЛ-10, как основной антагонист ФНО-α, ингибирует продукцию коллагена в звёздчатых клетках печени и способствует восстановлению функций и морфологии печёночной ткани [5]. Установлено, что как гематопоэтические – эритроидные и миелоидные, так мезенхимальные клетки костного мозга

способны оказывать сильное супрессорное действие на макрофаги и лимфоциты, и таким образом, подавлять воспаление и переводить звёздчатые клетки печени в покоящийся фенотип [1, 4].

Целью настоящей работы было исследование эффекта и некоторых механизмов трансплантации клеток костного мозга (ККМ) на процесс регенерации печени.

Методы. Исследование выполнено на мышах-самцах линии C57/Bl6 (n=80), 8-недельного возраста, проводилось в соответствии с правилами лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003, N 267).

Для индукции ХПН мыши два раза в неделю в течение четырёх недель получали внутрибрюшинные инъекции раствора четырёххлористого углерода в подсолнечном масле (в разведении 1:10, в дозе 30мкл CCl_4 на одну мышь). Развитие ХПН подтверждалось биохимическими критериями.

Клеточный трансплантат содержал $25x10^6$ клеток костного мозга, полученный перфузией бедренных костей. Суспензию клеток в 0,3 мл среды RPMI-1640 (Sigma) вводили внутривенно через неделю после прекращения введения четырёххлористого углерода. Контрольной группе животных с ХПН в аналогичных условиях эксперимента вводили по 0,3 мл среды RPMI-1640 (Sigma). Забор крови: для оценки биохимических показателей проводили через 6 недель после трансплантации; для определения уровня цитокинов на 1, 2, 3, 4, 5 неделях. Забор органов проводили на 2, 4, 6 недели после введения ККМ.

Концентрации цитокинов ИЛ-2, -4, -6, -10, ФНО-α в сыворотке крови определяли методом ИФА, с использованием наборов BD Biosciences. Для определения продукции окислов азота *in vitro* перитонеальные макрофаги и клеточные гомогенаты печени ($3x10^6$) культивировали сутки в 2мл бессывороточной среды RPMI-1640 (Sigma). Определение концентрации окислов азота проводили по методу Грисса.

Биохимические показатели крови (АЛТ, АСТ, тимоловая проба, лактатдегидрогеназа, общий белок, альбумин, общий холестерин) определяли с использованием стандартных наборов производства «Вектор-Бэст».

Результаты и обсуждение. Трансплантация ККМ животным с ХПН не влияла существенно на сывороточные концентрации ИЛ-2, -6 и ФНО-α. Профили по ИЛ-4, -10 у контрольной и экспериментально групп животных обладали определённым спектром отличий. Так, в обеих группах на 4 неделе исчезал сывороточный ИЛ-4, причём на 5 неделе его концентрация возрастала до уровня 18±2 пг/мл только в группе, получившей трансплантат ККМ. Как в контрольной, так и в экспериментальной группах на 3 неделе исчезал сывороточный ИЛ-10, причём, на 4 неделе его концентрация возрастала (50±10 пг/мл) только в группе, получившей трансплантат ККМ, к пятой неделе концентрации сывороточного ИЛ-10 выравнивались в обеих группах. Предполагается, что падение концентраций интерлейкинов-4, -10 обусловлено вторичным клеточным иммунным ответом. Подтверждением этому могут служить данные, показывающие, что при хронических повреждающих воздействиях на печень развивается длительный Т-клеточный аутоиммунный ответ на печёночные антигены [4]. По всей видимости, при введении ККМ аутоиммунный ответ был менее выраженным, что следует из быстрого восстановления уровня противовоспалительных цитокинов.

Перитонеальные макрофаги не проявляли заметной реакции на введении ККМ, однако общая культура клеток печени реагировала повышенной продукцией окислов азота в ответ на введение ККМ на четвёртой неделе (1±1мМ и 6±1мМ в контрольной и экспериментальной группах соответственно). Известно, что окислы азота играют важную роль в процессах регенерации печени: они подавляют пролиферацию звёздчатых клеток; обладают протективным действием на гепатоциты, блокируя апоптотическое действие ФНО-α; подавляют пролиферацию Т-клеток [3].

Заключение. Основные процессы, обусловленные введением ККМ, происходят в печени экспериментальных животных на 3-5 недели после введения трансплантата ККМ: в группе животных, получивших трансплантат ККМ наблюдается повышение уровня противовоспалительных цитокинов ИЛ-4,10, подавляющих цитотоксическую активность макрофагов и лимфоцитов и повышение синтеза окиси азота, обладающей супрессорным действием на звёздчатые клетки печени и Т-лимфоциты и предотвращающей апоптотическое действие провоспалительных цитокинов на гепатоциты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dalakas E. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury / E. Dalakas // The FASEB Journal.– 2005.– V. 10 (19).– P. 1225-1231.
2. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection / M. Levy, G.W. McCaughan, G. Marinos et al. // Liver.– 2002.– V. 2 (22).– P. 93-101.
3. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthasedeficient mice / R. M. Rai, S. Q. Yang, C. McClain et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences.– 1998.– V. 23 (95).– P. 13829-13834.
4. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl_4-induced liver fibrosis in mice / I. Sakaida, S. Terai, N. Yamamoto et al. // Hepatology.– 2004.– V. 6 (40).– P. 1304-1311.
5. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis / K. Thompson, J. Maltby, J. Fallowfield et al. // Hepatology.– 1998.– V.6 (28).– P. 1597-1606.

INFLUENCE OF BONE MARROW CELLS TRANSPLANTATION ON CYTOKINES AND NITROGEN OXIDES PRODUCTION IN LIVER AT CHRONIC LIVER INSUFFICIENCY

Savkin I. V.

FSBSI «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology». Novosibirsk, Russia

The aim of the work was investigation of the dynamics of serum cytokines and peritoneal macrophages and liver cells nitric oxides production levels in response to bone marrow injection in mice with chronic liver insufficiency. The main transplantations effects represented IL-4, -10 and nitric oxides mediated immunosuppression spread out at fourth week after BMC injection.

Keywords: cirrhosis, bone marrow, cytokines, nitric oxides.

К МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ВЗАИМОСВЯЗИ «ЩИТОВИДНАЯ ЖЕЛЕЗА – ПАРАТРАХЕАЛЬНЫЕ ЛИМФОУЗЛЫ» ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Чучкова Н. Н.[1], Сметанина М. В.[2], Кормилина Н. В.[2], Глумова В. А.[2]

[1]ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург; [2]ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия

Гипергомоцистеинемия приводит к снижению уровня тиреоидных гормонов, увеличению количества крупных фолликулов, площади стромы, появлению участков склерозирования, изменению сосудистого русла в щитовидной железе. Популяция паратрахеальных лимфоузлов при гипергомоцистеинемии разделяется на субпопуляции с различной гистоархитектоникой и клеточным составом, морфофункциональная характеристика одних свидетельствует об активизации В-клеточного звена иммунитета (увеличивается число вторичных лимфоидных узелков, количество центробластов, иммунобластов, делящихся элементов в коре и мозговом веществе, количество плазмоцитов – в корковом веществе), других – об усилении лимфодренажной функции: увеличен объем мозгового вещества, незначительно снижено количество плазмоцитов и повышено макрофагов.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, щитовидная железа лимфатические узлы.

В ряде работ последних лет указывается на связь гипергомоцистеинемии (ГГЦ), как независимого фактора атерогенеза и функциональных изменений щитовидной железы (ЩЖ) [1]. Актуальным в этой связи является изучение сочетанной деятельности транспортных (дренирующих) и детоксикационных структур лимфатического региона щитовидной железы, который включает тканевой микрорайон органа, лимфатические сосуды, лимфатический узел [2]. Нами была поставлена **цель** – оценить функциональное состояние щитовидной железы и реакцию регионарных к ЩЖ лимфоузлов на фоне ГГЦ.

Материал и методы исследования. Работа выполнена на крысах-самцах (*Rattus norvegicus Berk*) 2-3 месячного возраста, весом 180-200 граммов № 25 (15 – интактный контроль, 10 – экспериментальные животные). Для формирования ГГЦ опытным животным ежедневно внутрибрюшинно вводился раствор гомоцистеина (L-Homocysteine thiolactone hydrochloride, Fluka Analytical, Switzerland) в дозе 13,4 мг/кг [3], разведенного в 0,2 мл 0,9 % хлорида натрия в течение месяца. Контрольная группа ежедневно в аналогичном объеме и длительности введения получала внутрибрюшинно 0,9 % раствор NaCl. Забой и взятие материала осуществлялись согласно «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985). Анализ на гомоцистеин проводили иммунохимическим методом на автоматическом анализаторе «Immulite 1000» (США). ЩЖ и паратрахеальные лимфоузлы (ПТЛУ) фиксировали в нейтральном 10 % формалине подвергали стандартной гистологической обработке, окрашивали гематоксилином и эозином, азур-II-эозином, пролиферирующие клетки идентифицировали с помощью моноклональных антител Ki-67 (Spring bioscience, США). В щитовидной железе определяли объемную плотность тканевых компонентов, размерные показатели фолликулов, митотическую активность тироцитов и показатели кариоцитометрии. В срезах лимфоузлов (ЛУ), окрашенных гематоксилином и эозином, определялось процентное соотношение коркового и мозгового вещества, анализировались основные типы клеточных популяций, проводили оценку состояния кровеносных сосудов. Полученные данные обрабатывались с помощью методов морфометрического анализа с использованием стандартных программ Excel и Statistica-6.

Основные результаты. Введение экспериментальным животным L-гомоцистеина в течение месяца вызывает повышение уровня гомоцистеина в крови до 27±0,3 мкмоль/л (умеренная ГГЦ). На фоне сформировавшейся ГГЦ отмечается гипофункциональное состояние щитовидной железы, что выражается в изменении спектра гормонов: при гипергомоцистеинемии уровень T_3 составляет 77 % от контрольных значений и равен 2,4±0,01 нмоль/л, а Т4 – 82,3 % (41,5±0,3 нмоль/л) и морфофункционального статуса ЩЖ. Так, в срезах щитовидной железы обращает на себя внимание увеличение количества крупных фолликулов, стенка которых образована уплощенными клетками. Коллоид плотный, густой, без признаков краевой вакуолизации, содержит десквамированные клетки. Локально определяются фолликулы с ретенцией коллоида. Имеет место увеличение площади стромы за счет разрастания соединительной ткани, имеются участки склерозирования. При морфометрическом исследовании сосудистого компонента стромы выявлено значительное расширение артерий. Стенка их утолщена за счет гиперплазии мышечного и эндотелиального слоев. Гипотиреоидное состояние сопровождается выраженными морфологическими перестройками в регионарных лимфоузлах, принимающих от нее лимфу. Достаточно однородная по размерам группа ПТЛУ контрольных крыс (5-6 узлов размерами 2х2 мм) у экспериментальных животных разделяется на 2 популяции. В отличие от контроля, появляется один, очень крупный ЛУ (6х2,5мм), окруженный 3-4 лимфатическими узлами средних размеров. Независимо от размеров узла в них отмечается умеренное расширение субкапсулярного синуса, в котором располагаются редкие лимфоциты, макрофаги, единичные плазматические клетки, присутствуют мастоциты. Капсула лимфоузла утолщена, обильно инфильтрирована тучными клетками и их гранулами. Гистоархитектоника изменяется в зависимости от величины узла. В ЛУ с хорошо выраженным корковым веществом (компактный тип) [4] большая часть лимфоидных узелков – это вторичные узелки, с хорошо развитым герминативным центром и выраженной короной. В коре таких ЛУ увеличивается число центробластов и иммунобластов (в 1,76 раз, $p \leq 0,05$), имеет тенден-

цию к повышению количество плазмоцитов. Количество митотических элементов в 1,5 раза выше контрольных значений, что подтверждается интенсивностью выявления делящихся клеточных элементов в коре и мозговом веществе при окраске Ki-67. Интересен факт появления в мозговом веществе сформированных, с развитым герминативным центром и короной лимфоидных фолликулов, часть узелков может располагаться на границе коркового и мозгового вещества. В мозговой части лимфоузла обращает на себя внимание обилие макрофагов как в синусах, формирующих группы, так в мозговых тяжах. В популяции лимфоузлов меньшего размера большую часть среза занимает мозговое вещество (фрагментированный ЛУ). Такого типа ЛУ выполняют преимущественно лимфодренажную функцию [4]. Количество центроцитов и центробластов, иммунобластов здесь соответствует контрольным значениям, отмечена тенденция к снижению плазмоцитов (в 1,2 раза, $p \leq 0,1$) и повышению макрофагов (в 1,73 раза, $p \leq 0,1$).

Выводы. Таким образом, повышение гомоцистеина в крови сопровождается гипофункциональным состоянием щитовидной железы и выраженными, разнонаправленными изменениями в лимфоузлах, обеспечивающих лимфоокружение ЩЖ, демонстрирует синхронность гистологических изменений, что доказывает не только их топографическое единство, но и функциональную взаимосвязь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Relationship between total homocysteine, total cholesterol and creatinine levels in overt hypothyroid patients / S. A. Bamashmoos, M. A. Al-Nuzaily, A. M. Al-Meeri et al. // Springerplus.– 2013.– V. 2.– P. 423.
2. Бородин Ю. И. Регионарный лимфатический дренаж и лимфодетоксикация / Ю. И. Бородин // Морфология.– 2005.– Т. 128, № 4.– С. 25-28.
3. Смирнов А. В., Добронравов В. А., Невротин А. И. Гомоцистеин вызывает повреждения не только клубочкового, но и канальцевого отдела нефрона (экспериментальное исследование) / А. В. Смирнов, В. А. Добронравов, А. И. Невротин // Нефрология.– 2005.– Т. 9, № 3.– С. 81-87.
4. Функциональная анатомия лимфатического узла / Ю. И. Бородин, М. Р. Сапин, Л. Е. Этинген и др. // Новосибирск: Наука, Сибирское отделение.– 1992.– 257 с.

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL RELATIONSHIP TO THE «THYROID GLAND – PARATRACHEAL LYMPH NODES» IN EXPERIMENTAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA

Chuchkova N. N.[1], Smetanina M. V.[2], Kormilina N. V.[2], Glumova V. A.[2]

[1]Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; [2]Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia

Hyperhomocysteinemia leads to lower thyroid hormone levels increase in the number of large follicles, stromal area, appearance of areas of sclerosis, changes of vasculature in the thyroid gland. The population of paratracheal lymph nodes if hyperhomocysteinemia is divided into subpopulations with different histoarchitectonics and cell composition, morphological characteristics alone testifies to activization of B-cell immunity (increasing the number of secondary lymphoid nodules, the number of centroblasts, immunoblasts, mitotic cells in the cortex and the medulla, the number of plasma cells – in the cortex), other – strengthening of lymph drainage function: the increased volume of medulla, slightly reduced the number of plasma cells and increased macrophages.

Keywords: hyperhomocysteinemia, thyroid gland, lymph nodes.

ГЦ-ОБОГАЩЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РИБОСОМНОГО ПОВТОРА В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ЯВЛЯЕТСЯ РЕГУЛЯТОРОМ АКТИВАЦИИ ГЕНОВ TLR9- и NFKB- СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ЛИМФОЦИТАХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Сергеева В.А., Вейко Н.Н., Ершова Е.С., Чудакова Ю.М., Каменева Л.В., Малиновская Е.М., Костюк С.В.

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Медико-генетический Научный Центр», Москва, Россия

Внеклеточная ДНК (вкДНК) циркулирует в крови и оказывает влияние на клетки организма. При некоторых заболеваниях (например, ревматоидный артрит, рак, ишемическая болезнь сердца) происходит накопление в составе вкДНК ГЦ-богатых последовательностей рибосомного повтора (ГЦ-рДНК). Исследовали влияние ГЦ-рДНК в составе вкДНК на лимфоциты здоровых людей и больных системной красной волчанкой. Показали, что ГЦ-богатые последовательности рДНК в составе вкДНК больных СКВ повышают экспрессию генов TLR9 и NF-kB – сигнальных путей в лимфоцитах здоровых людей, тогда как в лимфоцитах пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) фрагменты ГЦ-рДНК вызывают снижение экспрессии генов TLR9 и NFKB1. Таким образом, накопление в составе внеклеточной ДНК ГЦ-богатых последовательностей рибосомного повтора может являться регулятором ответа клеток на присутствие в циркуляции высоких концентраций внеклеточной ДНК.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, TLR9, лимфоциты, системная красная волчанка.

Известно, что фрагменты ДНК, содержащие неметилированные CpG-мотивы, обладают способностью связываться с белками семейства «Toll-like» рецепторов – TLR9 [1]. В составе вкДНК накапливаются ГЦ-богатые последовательности, что делает ее потенциальным лигандом TLR9. Высокие концентрации вкДНК в сыворотке крови пациентов, больных системной красной волчанкой (СКВ) активирует иммунную систему. Показано, что в процессе активации иммунной системы больных СКВ существенную роль играет TLR9, опознающий присутствующие в сыворотке больных СКВ фрагменты вкДНК [2]. Стимуляция TLR9 активирует TLR9- и NFkB – сигнальные пути, приводит к перемещению транскрипционного фактора NFkB в ядро и выбросу клетками большого количества провоспалительных цитокинов, что ведет к прогрессии заболевания [3].

Материалы и методы. G0-лимфоциты выделяли в системе фиколл-урографин из периферической крови (гепаринизированной) здоровых доноров. Выделение внеклеточной ДНК и геномной ДНК осуществляли с помощью стандартного метода фенол – хлороформной экстракции, в качестве модельной ГЦ–ДНК использовали CpG – богатый фрагмент транскрибируемой области рДНК (участок от 515 до 5321 в соответствии с HSU13369, GeneBank), встроенный в вектор pBR322 (п(рДНК)), длина последовательности 9504 п.н.

TLR9 – сигнальный путь ингибировали путем блокировки TLR9 добавлением хлорохина («Boots Company PLC», Англия) в концентрации 2 мкг/мл. РНК выделяли с использованием наборов YellowSolve («Клоноген», Россия), реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью реактивов фирмы «Силекс» (Россия). ПЦР проводили с использованием соответствующих праймеров (“Синтол”) и интеркалирующего красителя SybrGreen на приборе StepOnePlus («Applied Byosystems»):

GAPDH (GAAGGTGAAGGTCGGAGTC; GAAGATGGTGATGGGATTTC);
TLR9 (TGAAGACTTCAGGCCCAACTG; TGCACGGTCACCAGGTTGT);
NFKB1 (CAGATGGCCCATACCTTCAAAT; CGGAAACGAAATCCTCTCTGTT);
MAP4K4 (GAGCCACAGGTACAGTGGTC; AAGCCTTTTGGGTAGGGTCAG);
TNF (ATCAATCGGCCCGACTATCTC; GCAATGATCCCAAAGTAGACCTG);
IL6 (AAATTCGGTACATCCTCGACGGCA; AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCACAC);
RELA (CCCACGAGCTTGTAGGAAAGG; GGATTCCCAGGTTCTGGAAAC).

Результаты представлены в относительных единицах (экспрессия исследуемого белка в образце / экспрессии гена TBP). Приведены средние значения для 3-х независимых экспериментов.

Для статистической обработки и анализа данных использовали пакет программ PAST версии 2.17c.

Результаты. При действии фрагментов вкДНК больных системной красной волчанкой (вкДНК-СКВ) и модельного ГЦ-обогащенного фрагмента п(рДНК) в концентрации 50 нг/мл на лимфоциты здоровых доноров (N = 11) экспрессиия гена *TLR9* возрастает в 3,9 ± 0.3 и 2,9 ± 0,2 раз, соответственно.

Экспрессия генов NFkB – сигнального пути (*MAP4K4, RELA, NFKB1*) в лимфоцитах повышается соответственно в 3,7 ± 0,9 и в 3,2 ± 0,8 раз через 3 после инкубации с вкДНК-СКВ и п(рДНК) в концентрации 50 нг/мл и сохраняется повышенным в течение 24 часов. Активация NFkB – сигнального пути сопровождается его перемещением в ядро и связыванием с промоторной областью генов-мишеней. Уровень экспрессии генов *IL6* и *TNF* повышается в 2-4 раза (3-24 часа) и в 3 ± 0,5 раза (3 часа), соответственно, при добавлении п(рДНК), 50 нг/мл. Фрагменты вектора pBR322 без вставки и геномная ДНК (гДНК) не вызывают повышения экспрессии *TLR9* и не активируют NFkB – сигнальный путь.

Чтобы показать, что активация NFkB – сигнального пути инициируется ГЦ-богатыми фрагментами внеклеточной ДНК через TLR9 – сигнальный путь, ингибировали проведение сигнала с помощью хлорохина. При действии на лимфоциты здорового донора вкДНК-СКВ и п(рДНК) через 30 минут после добавления к лимфоцитам ингибитора TLR9 – хлорохина, уровень экспрессии гена *TLR9* и генов NFkB – сигнального пути (*MAP4K4, RELA, NFKB1*, *IL6, TNF*) не изменяется по сравнению с контролем.

Уровень экспрессии гена *TLR9* и *NFKB1* в лимфоцитах периферической крови при системной красной волчанке (СКВ, N = 8) повышен в 3,6 ± 0,6 раз и в 3,4 ± 0,5 по сравнению с уровнем экспрессии гена *TLR9* в лимфоцитах здоровых доноров.

Экспрессия генов *TLR9* и *NFKB1* в лимфоцитах больных СКВ снижается через 3 часа при однократном воздействии п(рДНК), 50 нг/мл по сравнению с интактными лимфоцитами больных СКВ, но остается повышенной в 2,4 ± 0,7 раз по сравнению со здоровым контролем.

Заключение. Было показано, что ГЦ-богатые последовательности в составе вкДНК больных СКВ активируют экспрессию генов TLR9 и NFkB – сигнальных путей в лимфоцитах здоровых доноров.

Поскольку при системной красной волчанке в крови постоянно циркулируют фрагменты вкДНК, уровень экспрессии генов *TLR9* и *NFKB1* в лимфоцитах больных СКВ повышен в среднем в 3,5 раза по сравнению с лимфоцитами здоровых доноров. Было показано, что ГЦ-богатая последовательность рибосомного повтора в составе вкДНК выступает в роли регулятора экспрессии рецептора TLR9, запуская механизмы обратной связи, регулирующие количество рецептора TLR9 на уровне транскрипции. Вероятно, это проявление приспособительной реакции клеток на повышенную концентрацию вкДНК в организме больного СКВ.

Исследование было поддержано грантами № 16-04-00576 А, 16-04-01099 А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee C. C., Avalos A. M., Ploegh H. L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function/ C. C. Lee, A. M. Avalos, H. L. Ploegh // Nat Rev Immunol.– 2012.– Vol. 3.– V. 12.– P. 168-179.
2. Distinct autoantibody profiles in systemic lupus erythematosus patients are selectively associated with TLR7 and TLR9 upregulation/ S. K. Chauhan, V. V. Singh, R. Rai et al. // J Clin Immunol.– 2013.– V. 33.– № 5.– P. 954-964.
3. Celhar T., Magalhães R., Fairhurst A. M. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong/ T. Celhar, R. Magalhães, A. M. Fairhurst // Immunol Res.– 2012.– V. 53.– P. 58-77.

GC-ENRICHED RIBOSOMAL REPEAT IN CELL-FREE DNA POOL REGULATES ACTIVATION OF TLR 9- AND NFkB-SIGNALING PATHWAY GENES IN LYMPHOCYTES OF HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Sergeeva V. A., Kostyuk S. V., Ershova E. S., Kameneva L. V., Chudakova Y. M., Veiko N. N.

Federal State Budgetary Institution "Research Centre For Medical Genetics", Moscow, Russia

Cell-free DNA (cfDNA) circulates throughout the bloodstream, affecting the cells. Diseases can cause GC-enrichment of the cfDNA pool (heart attack, rheumatic arthritis, cancer). However, the exact mechanism of cfDNA with cells is to be further investigated. Our aim was to investigate the exact mechanism of cfDNA-cell interaction. It was shown that cfDNA of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) stimulates TLR 9- and NFkB-signaling pathways in lymphocytes of healthy donors, whereas in SLE patients GC-rich cfDNA decreases the level of TLR 9 and NFKB 1. This may be an adaptive response of cells to the high concentration of GC-rich DNA in bloodstream.

Keywords: cell-free DNA, TLR 9, lymphocytes, systemic lupus erythematosus.

ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕМОЛИМФЫ МОЛЛЮСКОВ *BIOMPHALARIA GLABRATA* РЕЗИСТЕНТНОЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ЛИНИЙ

Серебрякова М. К.[1,2], Прохорова Е. Е.[2], Токмакова А. С.[2], Кудрявцев И. В.[1,3], Полевщиков А. В.[1,3], Атаев Г. Л.[2]

[1]ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; [2]Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, Санкт-Петербург; [3]Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия

Выполнен цитофлуориметрический анализ клеточного состава гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata* чувствительной и резистентной к трематодной инвазии линий. Показано относительно большее содержание гранулоцитов в гемолимфе улиток чувствительной линии. При этом накопление лизосомального красителя в гранулоцитах чувствительных моллюсков в среднем ниже, чем у резистентных особей.

Ключевые слова: гемоциты, проточная цитометрия, популяционный состав, *Biomphalaria glabrata,* резистентная и чувствительная линии.

Моллюски *Biomphalaria glabrata* служат одним из модельных объектов для изучения иммунных реакций брюхоногих. Путём направленных скрещиваний и отбора в лабораторных условиях были выведены линии моллюсков, отличающиеся по уровню резистентности к заражению трематодами [1]. Для них характерна разная интенсивность и динамика клеточного и гуморального ответа на трематодную инвазию [2]. В связи с этим встает вопрос о конститутивных физиологических отличиях между моллюсками различных линий.

Материалы и методы. В работе использовали моллюсков *Biomphalaria glabrata* (*Gastropoda*, *Pulmonata*, *Planorbidae*) чувствительной и резистентной к трематодному заражению линий. Гемолимфу собирали из кровеносного синуса в головном отделе моллюсков с помо-

щью стеклянной пипетки Пастера. Окраску проводили флуоресцентными красителями SYTO62 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain (далее SYTO62) и LysoTracker® Green DND-26 (далее LysoTracker) (Life Technologies, США) по методике описанной в [3]. Пробы анализировали на проточном цитометре BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, США). Для каждой из клеток оценивали параметры прямого и бокового светорассеяния и интенсивность флуоресценции красителей LysoTracker и SYTO62. Обработку результатов проводили в программном обеспечении Kaluza™ v.1.3 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили в программном обеспечении Statistica 8. Результаты представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q25, Q75). Для оценки достоверности различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. По параметрам прямого и бокового светорассеяния в гемолимфе *B. glabrata* выделяются три популяции клеток, различающихся по структуре и размеру. В состав первой популяции (A) входят гемоциты наименьшего размера, с простой организацией цитоплазматического компартмента (FSmed/SSmed). Две другие популяции (B и C) обладают более высокими параметрами бокового светорассеяния, свидетельствующими об их более сложной структуре, но отличаются друг от друга по размеру, что выражается в их разном положении относительно шкалы прямого светорассеяния (FShigh/SShigh и FSmed/SShigh). Выделенные клеточные популяции соответствуют описанным ранее в гемолимфе пульмонат гиалиноцитам (A) и гранулоцитам (B, C). Ранее отмечалось, что значение ядерно-цитоплазматического отношения у гранулоцитов сильно варьирует. Наиболее крупные и гранулированные клетки часто обозначают как отдельную популяцию мегацитов [4].

По уровню флуоресценции красителей SYTO62 и LysoTracker в общем пуле циркулирующих гемоцитов можно выделить четыре популяции клеток. Первая (D) характеризуется средним уровнем накопления клетками лизосомального красителя и низкой способностью аккумулировать SYTO62 (LTmed/S62low). Для второй группы клеток (E) характерен более высокий уровень содержания в клетках SYTO62, в то время как интенсивность флуоресценции LysoTracker остается на том же уровне (LTmed/S62med). В третьей фракции (F) уровень флуоресценции красителя LysoTracker минимальный среди всех клеток, а интенсивность свечения SYTO62 находится на уровне от среднего до высокого (LTlow/S62med-to-high). К четвертой популяции (G) могут быть отнесены гемоциты, демонстрирующие максимальную флуоресценцию обоих красителей (LThigh/S62high).

Сравнение популяционного состава гемоцитов *B. glabrata* выявило следующие различия между чувствительными и резистентными к трематодной инвазии животными. Относительное количество клеток в популяции C достоверно (p=0,033) отличалось у чувствительных (21,30 % (16,73;26,69)) и резистентных (14,06 % (9,88; 20,74)) моллюсков. Отмечены различия и в популяции F, для которой характерно сниженное количество лизосом в клетках при относительно высоком содержании нуклеиновых кислот (LTlow/S62med-to-high). Для чувствительных и резистентных моллюсков относительное количество клеток данной популяции составляло 32,68 % (22,92;38,75) и 13,07 % (9,73;29,40) соответственно (p=0,012).

Последовательное выделение популяций сначала на основании параметров прямого и бокового светорассеяния, а потом на основании параметров флуоресценции показало достоверное изменение содержания клеток фракций F, E и G в популяции гранулоцитов C. Для улиток резистентной линии эти популяции составили: F – 41,96 % (33,84;54,87), E – 26,99 % (20,00;30,92), G – 18,5 % (10,26;28,66), а для чувствительной: F – (58,97 % (46,58;67,99), E – 16,92 % (11,37;23,19), G – 9,64 % (6,41;13,83) при достоверности различий p=0,003, p=0,027 и p=0,014 соответственно. В популяции гранулоцитов C у резистентных улиток больше клеток с высоким содержанием лизосом (фракции G и E), по сравнению с чувствительными моллюсками. И наоборот, у улиток чувствительной линии среди гранулоцитов значительно больше клеток фракции F, для которых характерно меньшее количество лизосом. По результатам анализа транскриптомов моллюсков резистентных и чувствительных линий, последние характеризуются меньшим уровнем конститутивной экспрессии ферментов кислородного взрыва и других факторов цитотоксичности фагоцитов [5]. Большое содержание лизосом характерно именно для гранулоцитарных клеток гемолимфы. Поэтому, в качестве одной из гипотез о причинах

разной степени восприимчивости моллюсков к трематодозам рассматривается разная функциональная активность клеточных типов у резистентных и чувствительных моллюсков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The relationship between Shistosoma mansoni and Biomphalaria glabrata: genetic and molecular approaches / F. A. Lewis, C. N. Patterson, M. Knight et al. // Parasitology.– 2001.– V. 123.– P. 169-179.
2. Connors V. A. The schistosome-snail interaction: factors involved in host immunodefense activation and parasite killing in susceptible and resistant Biomphalaria glabrata / V. A. Connors // Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites.– 2003.– V. I.– P. 203-224.
3. Новый метод разделения популяций циркулирующих гемоцитов легочных моллюсков с помощью проточной цитометрии / М. К. Серебрякова, Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т 9 (18), № 2 (1).– С. 160-162.
4. Ataev G. L., Coustau C. Cellular response to Echinostoma caproni infection in Biomphalaria glabrata strains selected for susceptibility resistance / G. L. Ataev, C. Coustau // Dev Comp Imm.– 1999.– 23.– P. 187-198.
5. Larson M. K., Bender R. C., Bayne C. J. Resistance of Biomphalaria glabrata 13-16-R 1 snails to Schistosoma mansoni PR 1 is a function of haemocyte abundance and constitutive levels of specific transcripts in haemocytes / M. K. Larson, R. C. Bender, C. J. Bayne // Int J Parasitol.– 2014.– V. 44(6).– P. 343-353.

FLOW CYTOMETRY ANALISIS OF HAEMOLYMPH FROM *BIOMPHALARIA GLABRATA* SNAILS OF SUSCEPTIBLE AND RESISTANT LINES

Serebriakova M. K.[1,2], Prokhorova E. E.[2], Tokmakova A. S.[2], Kudryavtsev I. V.[1,3], Polevshchikov A. V.[1,3], Ataev G. L.[2]

[1]Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St.Petersburg; [2]Herzen State Pedagogical University of Russia, St.Petersburg, Russia; [3]School of Biomedicine of Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

The haemolymph from trematode-susceptible and trematode-resistant *Biomphalaria glabrata* snails was analyzed by flow cytometry. A relatively larger quantity of granulocytes in the haemolymph of susceptible snails was revealed. Besides, the lower level of accumulation of the lysosomal dye in granulocytes of susceptible snails compared to the resistant mollusks was indicated.

Keywords: haemocytes, flow cytometry, haemocyte subpopulations, *Biomphalaria glabrata*, susceptible and resistant lines.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ НЕЙТРОФИЛОВ В РАЗВИТИИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Сервули Е. А., Федорина А. С., Троянова Н. И., Шевченко М. А.

Институт Биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

В работе исследовали способность аллергена – овальбумина индуцировать нетоз в популяции активированных нейтрофилов костного мозга преиммунных мышей и мышей с аллергической астмой. Показали, что уровень внеклеточных нуклеотидов был достоверно выше в культуре нейтрофилов преиммунных мышей, чем у мышей с астмой. Внесение овальбумина повышало нетоз в культуре нейтрофилов преиммунных мышей, но не мышей с астмой. Так, овальбумин способен стимулировать нетоз, но при многократном введении снижает реактивности нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, аллергическая астма, клеточная гибель.

Нейтрофилы – гранулоцитарные лейкоциты врождённого иммунитета – играют важную роль в формировании иммунного ответа организма на экзогенные патогенны различной природы. По градиенту хемокинов они мигрируют в очаг воспаления, где осуществляют продукцию АФК и секретируют белки цитотоксических гранул. В процессе борьбы с патогенами нейтрофилы погибают одним из трёх возможных путей – апоптозом, что приводит к разрешению воспаления, некрозом или нетозом, что усугубляет воспалительный процесс. Нетоз – образование внеклеточных нитей ДНК в комплексе с гистонами, цитоплазматическими белками и белками цитотоксических гранул были обнаружены в тканях дыхательных путей пациентов с атопической астмой, причем, эти нити были образованы как эозинофилами – популяцией клеток характерной для заболеваний аллергической природы, так и нейтрофилами [1]. Вопрос о том, вызвано ли присутствие нейтрофилов и внеклеточных нитей (NETs) в дыхательных путях непосредственно ингаляцией аллергена или же присутствующими в организме и окружающей среде патогенами, не до конца ясен. Lommatch с соавторами [2] показали достоверное повышение уровня нейтрофилов после провокации аллергеном в дыхательных путях, как у пациентов-аллергиков, так и у сенсибилизированных мышей. Однако позже, на примере овальбумина, было показано, что очищенный от липополисахарида аллерген не вызывает повышения уровня IL-8 и притока нейтрофилов [3]. В то же время, в клинических исследованиях существует понятие «нейтрофильной астмы» [4], причем, показано, что приток нейтрофилов в дыхательные пути в ответ на аллерген ассоциирован с определенным генетическим фенотипом. Кроме того, известно, что нейтрофилы так же мигрируют в место повреждения тканей при травме и участвуют в развитии воспаления в отсутствии патогена. Таким образом, если даже изначально небольшие дозы попадающего в респираторный тракт аллергена не вызывают повреждения тканей дыхательных путей, то дегрануляция эозинофилов в ответ на повторные ингаляции вполне может быть стимулом для притока нейтрофилов. В тоже время, в моделях аллергического воспаления дыхательных путей с уровень нейтрофилов в дыхательных путях начинает повышаться в течение первых 4 часов после ингаляции и сохраняется повышенным до 24 часов [2]. В свете последних данных, касающихся иммуномодулирующей способности нейтрофилов [5], интерес к роли нейтрофилов в индукции и развитии аллергического воспаления дыхательных путей возрос.

Целью данного исследования было проследить изменение активности нейтрофилов костного мозга на различных стадиях индуцированного аллергического воспаления дыхательных путей.

Аллергическое воспаление дыхательных было индуцировано у мышей линии BALB/c путей путем комбинации последовательных внутрибрюшинных инъекций и орофарингеального введения овальбумина. Нейтрофилы из клеток костного мозга мышей были выделены негативной селекцией при помощи магнитной сепарации (MACS). С целью оценить способность аллергена индуцировать нетоз или некроз в популяции активированных нейтрофилов костного мозга, клетки подвергались активации с использованием форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA). Далее проводили 4-х часовую инкубацию при 37°C и 5% CO_2 в присутствии различных доз аллергена. Процент клеток, погибающих некрозом и (или) нетозом определяли путем оценки уровня внеклеточных нуклеотидов с использованием красителя SytoxGreen. Интенсивность флуоресценции измеряли при помощи планшетного флуориметра GloMax.

Активированные нейтрофилы костного мозга преиммунных мышей отвечали дозозависимым повышением уровня внеклеточных нуклеотидов на внесение овальбумина. В концентрации 10 мкмоль овальбумина наблюдали усиление нетоза и (или) некроза, тогда как 1 мкмоль овальбумина не оказывал достоверного влияния. При активации PMA нейтрофилов, выделенных из костного мозга мышей с индуцированным аллергическим воспалением дыхательных путей, уровень внеклеточных нуклеотидов был достоверно ниже по сравнению с уровнем, определяемым в случае нейтрофилов преиммунных животных. В отличие от нейтрофилов интактных мышей, внесение овальбумина даже в дозе 10 мкмоль не приводило к достоверному изменению уровня внеклеточных нуклеотидов в культуре активированных нейтрофилов, выделенных из костного мозга мышей с ин-

дуцированным аллергическим воспалением дыхательных путей.

Таким образом, непосредственное воздействие высоких доз аллергена на активированные нейтрофилы способствует гибели нейтрофилов нетозом и (или) некрозом. При этом многократное воздействие аллергена на организм, приводит к снижению уровня внеклеточных нуклеотидов в культуре активированных нейтрофилов костного мозга. Наблюдаемый эффект может быть следствием снижения активности нейтрофилов в процессе развития аллергического воспаления дыхательных путей.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-01028.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways / R. Dworski, H. U. Simon, A. Hoskins et al. // J Allergy Clin Immunol.– 2011.– V. 5, № 127.– P. 1260-1266.
2. The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma / M. Lommatzsch, P. Julius, M. Kuepper et al. // J Allergy Clin Immunol.– 2006.– V. 1, № 118.– P. 91-97.
3. T-cell polarization depends on concentration of the danger signal used to activate dendritic cells / M. Peters, K. Dudziak, M Stiehm et al. // Immunol Cell Biol.– 2010.– V. 5, № 88.– P. 537-544.
4. Immune responses of airway neutrophils are impaired in asthma / K. J. Baines, J. L. Simpson, R. J. Scott et al. // Exp Lung Res – 2009.– V. 7, № 35.– P. 554-569.
5. Cerutti A., Puga I., Magri G. The B-cell helper side of neutrophils / A. Cerutti, I. Puga, G. Magri // J Leukoc Biol.– 2013.– V. 4, № 94.– P. 677-682.

IMPACT OF NEUTROPHILS ON INDUCED ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION

Servuli E. A., Fedorina A. S., Troyanova N. I., Shevchenko M. A.

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Here we investigated the potential of allergen – ovalbumin to facilitate netosis in the population of bone marrow neutrophils of mice with induced allergic airway inflammation. We have shown that neutrophils from intact mice reacted with significantly higher extracellular nucleotide levels to activation by PMA than neutrophils of mice with induced asthma. Ovalbumin amplified netosis in activated neutrophils from intact mice but not from mice with asthma. Thus, ovalbumin can promote netosis in activated neutrophils, but continuous exposure of mice to ovalbumin suppresses the activity of bone marrow neutrophils.

Keywords: neutrophils, allergic airway inflammation, cell death.

СЕМАФОРИН SEMA4D В КОНТРОЛЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТОВ

Куклина Е. М., Некрасова И. В., Валиева Ю. В., Лопатина В. А.

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

Изучена роль семафорина IV класса Sema4D (CD 100) в контроле активации лимфоцитов периферической крови *in vitro*, с одновременным определением типа рецепторов, через которые реализуются эффекты семафорина. Показано непосредственное участие эндогенного Sema4D в пролиферативном ответе как Т-, так и В-лимфоцитов на поликлональную стимуляцию. Оценен вклад рецепторов для семафорина, CD 72 и плексина В1 в эти процессы. Обсуждаются возможные механизмы Sema4D-зависимого контроля функций лимфоцитов.

Ключевые слова: Sema4D, CD 72, плексин В1, лимфоциты, пролиферация.

Семафорин IV класса Sema4D представляет собой трансмембранный белок, который в иммунной системе экспрессируется преимущественно Т-лимфоцитами и, в существенно меньшей степени – остальными лейкоцитарными популяциями [1]. За счет протеолитического отщепления он может переходить в растворимую форму, сохраняя при этом функциональную активность [2]. Клетки иммунной системы экспрессируют два типа рецепторов для Sema4D – CD72 и плексин B1 [3, 1]. Более того, сам Sema4D может выступать не только в качестве лиганда, но и как рецептор, проводя сигнал в клетку, на которой он экспрессирован [4]. Поскольку и сам Sema4D, и рецепторы для него, широко представлены в иммунной системе, данный семафорин должен играть важную роль в контроле активации иммуноцитов.

Цель настоящей работы – определить роль Sema4D (CD100) в контроле активации Т- и В-лимфоцитов *in vitro*, и оценить вклад конкретных рецепторов в реализацию эффектов семафорина в этих клетках.

В работе исследовали лейкоциты здоровых доноров, которые выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см^3). Из полученной суспензии далее выделяли Т-лимфоциты ($CD3^+$-клетки) и В-лимфоциты ($CD19^+$-клетки) – фракционированием на иммуномагнитных частицах с помощью стандартных систем для выделения (R&D Systems). Т- и В-лимфоциты культивировали ($1{\cdot}10^6$ клеток/мл) в среде RPMI1640 (Gibco) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Serva), 300 мкг/мл L-глутамина (Serva), 0,01M HEPES (Sigma) и 100 мкг/мл гентамицина (Pharmacia) при 37 °C и 5% CO_2 – в присутствии поликлонального активатора или без активатора (спонтанный вариант) в течение 72 часов. В качестве активатора использовали анти-CD3/CD28 (Invitrogen) для Т-лимфоцитов и анти-IgM/IgG (Jacson Laboratories) + CD40L для В-клеток. По окончании культивирования определяли пролиферативный ответ клеток по включению синтетического аналога тимидина 5-бром-2'-дезоксиуридина (BrdU), который вносили в пробу за 18 часов до окончания,– с помощью набора Biotrack TM cell proliferation ELISA system (Amersham). Участие эндогенного Sema4D в этом процессе оценивали ингибиторным анализом, предполагающим блокаду Sema4D-зависимого сигнала за счет внесения в культуру блокирующего пептида к семафорину (Santa Cruz Biotechnology) за 1 час до активации лимфоцитов. Для оценки вклада конкретных рецепторов в реализацию Sema4D-зависимой регуляции лимфоцитов также использовали ингибиторный анализ, с внесением в культуру блокаторов CD72 и плексина B1 (Santa Cruz Biotechnology). Статистический анализ проводили с использованием парного *t*-критерия Стьюдента.

Анализ роли эндогенного Sema4D в активации лимфоцитов подтвердил предположение о непосредственном участии семафорина в функционировании этих клеток. В культуре фракционированных Т-лимфоцитов ($CD3^+$-клеток) блокада Sema4D статистически значимо подавляла пролиферативный ответ клеток на поликлональную активацию (Пролиферация, отн. ед.: 0,258 ± 0,029 – спонтанный вариант; 1,22 ± 0,206 – активированный вариант ($p < 0,05$ – в сопоставлении со спонтанным вариантом); 0,385 ± 0,050 – активация на фоне блокады Sema4D ($p < 0,05$ – в сопоставлении с активированным вариантом без блокады)). Аналогичный эффект выявлен и в культуре В-лимфоцитов ($CD19^+$-клеток) (Пролиферация, отн. ед.: 0,258 ± 0,025 – спонтанный вариант; 0,598 ± 0,132 – активированный вариант ($p < 0,05$ – в сопоставлении со спонтанным вариантом); 0,214 ± 0,022 – активация на фоне блокады Sema4D ($p < 0,05$ – в сопоставлении с активированным вариантом без блокады)). При этом исследование вклада конкретных рецепторов в реализацию эффектов семафорина в Т-лимфоцитах выявило участие в этом процессе CD72, но не плексина B1 (Пролиферация, отн. ед.: 1,22 ± 0,206 – активация без блокады рецепторов; 0,232 ± 0,041 – на фоне блокады CD72 ($p < 0,05$); 0,780 ± 0,124 – на фоне блокады плексина B1 ($p > 0,05$)), тогда как для В-лимфоцитов ситуация была иной – пролиферативный ответ В-клеток на активацию подавлялся на фоне блокады плексина B1, и имел тенденцию к снижению в присутствии ингибитора CD72 (Пролиферация, отн. ед.: 0,598 ± 0,132 – активация без блокады рецепторов; 0,408 ± 0,081 – на фоне блокады CD72 ($p > 0,05$); 0,282 ± 0,019 – на фоне блокады плексина B1 ($p < 0,05$)).

В целом, проведенные исследования показали, что эндогенный Sema4D участвует в контроле пролиферации как Т-, так и В-лимфоцитов в ответ на поликлональную акти-

вацию. Для В-клеток этот результат вполне закономерен: известно, что В-лимфоциты связывают семафорин через CD72, причем последний ассоциирован с антигенным рецептором, а Sema4D/CD72-зависимый сигнал играет позитивную роль в активации этих клеток, вызывая диссоциацию фосфатаз SHP1 от цитоплазматического домена CD72 и, таким образом, давая возможность В-лимфоциту активироваться в ответ на антиген [3, 5]. Однако, вопреки ожиданиям, при анализе вклада конкретных рецепторов в реализацию эффектов Sema4D в В-лимфоцитах достоверное подавление пролиферации отмечалось на фоне блокады плексина В1, тогда как в ответ на ингибирование CD72 наблюдалась только тенденция к снижению. Возможно, этот результат связан с тем, что аффинность плексина В1 на порядок выше, чем у CD72, и основная часть эндогенного Sema4D в системе перехватывается плексином. Однозначный ответ на этот вопрос требует отдельного исследования с использованием экзогенного семафорина в различных концентрациях, и с контролем уровня растворимого Sema4D в культуре. Что касается Т-лимфоцитов, подавление их пролиферации на фоне блокады семафорина еще более неожиданно: до сих пор Т-клетки рассматривались в качестве источника Sema4D – как мембранного, так и растворимого. Полученные данные свидетельствуют о том, что Т-лимфоциты могут также и принимать Sema4D-зависимые сигналы, и результаты оценки вклада конкретных семафориновых рецепторов в этот процесс подтверждают данное предположение: пролиферативный ответ клеток эффективно подавляется на фоне блокады CD72. Важно также отметить, что Sema4D может выступать не только в качестве лиганда, но и как рецептор, проводя сигнал в клетку, на которой экспрессирован [4], поэтому выявленное в работе снижение пролиферации клеток на фоне блокады семафорина может осуществляться как через рецепторы для Sema4D, CD72 и плексин В1, так и через сам семафорин при его связывании с рецептором, или через все три молекулы одновременно.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 15-04-05694).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mizui M., Kumanogoh A., Kikutani H. Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules / M. Mizui, A. Kumanogoh, H. Kikutani // J. Clin. Immunol.– 2009.– V. 29.– P. 1-11.
2. Functional soluble CD100/Sema4D realized from activated lymphocytes: possible role in normal and pathologic immune responses / X. Wang, A. Kumanogoh, C. Watanabe et al. // Blood.– 2001.– V. 97.– P. 3498-3504.
3. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling / A. Kumanogoh, C. Watanabe, I. Lee et al. // Immunity.– 2000.– V. 13.– P. 621-631.
4. The CD100 receptor interacts with its plexin B2 ligand to regulate epidermal gammadelta T cell function / D. A. Witherden, M. Watanabe, O. Garijo et al. // Immunity.– 2012.– V. 37.– P. 314-325.
5. Requirement for CD100-CD72 interactions in fine-tuning of B-cell antigen receptor signaling and homeostatic maintenance of the B-cell compartment / A. Kumanogoh, T. Shikina, C. Watanabe et al. // Int. Immunol.– 2005.– V. 17.– P. 1277-1282.

SEMAPHORIN SEMA4D IN THE CONTROL OF LYMPHOCYTE PROLIFERATIVE RESPONSE

Kuklina E. M., Nekrasova I. V., Valieva Yu.V., Lopatina V. A.

Federal State Budget Establishment of Science Institute of ecology and genetics of microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

The role of class IV semaphorin Sema4D (CD100) in the control of activation of lymphocyte of peripheral blood *in vitro* with simultaneous determination of the type of receptors through which the effects of semaphorin realized, has been studied. Displaying a direct part of endogenous Sema4D in the proliferative responses as the T-and B-lymphocytes to polyclonal stimulation. Judged the contribution of receptors for semaphorin, CD72 and B1 plexin in these processe. Discussed the possible mechanisms of Sema4D-dependent control of lymphocyte functions.

Keywords: Sema4D, CD72, B1 plexin, lymphocytes, proliferation.

ЭКСПРЕССИЯ АКТИВАЦИОННЫХ МАРКЕРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ОБРАЗЦАХ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Ляпунов В. А., Чистякова Г. Н., Ремизова И. И., Черешнев В. А.

ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

С целью оценки популяций активированных $CD157^+$-, $CD14^+CD282^+$- и $CD14^+CD64^+$-клеток проведено обследование 61 проб пуповинной крови детей гестационного возраста (ГВ) 22-27, 28-32 и 38-41 недель. У детей меньшего срока гестации (в сравнении с доношенными) установлено снижение содержания $CD157^+$-моноцитов и схожее количество активированных $CD14^+CD282^+$-моноцитов пуповинной крови, что может быть связано с низкой адгезивной способностью и активацией пролиферативной активности популяций моноцитов к данному сроку. Количество $CD64^+$ моноцитов не зависит напрямую от роста ГВ.

Ключевые слова: пуповинная кровь, активация моноцитов, рецепторы врожденного иммунитета.

По данным литературы, в настоящее время основные исследования направлены на изучение субпопуляционного состава активированных моноцитов недоношенных детей при различных патологических состояниях [1, 2, 3]. Вместе с тем, данные, касающиеся изучения фенотипических и функциональных характеристик моноцитов пуповинной крови детей различного гестационного возраста в литературе практически не освещены. Ранний этап развития организма основан на механизмах врожденного иммунитета ввиду недостаточности специфических адаптивных факторов [4].

Цель исследования. Оценить экспрессию активационных маркеров врожденного иммунитета в образцах пуповинной крови новорожденных детей различного гестационного возраста.

Материалы и методы. Проведено исследование образцов пуповинной крови 61 новорожденных с гестационным возрастом 22-27 недель (1-я группа, n=15), 28-32 недели (2-я группа, n=23) и новорожденных с ГВ 38-41 недель (3-я группа, n=23). Методом проточной цитофлуориметрии определялось содержание моноцитов и уровень экспрессии активационных маркеров исследуемых клеток $CD14^+CD282^+$, $CD14^+CD157^+$, $CD14^+CD64^+$. Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6. Данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (P25 и P75). Проверку статистических гипотез осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Уровень значимости межгрупповых различий (p) принимали, равным ≤0,017.

Результаты исследования. Проведенные исследования показали, что относительное и абсолютное содержание моноцитов у всех обследованных детей было сопоставимо: 9(8-10,25)% и $1,01(0,53\text{-}1,49)\times10^9$/л – 1-я группа, 8(7-8)% и $0,7(0,34\text{-}1,13)\times10^9$/л – 2-я группа, 8(7-10,5)% и $0,73(0,33\text{-}1,15)\times10^9$/л – 3-я группа (p>0,05). Статистически значимое снижение численности $CD14^+CD157^+$-клеток, отмечалось у детей гестационного возраста 22-27 и 28-32 недели: 27(17-42)% и $0,41(0,26\text{-}0,44)\times10^9$/л – 1-я группа, 26,5(20-47,75)% и $0,15(0,08\text{-}0,16)\times10^9$/л – 2-я группа, 73(63,75-82)% и $2,01(0,84\text{-}2,52)\times10^9$/л – 3-я группа (p<0,017). Доля активированных $CD14^+$ $CD64^+$ – моноцитов у детей 1-й и 2-й групп также была достоверно ниже аналогичных показателей доношенных детей (27(8-34)% и 3(2-14)% против 58(20-63)%, p<0,017); по абсолютным значениям $CD64^+$ клеток различий не выявлено. Достоверных различий по данным CD 282 моноцитов пуповинной крови в зависимости от гестационного возраста ребенка не обнаружено: $35(15\text{-}43)\%$, $0,26(0,19\text{-}0,6)\times10^9$/л

и 28(24,5-39,5)%, 0,14(0,1-0,28)×10^9/л в 1-й и 2-й группах против 34(29-55,3)%, 0,29(0,15-0,49)×10^9/л в 3-й группе, p>0,05, несмотря на то, что в литературе имеются данные о снижении экспрессии моноцитами Toll-like рецепторов 2 типа у детей 22-28 недель по сравнению с новорожденными гестационного возраста 34-36 недель на 1-2 сутки жизни [5]. Такие результаты могут быть связанны с контактом организма и внешних патогенов в течение первых суток после рождения.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что в возрасте 22-27 недель моноциты пуповинной крови новорожденных способны распознавать патоген-связанные молекулярные структуры грамположительных бактерий (липополисахариды). Однако способность к опосредованному фагоцитозу, сорбции антигенов и иммунных комплексов, а также участие в антителозависимой клеточной цитотоксичности в данном гестационном возрасте снижены. Несмотря на больший гестационный срок, для периода 28-32 недель характерны сниженные фагоцитарная активность и адгезия моноцитов. К возрасту 38-41 недель гестации активизируются процессы пролиферации и дифференцировки клеток, численность популяций активированных моноцитов значительно возрастает.

Таким образом, полученные данные диктуют необходимость дальнейшего исследования маркеров активации клеток моноцитарного ряда в динамике периода адаптации для прогнозирования нарушений иммунного реагирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фенотипическая и функциональная характеристика фагоцитарных клеток в крови недоношенных новорожденных детей в раннем неонатальном периоде / А. С. Беляева, Е. Н. Балашова, Л. В. Ванько и др. // Акушерство и Гинекология.– 2014.– № 10.– С. 59-65.
2. Фенотипические характеристики субпопуляций моноцитов $CD64^+CD16^-CD32^+CD11b^+$, $CD64^+$ $CD16^+$ $CD32^+CD11b^+$, $CD64^-CD16^+$ $CD32^+CD11b^+$ при врожденной пневмонии у глубоко недоношенных новорожденных / И. В. Нестерова, Г. А. Чудилова, Л. В. Ломтатидзе и др. // Иммунопатология и клиническая иммунология.– 2014.– № 1.– С. 33-37.
3. Du J., Li L., Dou Y. Diagnostic utility of neutrophil CD 64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates / J. Du, L. Li, Y. Dou // PLoS One.– 2014.– V. 9, № 7.
4. Чистякова Г.Н., Чарипова Б. Т. Особенности параметров иммунитета у детей с экстремально низкой массой тела разного срока гестации / Г. Н. Чистякова, Б. Т. Чарипова // Российский иммунологический журнал.– 2012.– Т. 6 (15), № 2.– С. 198-199.
5. Экспрессия паттерн-распознающих рецепторов (PRR) моноцитами и нейтрофилами недоношенных оворожденных различных сроков гестации / Н. Ю. Сотникова, А. В. Кудряшова, Т. В. Чаша и др. //Современные проблемы науки и образования – 2014 – № 6.

THE EXPRESSION OF ACTIVATION MARKERS OF INNATE IMMUNITY IN CORD BLOOD SAMPLES

Lyapunov V. A., Chistyakova G. N., Remizova I. I., Cherechnev V. A.

Ural Scientific Research Institute for Maternal and Infant Health, Ekaterinburg, Russia

In order to assess the populations of activated $CD157^+$ -, $CD14^+CD282^+$ – and $CD14^+CD64^+$ cells studied 61 umbilical cord blood samples from children with a gestational age (GA) of 22-27, 28-32 and 38-41 weeks. In children less gestational age (compared to full-term) found reduction of $CD157^+$ monocytes and a similar number of activated $CD14^+CD282^+$ cord blood monocytes, which may be associated with low adhesion ability and the activation of proliferative activity of populations of monocytes to a given date. The number of $CD64^+$ monocytes are not directly dependent on the growth of GA.

Keywords: cord blood, the activation of monocytes, innate immunity receptors

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ И ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА, РОДИВШИХСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Чистякова Г. Н., Устьянцева Л. С., Ремизова И. И., Ляпунов В. А.

ФГБУ «Уральский НИИ охраны материнства и младенчества» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Установлено, что дети, родившиеся от беременности, индуцированной ВРТ, имеют достоверно меньшие антропометрические показатели, высокий уровень инфекционно-воспалительной патологии, что сопровождается сниженной продукцией сывороточного IL-4 и сдвигом иммунорегуляторного индекса в сторону усиления эффекторного потенциала клеток на фоне лейкопении и лимфоцитоза.

Ключевые слова: пуповинная кровь, экстремально низкая масса тела, вспомогательные репродуктивные технологии.

Вспомогательные репродуктивные технологии активно используются во всем мире более 30 лет, за это время достигнут значительный прогресс по качеству перинатальных исходов. Однако, дети данной категории имеют повышенный риск перинатальной заболеваемости в сравнении с новорожденными от спонтанно наступившей беременности: у них чаще отмечается морфофункциональная незрелость, синдром дыхательных расстройств, внутриутробная инфекция, развитие кардиометаболических заболеваний [1, 2, 3]. У недоношенных детей, рожденных в результате индуцированной беременности отмечается функциональная недостаточность иммунной системы и замедлении созревания гуморальных реакций [4]. В настоящее время большинство исследований посвящено оценке состояния здоровья и изучению иммунитета детей, рожденных с помощью ВРТ, вне зависимости от гестационного возраста и массы тела при рождении, что определило актуальность настоящего исследования.

Цель исследования. Оценить популяционный состав лимфоцитов пуповинной крови и продукцию цитокинов у детей с ЭНМТ, родившихся в результате использования ВРТ.

Материалы и методы. Проведено обследование 49 детей, родившихся в сроке гестации 23-29 недель с ЭНМТ, подразделенных на 2-е группы по способу наступления беременности: 1-я группа – дети, родившиеся в результате ВРТ (n=24), 2-я группа – дети, родившиеся от спонтанно наступившей беременности (n=25). Популяционный состав лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии, содержание цитокинов (IFN-γ и IL-4) в пуповинной крови – методом ИФА. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel и Statistica 6. Данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, P25 и P75). Уровень значимости межгрупповых различий принимали ≤0,05.

Результаты исследования. Гестационный возраст детей обеих групп к моменту рождения был сопоставим 27 (26,25-28,25) и 28 (26-28) недель соответственно. Согласно таблице Fenton (2015), массо-ростовые пока-

затели детей с ЭНМТ в 50 % и 44 % случаев соответствовали гестационному возрасту. У новорожденных с ЭНМТ, родившихся в результате ВРТ, была достоверно меньшая масса 790 (647,5-908,75) против 840 (790-950) г ($p<0,015$) и длина тела 28,5 (26,5-31,25) против 32 (30-34,25) см ($p_{1-2}<0,0001$). Частота рождения детей оперативным путем в 1-й группе была в 1,3 раза выше (75 % против 58,3 %), значимых различий не выявлено. Новорожденные 1-й группы чаще рождались в очень тяжелом состоянии (37,5 % и 16 % случаев), что нашло отражение в достоверно низкой оценке по шкале Апгар 3,5(3-4)/5,5(5-6) против 4(3-5)/6(6-6) баллов ($p<0,014$). По частоте встречаемости тяжелого гипоксически-ишемического поражения центральной нервной системы и респираторного дистресс-синдрома дети были сопоставимы (100 % во всех случаях). Уровень инфекционно-воспалительной патологии был достоверно выше у детей, родившихся от беременности, индуцированной ВРТ (частота рентгенологически и клинически подтвержденной пневмонии 75 % против 36 %, $p<0,01$, сепсис в 33,3 и 12 % случаях, $p=0,09$).

У всех детей с ЭНМТ при анализе показателей пуповинной крови отмечалась лейкопения, что может быть обусловлено как особенностью раннего онтогенеза, так и дефектным лейкопоэзом в костном мозге в условиях внутриутробного неблагополучия. Наименьшее количество лейкоцитов отмечалось у детей, родившихся от беременности, индуцированной ВРТ (4,9 (3,3-5,6) против 6,3 (4,2-7,03)$\times 10^9$/л детей 2-й группы, $p<0,05$). Содержание лимфоцитов у новорожденных 1-й группы статистически значимо превышало показатели детей, родившихся от спонтанной беременности (81 (75-92) против 75 (70,5-80)%, $p<0,05$). Различий в абсолютном количестве лимфоцитов не выявлено (4,51 (2,47-4,54) против 4,29 (3,2-5,2) $p>0,05$). Численность основных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов в пуповинной крови новорожденных обеих групп была сопоставима, за исключением повышенного количества $CD8^+$-клеток, как в процентном, так и в абсолютном значении (24 (22-25) против 21 (18-23)%, $p<0,05$ и 1,08 (1-1,1) против 0,86 (0,7-1,06), $p<0,05$), что свидетельствует о сниженной хелперной активности лимфоцитов у детей от женщин с беременностью индуцированной экстракорпоральным оплодотворением (ЭКО). Соотношение $CD4^+/CD8^+$ лимфоцитов у новорожденных 1-й группы относительно показателей недоношенных 2-й группы было достоверно ниже (1,62 (1,57-1,62) против 2,21 (1,57-2,45) усл.ед., $p<0,05$). Количество сывороточного IFN-γ в пуповинной крови обследованных новорожденных достоверно не отличалось (1,89 (1,55-3,51) и 3,34 (1,89-3,34) пг/мл). У детей, родившихся от женщин с беременностью, индуцированной ВРТ, отмечалось сниженное содержание IL-4 (0,38 (0,18-0,59) против 2,02 (1,41-2,55) пг/ мл 2-й группы $p<0,001$) и повышенное соотношение про- и противовоспалительных цитокинов IFN-γ/IL-4 – 4,97 (8,6-5,95) против 1,65 (1,3-1,34) усл.ед. во 2-й группе, $p<0,001$.

Выводы. Таким образом, новорожденные от беременности, индуцированной ВРТ, имеют достоверно меньшие антропометрические показатели, высокий уровень инфекционно-воспалительной патологии, что сопровождается сниженной продукцией сывороточного IL-4 и сдвигом иммунорегуляторного индекса в сторону усиления эффекторного потенциала клеток на фоне лейкопении и относительного лимфоцитоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новикова Н. О., Ипполитова Л. И. Особенности раннего неонатального периода детей после экстракорпорального оплодотворения /Н.О. Новикова, Л. И. Ипполитова //Вестник новых медицинских технологий.– 2013.– Т.XX, № 2.– С. 271-273.
2. Мансимова В. О. Современное состояние проблемы здоровья детей, рожденных в результате вспомогательных репродуктивных технологий / В. О. Мансимова // Педиатрическая фармакология.– 2011.– Т. 8, № 2.– С. 27-31.
3. Прогестерон-зависимые механизмы сосудистой регуляции в ранние сроки беременности после ВРТ. Связь с особенностями гемодинамики плода / Г. Н. Чистякова, И. А. Газиева, П. Б. Цывьян и др. //Проблемы репродукции.– 2015.– Т. 21, № 4.– С. 71-75.
4. Рищук С. В., Мирский В. Е. Вспомогательные репродуктивные технологии как ятрогенный фактор ухудшения здоровья детского населения /С. В. Рищук, В. Е. Мирский //Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал).– 2013.– № 4.

POPULATION STRUCTURE OF CORD BLOOD LYMPHOCYTES AND THE PRODUCTION OF CYTOKINES IN CHILDREN WITH EXTREMELY LOW BIRTH WEIGHT, WERE BORN AS A RESULT OF THE USE OF ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

Chistyakova G. N., Ust'janceva L.S., Remizova I. I., Lyapunov V. A.

Ural Scientific Research Institute for Maternal and Infant Health, Ekaterinburg, Russia

It was found that children born from pregnancy induced by ART had significantly lower anthropometric indices, the high level of infectious and inflammatory diseases, which is accompanied by a reduced production of serum IL-4 and shifts of immunoregulatory index towards strengthening the potential capacity of effector cells against the background of leukopenia and lymphocytosis.

Keywords: cord blood, extremely low body weight, assisted reproductive technologies.

ПРОДУКЦИЯ IFN-γ И IL-4 У ДЕТЕЙ С ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МИКРОБНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ КИШЕЧНИКА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Устьянцева Л. С., Ремизова И. И., Чистякова Г. Н., Гаврилова Л. И., Скареднова Е. Ю., Билимова С. И.

ФГБУ «Уральский НИИ охраны материнства и младенчества» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Установлено что, колонизация кишечника условно-патогенной микрофлорой в динамике периода адаптации ассоциирована с увеличением продукции IL-4 на локальном уровне. Определение содержания IL-4 в копрофильтратах и концентрации IFN-γ в сыворотке крови, может служить дополнительным маркером нарушения биоценоза кишечника у детей с ЭНМТ в неонатальном периоде.

Ключевые слова: недоношенные дети, колонизация кишечника, цитокины.

Формирование адаптивного иммунитета у ребенка начинается в период ранней микробной колонизации кишечника, существенная роль в этом процессе принадлежит бифидо- и лактобактериям, запускающим продукцию цитокинов активированными фагоцитарными клетками [1, 2]. Изменение качественного и/или количественного состава микрофлоры кишечника влияет на баланс Th1/Th2 клеток хелперов, определяя либо иммунологическую толерантность относительно нормальной микрофлоры, либо иммунный ответ на патогены [3].

Цель. Оценить изменение характера микрофлоры кишечника и продукцию IFN-γ и IL-4 на локальном и системном уровне у детей с экстремально низкой массой тела при рождении и по достижению постконцептуального возраста 38-40 недель.

Проведено бактериологическое и иммунологическое обследование 27 детей с ЭНМТ, родившихся на 25-31 неделе гестации, из них: 12 детей с дисбиозом кишечника I-II степени (1-я группа) и 15 новорожденных с нормофлорой кишечника (2-я группа). Микробиологическое исследование фекалий проводили по методике количественного посева. Идентификацию выделенных культур – с помощью коммерческих биохимических тест-систем фирмы «LACHEMA» (Чехия). Исследование микрофлоры кишечника проводили на 5-7

и 26-30 сутки жизни, а также в постконцептуальном возрасте 38-40 недель. Содержание IFN-γ и IL-4 определяли с помощью тест-систем «Вектор-Бест» (Россия), sIgA – «ImmunDiagnostik» (Германия). Исследования проводили: кровь – при рождении, в 1 месяц жизни и по достижению постконцептуального возраста (ПКВ) 38-40 недель; в копрофильтратах – в 1месяц жизни и в ПКВ. Статистическую обработку результатов иследований проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel и Statistica 6. Данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, P25 и P75). Использовали U-критерия Манна-Уитни и точный критерия Фишера. Уровень значимости межгрупповых различий (p) принимали ≤0,017.

В 75 % и 60 % случаев, дети с ЭНМТ 1-й и 2-й групп родились способом операции кесарева сечения. Несмотря на то, что в первые сутки жизни грудное вскармливание регистрировалось в обеих группах в 66,7 % и 73,3 % наблюдений, отсутствие микрофлоры в кишечнике в раннем неонатальном периоде имели более половины детей с ЭНМТ (75 % и 66,7 % соответственно), что, по-видимому, обусловлено применением антибактериальной терапии. Видовой состав микрофлоры в обеих группах детей был представлен, как грамотрицательными, так и грамположительными бактериями в равном соотношении. Содержание микрорганизмов в копрофильтратах не превышало 10^5 КОЕ/г. К завершению неонатального периода количество детей получавших грудное молоко, значимо не изменялось, однако, возросла персистенция толстой кишки условно-патогенной микрофлорой в 2,3 и 1,8 раза с 25 % и 33,3 % до 58,3 % и 60 % случаев в 1-й и 2-й группах соответственно. Ассоциации микроорганизмов не выявлены. Наблюдалось отсутствие грамположительных бактерий, что объясняется в первую очередь длительным пребыванием детей в стационаре и присоединением госпитальной микрофлоры. По достижению детей ПКВ 38-40 отмечалось расширение спектра колонизирующих микроорганизмов. Нарушения, выявленные в аэробной микрофлоре у детей 1-й группы, характеризовались отсутствием в фекалиях кишечной палочки и выделением из образцов *K. pneumoniae, K. Oxytova, Pseudomonas spp, S. Maltophilia* в количестве, превышающем 10^6-10^7 КОЕ/мл. В 60 % случаев у детей 2-й группы наблюдалось появление представителей кокковой микрофлоры (*S. epidermidis, E. faecium*) и в 40 % наблюдений определялись энтеробактерии и неферментирующие грамотрицательные бактерии в титре, не превышающем 10^4 КОЕ/мл.

Известно, что степень защиты от бактериальных и вирусных инфекций желудочно-кишечного тракта зависит от содержания sIgA, основная функция которого заключается в нейтрализации токсинов и вирусов. При исследовании уровня sIgA в копрофильтратах у детей 1-й и 2-й групп в 1 месяц жизни значимых различий не выявлено (914,4(149,2-960,7) против 952,8(892,7-960,2) мкг/мл, p>0,05).

На протяжение всего периода обследования содержание IFN-γ у детей с дисбиозом статистически значимо превышало таковые детей 2-й группы (12,25(11,0-67,1) против 5,13(1,17-9,75) пг/мл – пуповинная кровь, 7,79(1,38-12,42) против 2,21(0,0-4,7) пг/мл – в 1 месяц жизни и (7,25(3,46-9,51) против 2,76(0,55-3,87) пг/мл – в ПКВ) (p<0,05). Уровень IL-4 в пуповинной крови детей 1-й группы был достоверно снижен (0,59(0,38-1,03) против 2,46(1,99-2,9) пг/мл 2-й группы, p<0,05), повышаясь к возрасту 1 месяца жизни до значений детей 2-й группы (1,84(0,73-2,36) против 1,77(1,58-1,91) пг/мл), сохраняясь на этом уровне в ПКВ (1,77(1,58-1,91) против 2,25(2,03-2,52) пг/мл). При индивидуальном анализе иммунологических параметров установлено, что у всех детей с дисбиозом в динамике периода адаптации преобладал Th-1 путь иммунного ответа. У детей с отсутствием нарушений биоценоза кишечника начиная с 1-го месяца жизни в 46,7 % случаев, баланс цитокинов смещался в сторону Th2-зависимого иммунного ответа, достигая 80 % в ПКВ. Анализ продукции цитокинов на локальном уровне показал, что у новорожденных 2-й группы IFN-γ не определялся во все периоды обследования. У детей с дисбиозом IFN-γ выявлен в 25 % случаев в 1 месяц и в 50 % наблюдений в ПКВ. При этом содержание IL-4 у детей с дисбиозом в 1 месяц жизни и в ПКВ было в 11,2 и 1,3 раза ниже показателей детей 2-й группы. Соотношение провоспалительных и регуляторных цитокинов в копрофильтратах у всех детей в динамике периода наблюдения имело гуморальную направленность.

Таким образом, колонизация кишечника условно-патогенной микрофлорой в динамике периода адаптации ассоциирована с увеличением продукции IL-4 на локальном уровне.

Определение содержания IL-4 в копрофильтратах и концентрации IFN-γ в сыворотке крови, может служить дополнительным маркером нарушения биоценоза кишечника у детей с ЭНМТ в неонатальном периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walker W. A. Роль микрофлоры в развитии защитных функций кишечника / W. A. Walker // Педиатрия – 2005.– Т. 84, № 1.– С. 8-9.
2. Особенности состояния иммунной системы и характер микробной колонизации детей с экстремально низкой массой тела при рождении / Г. Н. Чистякова, Б. Т. Чарипова, М. Н. Тарасова и др. // Педиатрия.– 2013.– Т. 92, № 2.– С. 42-48.
3. Бениова, С.Н., Столина, М.Л., Руденко, Н. В. Заболевания желудочно-кишечного тракта у доношенных и недоношенных новорожденных / С. Н. Бениова, М. Л. Столина, Н. В. Руденко // Современные проблемы науки и образования.–2012.– № 3.– С. 45-49.

PRODUCTS IFN-γ AND IL-4 IN INFANTS WITH EXTREMELY LOW BIRTH WEIGHT DEPENDING ON BOVEL MICROBIAL COLONIZATION IN THE POSTNATAL PERIOD

Chistyakova G. N., Remizova I. I., Ustyantseva L. S., Lyapunov V. A.

Ural Scientific Research Institute for Maternal and Infant Health, Ekaterinburg, Russia

It was found that the colonization of the intestinal pathogenic microflora in the dynamics of the adaptation period is associated with an increase in IL-4 production at the local level. Determination of IL-4 in coprofiltrates and IFN-γ concentration in serum can serve as an additional marker of intestinal biocenosis disturbances in children with neonatal ELBW.

Keywords: premature infants, intestinal colonization, cytokines.

ВЛИЯНИЕ ПЕРСИСТЕНЦИИ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Пронина Н. А., Свиридова В. С.

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

С привлечением современных иммунологических методов исследования освещены аспекты иммунопатогенеза ревматоидного артрита, осложненного хронической герпесвирусной инфекцией. Установлено, что ревматоидный артрит и хроническая герпепесвирусная инфекция сопровождаются выраженным дисбалансом продукции иммнорегуляторных Th1/Th2-цитокинов иммунокомпетентными клетками перифирической крови. При этом у пациентов с ревматоидным артритом в сочетании с хронической герпесвирусной инфекцией уровень секреции IL-2 и IFN-γ ниже, а IL-4, напротив,– выше, чем при изолированных формах заболевания.

Ключевые слова: иммунопатогенез ревматоидного артрита, герпесвирусная инфекция, цитокины.

По данным ВОЗ, вирусом простого герпеса инфицировано 90 % взрослого населения планеты [3]. Герпес-вирус обладает способностью длительно сохраняться в макроорганизме, может поражать различные органы и системы, вызывая хроническую форму инфекции.

Также существует мнение о возможной роли герпес-вируса в качестве триггерного фактора в развитии ревматоидного артрита (РА). Это предположение основывается на фактах обнаружения антигена вируса простого герпеса в тканях суставов и клетках крови больных ревматоидным артритом[1, 4].

В связи с этим, целью настоящего исследования явилась оценка влияния персистенции герпес-вируса на продукцию цитокинов мононуклеарами перифирической крови у пациентов с ревматоидным артритом.

Материалы и методы. В исследование были включены 46 пациентов (26 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 40 до 50 лет. В первую группу были включены 20 человек, страдающих ревматоидным артритом без клинических и лабораторных проявлений герпетической инфекцией. Во вторую группу вошли 12 пациентов с ревматоидным артритом в сочетании с хронической герпесвирусной инфекцией в стадии ремиссии. Диагностический титр антител к вирусу простого герпеса 1 типа составлял 1:800 до 1:3200, антитела к вирусу простого герпеса 2 типа были отрицательны. В третью группу были включены 14 пациентов, страдающих герпесвирусной инфекцией. Титр антител к вирусу простого герпеса 1 типа составлял 1:800 до 1:3200, антитела к вирусу простого герпеса 2 типа не выявлялись.

Концентрацию иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-4, IFN-γ) определяли в супернатантах культур мононуклеаров. Продукцию иммуноцитокинов стимулировали добавлением в среду фитогемагглютинина (ФГА). Определение цитокинов проводили иммуноферментным анализом при помощи тест систем («Cytimmune», США).

Результаты. Как показало проведенное нами исследование, уровень IL-2 у пациентов с ревматоидным артритом в сочетании с герпесвирусной инфекцией достоверно ($p \leq 0,05$) ниже как спонтанный, так и стимулированный по сравнению со значениями в первой и третей группах. Концентрация IFN-γ после стимуляции фитогемагглютинином (ФГА) достоверно ($p \leq 0,05$) ниже также у пациентов II группы, по сравнению с I и III группами. Однако, исходная концентрация IFN-γ у пациентов всех трех групп резко не отличалась.

Базальный уровень продукции IL-4 был достоверно ($p \leq 0,05$) выше у пациентов с хронической герпесвирусной инфекцией по сравнению с пациентами первой группы и второй группы. Аналогические изменения имели место при регистрации стимулированного уровня продукции IL-4. Таким образом, нам удалось выявить, что наличие у пациентов с РА персистенции герпес-вируса, приводит суммарно к более глубокому дефекту цитокиновой продукции, а следовательно, и всей иммунной системы.

Обсуждение. В ряде работ [1, 5] показано, что как при ревматоидном артрите, так и при хронической герпесвирусной инфекции, в изолированном виде имеет место функциональный дисбаланс равновесия Th-1/Th-2 в сторону повышения функции последних. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при сочетании у пациентов ревматоидного артрита и персистенции хронической вирусной инфекции наблюдается более выраженное угнетение функциональной активности Th-1 и, наоборот,– стимуляции Th-2. Механизмы подавления синтеза цитокинов IL-2 и IFN-γ у пациентов с сочетанной патологией не достаточно изучены. По-видимому, имеет место не один, а несколько типов ингибирования. Имеются данные о том, что ВПГ вызывает существенные нарушения регуляции иммунного ответа, в основе которых лежат повреждения системы интерлейкинов [2]. Как правило, подавляется способность инфицированных иммунокомпетентных клеток синтезировать IL-2, IL-1 за счет избыточной продукции простагландинов [2], которая имеет место как при ревматоидном артрите, так и при персистенции ВПГ. Сообщают также об ассоциации вирусной инфекции с потерей способности Т-лимфоцитами экспрессировать рецепторы к IL-2 [2]. Уменьшение количества этих рецепторов приводит к уменьшению эффектов, которые дает IL-2, являясь основным ростовым фактором для Т-клеток, вероятно, способствуя тем самым истощению популяции Т-лимфоцитов. Существует предположение о том, что ВПГ может блокировать внутриклеточную передачу сигналов от рецептора IFN и снижать секрецию IL-2 и IFN-γ активированными Т-лимфоцитами [3]. Совокупность всех этих факторов вызывает смещение баланса Th1/Th2 в пользу Th2, что мы и наблюдали в нашей работе.

Выводы. Таким образом, наличие хронической герпесвирусной инфекции у пациентов с ревматоидным артритом, приводит к более глубоким дефектам в иммунной системе. Не-

обходимо дальнейшее изучение влияния вирусной инфекции в патогенезе ревматидного артрита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камолов З.С Функцианальная активность естественных киллеров и продукция интерлейкинов при ревматоидном артрите / З.С. Камолов //Аллергалогия и иммунология.– 2004.– Т. 5, № 1.– С. 95.
2. Кологривова Е.Н. Роль местного иммунитета слизистой ротовой полости в патогенезе хронических воспалительных и неопластических процессах: дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук. / Е.Н. Кологривова.– Томск, 2001.– 287с.
3. Наследникова И.О. Имунопатогенез персистентных вирусных инфекций: дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук. /И.О. Наследникова.– Томск, 2005.– 343 с.
4. Петров А.В., Дударь Л.В., Малый К.Д. Персистенция различных инфекционных агентов в мононуклеарных лейкоцитах крови в дебюте ревматоидного артрита / А.В. Петров, Л.В. Дударь, К.Д. Малый // Тер. архив.– 2004.– № 5.– С. 32-35.
5. Редькин Ю.В., Одокиенко А.Ю. Показатели интерферонового статуса при герпетической инфекции / Ю.В. Редькин, А.Ю. Одокиенко // Russian Journal of Immunolgy.– 2004.– V.9, № 1.– С. 178.

IFLUENSE OF HERPES SIMPLEX VIRUS PERSISTENCE UPON PRODUCTION OF CYTOKINES BY IMMUNOCOMPETENT CELL IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Pronina N.A., Sviridova V.S.

Siberian state medical univercity, Tomsk, Russia

Using modern immunological methods of studies, we investigated some immunopathogenetic aspect of rheumatoid arthritis complicated by chronic herpesvirus infection. It was established that both rheumatoid arthritis, and chronic herpesvirus infection are accompanied by pronounced imbalance in reduction of immunoregulatory Th1/Th2-cytokines produced in immunocompetent cell of peripheral blood. In case of rheumatoid arthritis complicated with herpes simplex infection, IL-2 and IFN-γ levels were decreased, whereas IL-4 levels proved to be increased, as compared with isolated diseases under study.

Keywords: immunopathogenesis of rheumatoid arthritis, herpesvirus infection, cytokines.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ДЕТЕЙ С ПЕЧЕНОЧНЫМИ ФОРМАМИ ГЛИКОГЕНОВОЙ БОЛЕЗНИ

Курбатова О.В., Закиров Р.Ш., Сурков А.Н., Никитин А.В., Самохина И.В., Фрейдлин Е.В., Потапов А.С., Петричук С.В.

ФГАУ НЦЗД МЗ РФ, Москва, Россия

При гликогеновой болезни наблюдается повышение уровней циркулирующих цитокинов, зависящее от ее типа. Анализ полученных данных позволяет выделить наиболее информативные цитокины для оценки степени повреждения печени, к ним относятся: TNF-α, IFN-γ, IL-12p70, IL-8, IL-5, IL-2, IL-4, IL-6. Определение концентраций циркулирующих цитокинов в плазме крови можно использовать как дополнительный критерий оценки степени повреждения печени при ГБ.

Ключевые слова: гликогеновая болезнь, цитокины, дети.

Содержание сывороточных цитокинов отражает стадии фиброза печени и степень гистологической активности воспалительного процесса при хронических болезнях печени различной этиологии [1, 2, 3, 4]. Заболевания, протекающие с фибротическими изменения-

ми в печени, могут быть вызваны разнообразными этиологическими факторами, например, вирусами, аутоантителами, холестазом, метаболическими нарушениями, алкоголем и прочими [1, 3, 4]. К одному из заболеваний, вызванных метаболическими нарушениями, относится гликогеновая болезнь (ГБ). Возникновение ГБ обусловлено дефектами ферментов, участвующих в распаде гликогена. К печеночным формам ГБ относятся: I тип, связанный с дефектом глюкоза-6-фосфатазы, III тип, обусловленный дефектом гликоген-деветвящего фермента и VI тип, возникающий при дефекте фосфорилазной или фосфокиназной системы [2]. Эти дефекты приводят к повышению содержания гликогена нормальной структуры в случае I и VI типов и измененной – при типе III. Наиболее часто наблюдаемые клинические симптомы ГБ – это увеличение печени, мышечная слабость, носовые кровотечения. Со стороны лабораторных показателей отмечается снижение pH (до 7,34 и ниже), гипогликемия (0,6-3,0 ммоль/л), повышение уровня лактата (3,0-10,0 ммоль/л), нарушение липидного профиля, повышение сывороточных концентраций АЛТ и АСТ[1]. На фоне накопления липидов в гепатоцитах (их жировой дистрофии) нарушается β-окисление жирных кислот, усиливаются процессы свободнорадикального окисления липидов. Накопление продуктов окисления вызывает некроз гепатоцитов, способствует развитию воспалительного процесса, повышению синтеза провоспалительных цитокинов. Показана информативность определения фактора некроза опухоли альфа (TNF-α), интерлейкинов IL-6, IL-8 и др., которые активируют звездчатые клетки, продуцирующие компоненты соединительной ткани и способствующие апоптозу гепатоцитов, при диагностике степени фиброза при ожирении, сахарном диабете и хроническом гепатите С у взрослых [3,4]. Однако, при ГБ такие данные отсутствуют.

Цель работы: оценить информативность определения цитокинового профиля у детей с ГБ в зависимости от типа болезни и стадии фиброза печени.

Материалы и методы. На базе ФГАУ НЦЗД МЗ РФ в динамике было обследовано 56 детей с ГБ в возрасте от 1 года до 17 лет, у которых исследовано 94 образца плазмы крови. Распределение количества исследований в зависимости от типа заболевания: с ГБ I типа – 39, III типа – 25 и VI типа – 30 образцов. Оценка стадии фиброза проводилась с помощью метода транзиентной эластографии печени, выполненной на аппарате FibroScan F502(EchoSence, Франция). Концентрацию 13 циркулирующих цитокинов (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17- α, TNF-α, TNF-β, TGF-β и IFN-γ) определяли мультиплексным количественным методом с использованием проточной цитофлуориметрии (BenderMed Systems GmbH, Германия). Статистическая обработка результатов выполнена с помощью пакета Statistica6.0. (критерий Манна-Уитни, $p<0,05$). Данные представлены в виде медианы, нижней и верхней квартили. Корреляционный анализ выполнен методом множественной пошаговой регрессии с исключением.

Результаты. У всех пациентов с ГБ выявлено увеличение уровней циркулирующих цитокинов. Наиболее часто повышались: IL-2 в 82 % случаев, IL-8 – 80 %, IL-5 – 75 %, IL-1β – 61 %, IL-4 – 62 %, IL-12p70 – 55 %, IL-6 – 53 %, IL-17-α – 48 %, IL-10 – 47 %, IFN-γ – 46 %, TNF-α – 36 %, TNF-β – 10 %. Степень увеличения содержания цитокинов зависела от типа заболевания: при ГБ III типа и ГБ VI типа концентрации IL-2, IL-5 и IL-1β были достоверно выше, чем при ГБ I типа ($p<0,05$). Концентрация IL-2: ГБ I – 43,9 [0;106] пкг/мл, ГБ III – 96,4 [51,6;213] пкг/мл, ГБ VI – 74,3 [27;123] пкг/мл. Концентрация IL-5: ГБ I – 250 [0;607] пкг/мл, ГБ III – 468 [121;898] пкг/мл и ГБ VI – 454 [44;974] пкг/мл. Концентрация IL-1β: при ГБ I – 0 [0;50] пкг/мл, ГБ III – 34,6 [11;69] пкг/мл, ГБ VI –34,5 [0;75] пкг/мл. При обследовании 56 детей с ГБ (119 госпитализаций) фиброз печени стадии F1 выявлялся у 23 % обследованных пациентов, F2 – в 38 %, F3 – в 11 % и F4 – в 4 % случаев. Наиболее часто выраженные фибротические изменения наблюдалась при III типе ГБ (F4 – у 35 %, F3 – 12 %, F2 – 8 %, F1 – 27 % пациентов с этим типом), и I типе (F4 – у 4 %, F3 – 11 %, F2 – 38 %, F1 – 23 % пациентов с этим типом), тогда как при VI типе ГБ фибротические изменения отсутствовали (F0 – 89 %) или были минимальны (F1 – 11 %). Выявлены корреляционные зависимости между степенью фиброза печени и уровнями цитокинов плазмы крови, отличающиеся при различных типах ГБ. При ГБ I типа степень фиброза в большей степени зависит от возраста пациентов($R=0,91$). Вероятно, это связано с участием цитокинов в патогенезе других сопутствующих заболе-

ваний, таких как, остеопороз, хронический панкреатит, подагрический артрит и др. Для ГБ III типа степень фиброза печени увеличивается не только с возрастом, но и при повышении концентраций TNF-α, IFN-γ, IL-12p70, и уменьшается при повышении концентраций IL-2, IL-4, IL-6 (R=0,96). У пациентов VI типа ГБ возраст не оказывал влияния на наличие фибротических изменений в печени, в уравнение регрессии вошли наиболее информативные цитокины: повышение концентрации IL-12p70, IL-8, IL-5 увеличивают вероятность фиброза, увеличение концентрации IL-2, IL-4, IL-6 снижает ее (R=0,95). Анализ уровня цитокинов в зависимости от стадии фиброза показал, что концентрации цитокинов: TGF-β, TNF-α, IL-17- α, IL-12p70, IL-10, IL-1β, IL-6, IL-4, IL-5 – выше при начальных стадиях фиброза (F1-F3) и снижаются к стадии F4, что возможно связано с сокращением числа клеток паренхимы печени, замещения их соединительной тканью. Одним из информативных показателей оценки степени тяжести заболевания у пациентов с ГБ является размер печени, однако ранее было показано [1,2], что степень увеличения печени связано с отложением гликогена в гепатоцитах и не всегда соответствует степени фиброза. Анализ показал, что у всех детей с ГБ степень увеличения печени прямо коррелирует с уровнем TNF-α и выраженностью фиброза и обратно зависит от концентрации IL-5, (R=0,7).

Заключение. При ГБ наблюдается повышение уровней циркулирующих цитокинов, зависящее от типа ГБ. Анализ полученных данных позволяет выделить наиболее информативные цитокины для оценки степени повреждения печени, к ним относятся: TNF-α, IFN-γ, IL-12p70, IL-8, IL-5, IL-2, IL-4, IL-6. Определение концентраций циркулирующих цитокинов в плазме можно использовать как дополнительный критерий оценки степени повреждения печени при ГБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диагностика фиброза и цирроза печени у детей с помощью серологических маркеров / А. Н. Сурков, А. С. Потапов, И. Е. Смирнов и др. // Вестник РУДН, серия Медицина.– 2009.– № 4.– С. 158-162.
2. Сурков А.Н., Гликогеновая болезнь у детей: современные представления /А.Н. Сурков // Вопросы современной педиатрии.– 2012.– Т. 11, № 2.– С. 30-42.
3. Цитокины/хемокины, как иммунологические биомаркеры хронического вирусного гепатита С / Н. А. Арсентьева, Н. Е. Любимова, А. В. Семенов и др. // Медицинская Иммунология.– 2015.– Т. 17.– С. 175.
4. Комшилова К. А., Трошина Е. А., Бутрова С. А. Неалкогольная жировая болезнь печени при ожирении / К. А. Комшилова, Е. А. Трошина, С. А. Бутрова // Ожирение и метаболизм.– 2011.– № 3.– С. 3-11.

THE CYTOKINE PROFILE IN CHILDREN WITH HEPATIC FORM OF GLYCOGEN STORAGE DISEASE

Kurbatova O., Zakirov R., Surkov A., Nikitin A., Samokhina I., Freidlin E., Potapov A., Petrichuk S.

FSAI "Scientific Center of Children's Health" Of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Observed is increase in the level of circulating cytokines, depending on the type of glycogen storage disease. The most informative of cytokines was TNF-α, IFN-γ, IL-12r70, IL-8, IL-5, IL-2, IL-4, IL-6. Determination of circulating cytokines can be used as an additional criterion for assessing the degree of liver damage in children with glycogen storage disease.

Keywords: glycogen storage disease, cytokines, children.

ЭФФЕКТЫ КАТЕЛИНОПОДОБНОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Юхнев В. А.[1], Филатенкова Т. А.[1], Артамонов А. Ю.[1], Пазина Т. Ю.[1], Шамова О. В.[1,2]

[1]ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины»; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Изучение взаимодействия эффекторных звеньев врожденного иммунитета важно для понимания механизмов реализации защитных реакций, в том числе реакций противоопухолевой защиты, в которых немаловажную роль играют естественные киллерные клетки. Нами исследованы эффекты кателиноподобного белка (КПБ) человека, одного из компонентов гранулярного аппарата нейтрофилов, на цитотоксическую активность естественных киллерных клеток линии NK-92 в отношении клеток эритромиелоидного лейкоза человека К-562 *in vitro* с применением набора реагентов DELFIA TRF Assay. Установлено, что в присутствии КПБ цитотоксическая активность NK-92 для клеток-мишеней повышается на 55-60 % при соотношениях эффектор: мишень 12,5:1 и 3:1.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, кателино-подобный белок.

Кателицидины – защитные молекулы системы врожденного иммунитета, содержащиеся преимущественно в фагоцитах и клетках барьерных эпителиев. В гранулах нейтрофилов кателицидины присутствуют в виде молекул, состоящих из N-концевого кателино-подобного домена и С-концевого вариабельного участка [1]. При развитии патологических процессов, сопровождающихся дегрануляцией нейтрофилов, кателицидины высвобождаются во внеклеточное пространство, где под действием ферментов гранулярного аппарата нейтрофилов расщепляются на кателино-подобный белок (КПБ) и антимикробный пептид (АМП). У человека антимикробный пептид-кателицидин носит название LL-37, а полноразмерный (нерасщепленный) кателицидин – hCAP18. Биологическая активность пептида LL-37 интенсивно изучалась, показано, что он проявляет антимикробную, иммуномодулирующую активность и спектр других эффектов. Роль кателино-подобного белка в реализации защитных реакций остается неясной, в частности не исследовалось его влияние на функциональную активность клеток, участвующих в антимикробной, противовирусной, противоопухолевой защите организма. Нами ранее было показано модулирующее действие КПБ на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови человека, стимулированными введением липополисахарида, *in vitro* [2]. В рамках данной работы проведено изучение возможности модулирования этим белком функциональной активности естественных киллерных (ЕК) клеток. Актуальность данного исследования связана с решением фундаментальной задачи расшифровки молекулярных механизмов функционирования системы врожденного иммунитета, а также выяснения роли эффекторных молекул нейтрофилов в функционировании противоопухолевой защиты.

Целью работы явилось исследование эффектов кателино-подобного белка (КПБ) на цитотоксическую активность естественных киллерных клеток линии NK-92 в отношении клеток эритромиелоидного лейкоза человека К-562 в культуре.

Материалы и методы. Оценку цитотоксического действия полипептидов в отношении культивируемых клеток человека проводили с использованием стандартного МТТ-теста [3,4]. Для характеристики эффектов исследуемых соединений на цитотоксическую активность естественных киллерных клеток (ЕК) применяли набор реактивов DELFIA TRF Assay (PerkinElmer, США), измерения проводили на

флуориметре FLUOstar Omega (BMG Labtech, Германия) в режиме отсроченной во времени флуоресценции. В качестве эффекторных клеток использовали линию естественных киллерных клеток человека NK-92 (ATCC CRL-2407), любезно предоставленную проф. Кэмпбэллом (Fox Chase Cancer Center, Филадельфия, США). Клетки линии NK-92 воспроизводят основные фенотипические и функциональные характеристики ЕК клеток. Клетками-мишенями служили клетки эритромиелоидного лейкоза человека – К-562. Клетки-мишени инкубировали с BATDA реагентом и отмывали в соответствии с рекомендациями производителей набора, затем по 5000 клеток/пробу смешивали с эффекторами NK-92 в соотношениях 25:1, 12:1 и 3:1 в питательной среде RPMI-1640 с 10 % сывороткой крупного рогатого скота. К суспензии клеток добавляли по 10 мкл исследуемых полипептидов и инкубировали при 37°С в CO_2 инкубаторе в течение 4-х часов. В контрольные пробы вместо полипептидов вносили среду в том же объеме, другие контроли содержали клетки-мишени без эффекторов с полипептидами или интактные клетки К-562. В конце инкубации клетки осаждали, отбирали супернатант, смешивали с раствором Европия и через 20 минут проводили измерения в режиме отсроченной во времени флуоресценции. В работе использованы химически синтезированный пептид LL-37 фирмы AnaSpec (США), и рекомбинантный белок КПБ, произведенный фирмой BiologicsCorp (США). Статистическую обработку данных проводили в программе Prism5 (GraphPad Software Inc., США). Достоверность различий между группами оценивали с применением U-критерия Манна-Уитни. Во всех расчетах за достоверный принимали 95 % уровень значимости ($P<0,05$).

Результаты исследований. Исследованы эффекты действия КПБ человека и пептида LL-37 в разных концентрациях на цитотоксическую активность ЕК клеток линии NK-92 в отношении клеток эритромиелоидного лейкоза человека К-562 в культуре при различных соотношениях мишень: эффектор (1:25; 1:12,5 и 1:3). Концентрации полипептидов подбирали по результатам МТТ-теста, учитывая, что соединения в этих концентрациях не проявляют существенного цитотоксического действия ни в отношении клеток-мишеней (К-562), ни клеток-эффекторов (NK-92). Установлено, что при добавлении LL-37 в инкубационную среду в концентрациях 1 мкМ, 2 мкМ и 5 мкМ цитотоксичность NK-92 в отношении клеток К-562 (при всех исследуемых соотношениях мишень: эффектор) не изменяется по сравнению с клетками-мишенями, обработанными эффекторными клетками NK-92 в отсутствие пептида. При добавлении КПБ (1 мкМ) в пробы, где происходила коинкубация ЕК клеток и мишеней в соотношении 12,5:1 и 3:1, наблюдалось достоверное повышение цитотоксического действия клеток NK-92 на 55 % и 60 %, соответственно, по сравнению с показателями цитотоксической активности контрольных проб (эффекторы и мишени без полипептидов), принятых за 100 %. При внесении КПБ в пробы, где присутствовали клетки NK-92 и К-562 в соотношении 25:1 достоверного повышения цитотоксического действия ЕК-клеток не наблюдалось. Сходные результаты были получены нами при исследовании влияния АМП нейтрофилов животных – протегрина 1 и бактенецина 5 на цитотоксическую активность спленоцитов крыс в отношении клеток К-562: пептиды проявляли выраженное стимулирующее действие при соотношении эффектор: мишень 5:1, но не 100:1, 50:1 и 25:1 [4]. Возможно, при повышении числа клеток-эффекторов часть полипептидов сорбируется на их поверхности и не участвует во взаимодействии с клетками-мишенями. Выяснить природу наблюдаемого эффекта помогут наши дальнейшие исследования. Полученные данные предоставляют информацию о ранее неизвестных эффектах КПБ, что важно для выяснения его возможной биологической роли, а также для расширения представлений о различных аспектах влияния компонентов нейтрофильных гранулоцитов на функционирование факторов противоопухолевой защиты организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity / M. Zanetti // Journal of Leukocyte Biology.– 2004.– V. 75.– P. 39-47.
2. Юхнев В. А., Юхнева, М. А. // Российский Иммунологический Журнал.– 2015.– Т. 9 (18), № 2(1).– С. 359-361.
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // J Immunol Methods.– 1983.– 65.– P. 55-63.
4. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нор-

мальные клетки в культуре / Шамова О. В., Сакута Г.А, Орлов Д. С. и др. // Цитология.– 2007.– Том 49, № 12.– С. 1000-1010.

5. Пазина Т. Ю., Шамова О. В. // Российский Иммунологический Журнал.– 2015.– Т. 9 (18), № 2 (1).– С. 30-32.

EFFECTS OF HUMAN CATHELIN-LIKE PROTEIN ON THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF NATURAL KILLER CELLS *IN VITRO*

Yukhnev V. A.[1], Philatenkova T. A.[1], Artamonov A. Yu.[1], Pazina T. Yu.[1], Shamova O. V.[1,2]

[1]Institute for experimental medicine; [2]Saint Petersburg State University, St-Petersburg, Russia

Investigation of an interaction of effector molecules and cells of the innate immune system is important for elucidation of mechanisms of implementation of host defense reactions, including antitumor defense, where natural killer cells play a crucial role. We have investigated effects of human cathelin-like protein (CLP), a component of neutrophil granules, on the cytotoxic activity of natural killer cell line NK-92 toward human erythromyeloblastoid leucosis cells K-562 *in vitro* by using DELFIA TRF Assay. It was shown that in presence of CLP the cytotioxic activity of NK-92 for the target cells was enhanced by 55-60 % upon a ratio of effector: target – 12.5:1 and 3:1.

Keywords: innate immunity, cathelin-like protein.

МОДУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ С АГРЕССИВНО-ПОДОБНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, ОБРАБОТАННЫХ *IN VITRO* НЕЙРОЛЕПТИКОМ

Маркова Е. В.[1], Княжева М. А.[1], Амстиславская Т. Г.[2]

[1]ФГБНУ « НИИ фундаментальной и клинической иммунологии»; [2]ФНГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

Показано, что трансплантация спленоцитов с модулированной *in vitro* аминазином у сингенных реципиентов с агрессивно-подобным поведением в «открытом поле» вызывает изменение функциональной активности нервной системы, проявляющееся в снижении параметров ориентировочно-иссследовательского поведения, активности мышей в тесте принудительного плавания, регистрируемых на фоне модуляции продукции ряда регуляторных цитокинов клеткакми головного мозга.

Ключевые слова: иммунные клетки, трансплантация, поведение.

Взаимодействие основных адаптационных систем организма подразумевает регулирующее влияние со стороны иммунной системы и ее клеточных элементов на функции центральной нервной системы. Установлено, что продукты иммунокомпетентных клеток обладают психо- и нейротропным эффектом; формирование иммунного ответа на различные антигены сопровождается модуляцией процессов высшей нервной деятельности; иммунологические механизмы участвуют в формировании поведенческих и эмоциональных реакций животных и человека, что обеспечивает регуляцию динамического гомеостаза [1, 2]. Как показали наши

предыдущие исследования, функциональная активность иммунной системы и, в частности, ее клеточных элементов, связана с уровнем ориентировочно – исследовательского поведения (ОИП); и параметры данной поведенческой реакции могут быть направленно изменены путем трансплантации иммуннокомпетентных клеток с определенными функциональными характеристиками [1, 3, 4].

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности получения нейролептического эффекта у экспериментальных животных с агрессивно-подобным типом поведения путем трансплантации клеток иммунной системы с модулированной *in vitro* аминазином функциональной активностью.

Материалы и методы. Работа выполнена на мышах-самцах (СВАхС 57Bl/6)F1 в возрасте трех месяцев, полученных из лаборатории экспериментальных животных (моделей) ФГБНУ «НИИФКИ» (г. Новосибирск). Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 10 особей в каждой, не менее 2-х недель до начала эксперимента на стандартной диете, при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме.

ОИП мышей оценивали в тесте "открытое поле". По характеру поведения в «открытом поле» мыши (СВАхС 57Bl/6) F1 достоверно разделяются на три группы: с высоким, средним и низким уронем поведения [1, 3]. Учитывая специфический эффект аминазина, в экспериментах в качестве доноров и реципиентов использовались исключительно животные, характеризующиеся высоким (агрессивно-подобным) уровнем ОИП. Иммунные клетки для трансплантации выделяли из суспензии спленоцитов, обрабатывали *in vitro* аминазином ($15x10^6$ клеток / 150 мкг аминазина в присутствии 3 % FCS в течение 25 минут); затем, после 3-кратного отмывания, внутривенно вводили мышам-реципиентам в концентрации $15x10^6$ клеток в объеме 0,3 мл физиологического раствора на одно животное. Концентрация нейролептика, применяемая для обработки клеток, определялась путем перерасчета терапевтической дозы, с учетом веса и особенностей метаболизма животных. В контрольной группе животных подготовка и трансплантация спленоцитов проводилась в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что последние культивировались без присутствия аминазина. Пролиферативный ответ трансплантируемых клеток оценивали общепринятым методом реакции бластной трансформации лимфоцитов, как это было описано ранее [3].

У мышей-реципиентов определялись параметры функциональной активности нервной системы: поведение в тесте «открытое поле» и в тесте принудительного плавания по Порсолту с использованием компьютеризованного оборудования фирмы Noldus International Technology; количественное содержание цитокинов в лизатах головного мозга определялось ИФА (ELISA) с использованием специфических компонентов к цитокинам мыши («R&D Systems», Великобритания) [4]. Статистическую обработку результатов проводили с применением t-критерия Стьюдента и парного критерия Манна-Уитни (компьютерная программа"Statistica 6.0"). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Культивирование спленоцитов с аминазином изменяло их функциональную активность, что проявлялось в снижении спонтанной пролиферативной активности (628,9±204 имп/ мин и 144,0±47,6 имп/ мин в контрольной и опытной группах соответственно; $p < 0,05$) и модуляции продукции регуляторных цитокинов: снижении ЛПС-стимулированной продукции ИЛ-1β, спонтанной и стимулированную митогенами продукции ФНОα и ИЛ-6.

Трансплантация указанных клеток мышам-реципиентам с агрессивно-подобным типом поведения вызывала у последних достоверное снижение параметров горизонтальной и вертикальной двигательной активности в тесте «открытое поле», что свидетельствует о подавлении как моторного, так и исследовательского компонентов ОИП [5]. У мышей с агрессивным типом поведения после трансплантации регистрировалось также снижение активного поведения в тесте принудительного плавания по Порсолту. Наиболее релевантным показателем в данном тесте является мобильность животных. У мышей-реципиентов выявлено значительное уменьшение периодов мобильности и увеличение периодов пассивного плавания (дрейф + полная неподвижность) в воде. Указанные выше изменения в поведении мышей-реципиентов после клеточной трансплантации регистрировались на фоне достоверного повышения содержания цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНОα, ИНФγ в головном мозге, опосредующих функциональное взаимодействие

нервной и иммунной систем и принимающих непосредственное участие в реализации поведенческих реакций, как в норме, так и при различных патологических состояниях [1, 2, 3].

Заключение. В настоящем исследовании показана возможность получения нейролептического эффекта у экспериментальных животных с агрессивно-подобным типом поведения путем трансплантации клеток иммунной системы, функциональная активность которых была изменена экстракорпоральной обработкой аминазином. Однонаправленное влияние большинства психоактивных препаратов на ЦНС и иммунную систему позволяет рассматривать иммунокомпетентные клетки в качестве модельных объектов для воздействия на межсистемную функциональную взаимосвязь. Данный подход исключает нежелательные побочные эффекты, возникающие при непосредственном приеме указанных препаратов, что расширяет возможности использования последних; равно как и возможности применения клеточной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маркова Е. В. Механизмы нейроиммунных взаимодействий в реализации поведенческих реакций / Е. В. Маркова // Красноярск: 2012.– 236 с.
2. Ader R. Psychoneuroimmunology / R. Ader // University of Chicago Press.– 2007.– V.1.– 1269 p.
3. Особенности функционирования клеток иммунной системы у особей с агрессивно- и депрессивно-подобным типами поведения / Е. В. Маркова, М. А. Княжева, Т. В. Рюмина и др. // В мире научных открытий.– 2014.– № 8(56).– С. 131-148.
4. Влияние трансплантации лимфоидных клеток селезенки на функциональную активность иммунной и нервной систем у экспериментальных животных / Е. В. Маркова, В. В. Абрамов, Т. Г. Рябичева и др. //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2009.– Т. 147.– № 4.– С. 435-440.
5. Маркова Е. В., Княжева М. А., Козлов В. А. Клеточные механизмы нейроиммунных взаимодействий в регуляции ориентировочно-исследовательского поведения / Е. В. Маркова, М. А. Княжева, В.А Козлов / /Сибирский вестник психиатрии и наркологии.– 2013.– № 1 (76).– С. 49-52.

NERVOUS SYSTEM FUNCTIONAL ACTIVITY MODULATION IN EXPERIMENTAL ANIMALS WITH AGGRESSIVELY SIMILAR BEHAVIOR BY THE TRANSPLANTATION OF IMMUNE CELLS TREATED *IN VITRO* WITH NEUROLEPTICS

Markova E. V.[1], Knyazheva M. A.[1], Amstislavskaya T. G.[2]

[1]Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; [2]Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

It was shown that transplantation of splenocytes with chlorpromazine modulated functional activity in syngeneic recipients with aggressive- like behavior in the "open field" caused a changes in the functional activity of the nervous system, manifested in the reduction of exploratory behavior parameters, activity of mice in the forced swimming test, registered on the background of the modulation of cytokine production in the brain

Keywords: immune cells, transplantation, behavior.

ВЛИЯНИЕ β-ЭНДОРФИНА НА ДИНАМИКУ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ МЫШИ *IN VIVO*

Баева Т. А.[1], Небогатиков В. О.[2], Тендрякова С. П.[1,2]

[1]ФБГУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;
[2]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Установлено, что в системе *in vivo* β-эндорфин стимулирует зимозан-индуцированную секрецию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами мыши. Выраженность эффекта зависит от дозы и сроков введения пептида.

Ключевые слова: β-эндорфин, макрофаги, хемилюминисценция, зимозан.

Опиоидные пептиды рассматриваются как важнейшие коммуникационные сигнальные молекулы, обеспечивающие тесное взаимодействие между нервной и иммунной системой. Клетки врожденного иммунитета – одна из важнейших мишеней эндогенной опиоидной системы, которая участвует в регуляции их цитокиновой секреции, бактерицидного потенциала и процессов хемотаксиса [1]. Наиболее активным и функционально значимым представителем эндогенной опиоидной системы является β-эндорфин, основным источником которого служит гипофиз [2]. Клетки иммунной системы в ответ на попадание антигена, либо в присутствии высоких концентраций провоспалительных цитокинов, также способны продуцировать β-эндорфин, обладающий широким спектром иммунорегуляторных эффектов, реализуемых по пара- и аутокринному механизму [3]. Одним из важнейших физиологических проявлений присутствия β-эндорфина в очаге воспаления может являться изменение локальной продукции активных радикалов кислорода макрофагами в процессе воспаления, которое, в конечном итоге, может снижать выраженность воспалительных реакций или, наоборот, расширять воспалительный процесс до системного уровня. Благодаря тому, что β-эндорфин подвергается быстрому гидролизу в кровотоке [4], в современной литературе он позиционируется как молекула короткодистантного действия, оказывающая непродолжительные эффекты на физиологические процессы. Тем не менее, работ, анализирующих динамику влияния пептида на различные показатели в зависимости от временного интервала, не представлено.

Цель работы – исследовать динамику продукции активных форм кислорода (АФК) перитонеальными макрофагами мыши в системе *in vivo* в зависимости от времени воздействия бета-эндорфина.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен в системе *in vivo* на белых беспородных мышах средней массой 25-33 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария с 12-часовым циклом освещения, с неограниченным доступом к воде и пище (гранулированный корм). β-эндорфин (Skytek laboratories, США) вводили однократно внутрибрюшинно в объеме 150 мкл в дозах 100, 1, 0.01, 0.0005 мкг/кг, животные контрольной группы получали эквиобъемное количество физиологического раствора. Половину экспериментальных животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом спустя 1 час после введения β-эндорфина, другую половину – через 6 часов после введения пептида. Перитонеальные макрофаги выделяли по стандартной методике [5].

Для оценки продукции АФК использовали реакцию люминолзависимой хемилюминисценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах, концентрация клеток составляла 10^5 кл/лунку. Для индукции респираторного взрыва в лунки до-

полнительно вносили опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛЗХЛ использовался люминол (10^{-5}М). Регистрация результатов проводилась в течение часа с пятиминутным интервалом на многофункциональном спектрофотометре TECAN (Австрия).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа для непарных данных и LSD-критерия Фишера для post-hoc сравнения.

Результаты. Установлено, что спонтанные уровни кислородсодержащих радикалов не зависели от срока введения β-эндорфина и статистически значимо не отличались от уровней АФК у животных контрольных групп в течение всего периода наблюдения. При внесении в клеточные культуры опсонизированного зимозана в концентрации 150 мкг/мл в группах животных, которым вводили β-эндорфин, наблюдалось выраженное усиление секреции АФК. Наиболее выраженное стимулирующее влияние β-эндорфин оказывал при введении за 1 час до эксперимента. В этом случае самой активной оказалась доза 100 мкг/кг, ее эффект сохранялся в течение всего периода наблюдений. При введении пептида в дозах 1 и 0,01 мкг/кг были зарегистрированы менее выраженные стимулирующие эффекты, которые постепенно затухали к 40 минуте наблюдения. У животных, которым β-эндорфин или физ. раствор вводили за 6 часов до забоя, уровень продукции активных форм кислорода стимулированными макрофагами был значительно выше, чем в аналогичных группах, где препараты вводили за 1 час до забоя. При оценке ЛЗХЛ через 6 часов после введения препаратов было показано, что β-эндорфин в дозах 100 и 1 мкг/кг оказывал выраженный стимулирующий эффект на уровень АФК, по сравнению с животными контрольной группы, но только в течение первых 15 минут наблюдения.

Таким образом, несмотря на то, что β-эндорфин является молекулой короткодистантного действия из-за быстрого гидролиза в кровотоке, его стимулирующий эффект на микробицидную активность макрофагов сохраняется на протяжении 6 часов после введения экспериментальным животным. Вероятнее всего, это опосредованный эффект пептида, связанный с усилением секреции в организме других регуляторных молекул и последующей активацией ими своих сигнальных каскадов.

Работа поддержана грантом программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гейн С. В., Баева Т. А. Эндогенные опиоидные пептиды в регуляции функций клеток врождённого иммунитета / С. В. Гейн, Т. А. Баева // Биохимия. – 2011. – Т. 76, № 3. – С. 379-390.
2. Solomon S. POMC-derived peptides and their biological action /S. Solomon // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1999. – Vol. 885. – P. 22-40.
3. Smith E. M. Neuropeptides as signal molecules in common with leukocytes and the hypothalamicpituitary-adrenal axis / E. M. Smith // Brain Behav. Immun. – 2008. – V. 22. – P. 3-14.
4. β-Endorphin: Analgesic and hormonal effects in humans / K. M. Foley, I. A. Kourides, C. E. Inturrisi at al. // Proc. Nati. Acad. Sci. USA. – V. 76, No. 10. – P. 5377-5381.
5. Кондратьева И. А., Ярилин А. А. Практикум по иммунологии / И. А. Кондратьева, А. А. Ярилин // Москва: «Академия», 2004. – 272 с.

INFLUENCE OF β -ENDORPHIN ON DYNAMIC OF ACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION BY PERITONEAL MURINE MACROPHAGES *IN VIVO*

Baeva T. A.[1], Nebogatikov V. O.[2], Tendryakova S. P.[1,2]

[1]Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS;
[2]Perm State National Research University, Perm, Russia

It is found that *in vivo* β-endorphin stimulates zymosan-induced secretion of reactive oxygen species by murine peritoneal macrophages. Expressiveness of effect depended up peptide doses and time of its action.

Keywords: β-endorphin, macrophages, chemiluminiscense, zymosan.

ВЗАИМОСВЯЗЬ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА С ПОКАЗАТЕЛЯМИ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У ПАЦИЕНТОВ С АБДОМИНАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ И ИЗБЫТКОМ МАССЫ ТЕЛА

Сумеркина В. А., Телешева Л. Ф., Маркова В. А.

ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия

В исследовании оценивали состояние клеточного звена иммунитета у молодых пациентов с абдоминальным ожирением (АО) и избытком массы тела. У пациентов с АО и нормальной массой тела установлена дислипидемия и повышение уровня лептина. Значимых изменений субпопуляционного состава лимфоцитов не обнаружено. Сочетание АО с избытком массы тела сопровождалось дислипидемией, гипергликемией, дисбалансом адипокинов и повышением числа лимфоцитов с фенотипом $CD3^+HLADR^+$. У пациентов с АО и ожирением 1-3 степени помимо изменений углеводного, липидного обмена и дисбаланса адипокинов обнаружено повышение абсолютного содержания лейкоцитов, моноцитов, Т-хелперов, $CD3^+HLADR^+$-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

Ключевые слова: абдоминальное ожирение, избыток массы тела, субпопуляции лимфоцитов.

В последние годы по всему миру отмечен неуклонный рост числа пациентов с избытком массы тела и ожирением. Сочетание абдоминального ожирения (АО) с нарушениями углеводного, липидного обмена и артериальной гипертензией объединяют в метаболический синдром (МС). Доказано, что ожирение и МС ассоциированы с повышенным риском развития сердечно-сосудистых, эндокринных и других хронических неинфекционных заболеваний [1]. Многие исследователи акцентируют внимание на изменении иммунного статуса у пациентов с ожирением и МС [2], а также повышенной вероятности развития у них инфекционных, онкологических заболеваний, а также более длительном и тяжёлом течении воспалительных процессов [3].

Цель. Оценить состояние клеточного звена иммунитета у молодых пациентов с абдоминальным ожирением и избытком массы тела.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 85 пациентах обоего пола в возрасте от 20 до 45 лет с абдоминальным ожирением (в соответствии с Национальными рекомендациями «Диагностика и лечение метаболического синдрома» Российского кардиологического общества, 2009). Контрольную группу (53 человека) составили сопоставимые по полу и возрасту пациенты с нормальным индексом массы тела и окружностью талии. У исследуемых пациентов в сыворотке крови натощак определяли концентрацию общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности (ХсЛПВП), триглицеридов, холестерина липопротеидов низкой плотности (ХсЛПНП), глюкозы, гликозилированного гемоглобина, инсулина, адипонектина, лептина. Методом проточной цитометрии были выделены и проанализированы следующие субпопуляции лимфоцитов: Т-лимфоциты ($CD3^+CD45^+$), Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$), Т-цитотоксические ($CD3^+CD8^+$), TNK-лимфоциты ($CD3^+CD56^+$), NK-лимфоциты ($CD3^-CD56^+$), В-лимфоциты ($CD3^-CD19^+$). Анализировали активированный пул клеток с фенотипами $CD3^+CD25^+$ и $CD3^+HLADR^+$. Пациенты были распределены в 4 группы, сопоставимые по полу и возрасту: 1 группа – контрольная (n=53); 2 группа – пациенты с АО и нормальной массой тела (n=12); 3 группа – пациенты с АО и избытком массы тела (n=43); 4 группа – пациенты с АО и ожирением (n=30). Статистическую обработку результатов выполняли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7,0 (StatSoftInc., 2006, США). Для определения различия сравниваемых независимых выбо-

рок использовали непараметрические критерии Колмогорова-Смирнова, Вилкоксона, Манна-Уитни. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me ($Q_{25\%}$-$Q_{75\%}$). Проводился линейный корреляционный анализ (критерий Спирмена). Статистически достоверными считали значения $p<0,05$.

Результаты. У пациентов группы 2 установлено повышение концентрации общего холестерина (4,9 (4,6-5,6) ммоль/л), ХсЛПНП (2,5 (1,9-3,4) ммоль/л) и лептина (19,4 (14,5-31,8) нг/мл) по сравнению с пациентами контрольной группы. Значимых изменений показателей клеточного звена иммунитета нами не было обнаружено. Однако в данной группе пациентов установлена отрицательная сильная корреляционная связь между числом NK-клеток и концентрацией холестерина (r= –0,731), ХсЛПНП (r= –0,7) и адипонектина (r= –0,857), между числом Т-хелперов и концентрацией гликозилированного гемоглобина (r= –0,807), положительная сильная корреляционная связь между количеством лимфоцитов с фенотипом $CD3^+HLADR^+$ и содержанием инсулина (r=0,883), а также индексом инсулинорезистентности HOMA (r=0,955). Таким образом, дислипидемия, изменение углеводного обмена и профиля адипокинов при АО ассоциированы с признаками подавления клеточного звена иммунитета.

У пациентов группы 3 установлена дислипидемия (повышение уровня общего холестерина (5,1(4,4-5,9) ммоль/л), ХсЛПНП (2,9 (2,2-3,8) ммоль/л), триглицеридов (1,0 (0,8-1,7) ммоль/л), снижение ХсЛПВП (1,3 (1,0-1,9) ммоль/л)), гипергликемия (5,2 (4,9-5,6) ммоль/л, повышение концентрации гликозилированного гемоглобина (4,8 (4,4-5,0)%) по сравнению с контрольной группой. Кроме того, обнаружено изменение содержания адипокинов – повышение уровня лептина (17,8 (6,5-39,7) нг/мл; контроль 9,6 (4,2-15,5) нг/мл) и снижение адипонектина (7,3 (4,8-10,0) мкг/мл; контроль 8,9 (7,4-14,3) мкг/мл), а также рост соотношения лептин/адипонектин (1,9 (0,9-3,9); контроль 1,0 (0,4-1,9)). У этих же пациентов установлено повышение абсолютного содержания лимфоцитов с фенотипом $CD3^+HLADR^+$ (30 (15-56) $\times 10^9$/л; контроль 19 (9-34)$\times 10^9$/л), число этих клеток коррелировало с концентрацией инсулина (r=0,575) и HOMA (r=0,525), уровнем общего холестерина (r=0,39), ХсЛПНП (r=0,333), соотношением лептин/адипонектин (r=0,402). Несмотря на отсутствие достоверных отличий в содержании TNK-клеток, В-лимфоцитов и $CD3^+CD25^+$-лимфоцитов у пациентов этой группы по сравнению с контролем, нами была установлена взаимосвязь между уровнем инсулина (r=0,339) и адипонектина (r= –0,442) с количеством В-лимфоцитов; между числом TNK-клеток и концентрацией глюкозы (r=0,312); между соотношением лептин/адипонектин и числом клеток с фенотипом $CD3^+CD25^+$ (r=0,326). Полученный результат указывает на существование взаимосвязи между лабораторными показателями, отражающими инсулинорезистентность и лептинорезистентность и активацией клеточного звена иммунитета у пациентов с АО и избытком массы тела.

В 4 группе пациентов помимо изменений углеводного, липидного обмена и дисбаланса адипокинов установлены более глубокие изменения клеточного звена иммунитета – повышение абсолютного содержания лейкоцитов (7,3 (6,0-9,1)$\times 10^9$/л), моноцитов (0,5 (0,4-0,6)$\times 10^9$/л), Т-хелперов (1244 (1021-1497) кл/мкл), $CD3^+HLADR^+$- лимфоцитов (38 (20-51) кл/мкл) и В-лимфоцитов (243 (177-341) кл/мкл) по сравнению с пациентами контрольной группы. У пациентов этой группы определена обратная корреляционная связь между концентрацией общего холестерина и числом NK-клеток (r= –0,325), прямая корреляционная зависимость между уровнем общего холестерина (r=0,397), ХсЛПНП (r=0,448) и числом $CD3^+HLADR^+$-лимфоцитов. Количество клеток $CD3^+HLADR^+$ отрицательно коррелировало с уровнем ХсЛПВП (r= –0,4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bouret S., Levin B. E., Ozanne S. E. Gene-environment interactions controlling energy and glucose homeostasis and the developmental origins of obesity / S. Bouret, B. E. Levin, S. E. Ozanne // Physiol. Rev.– 2015.– V. 95.– № 1.– P. 47-82.
2. Содержание цитокинов в периферической крови пациентов с метаболическим синдромом / В. А. Сумеркина, Л. Ф. Телешева, Е. А. Мезенцева и др. // Рос. иммунол. журнал.– 2015.– Т. 9.– № 2.– С. 817-819.
3. Метаболический синдром как проявление взаимосвязи нервной, эндокринной и иммунной систем / И. А. Трошина, Т. А. Гагина, И. М. Петров и др. // Вестн. НГУ. Сер. Биология, клин. мед.– 2006.– Т. 4.– Вып. 3.– С. 92-101.

THE RELATIONSHIP OF CELL IMMUNITY WITH PARAMETERS OF CARBOHYDRATE AND LIPID METABOLISM IN PATIENTS WITH ABDOMINAL OBESITY AND OVERWEIGHT

Sumerkina V. A., Telesheva L. F., Markova V. A.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

The study evaluated the state of cell immunity in young patients with abdominal obesity (AO) and overweight. In patients with AO and normal weight there were determined dyslipidemia and increased leptin level. No significant changes were observed in lymphocyte subpopulation composition. The combination of AO with overweight was accompanied by dyslipidemia, hyperglycemia, an imbalance of adipokines and increased number of $CD3^+HLADR^+$-lymphocytes. In patients with AO and 1-3 degree of obesity in addition to the changes in carbohydrate, lipid metabolism and imbalances of adipokines were found increased absolute number of leukocytes, monocytes, T-helper cells, $CD3^+HLADR^+$- lymphocytes and B-lymphocytes.

Keywords: abdominal obesity, overweight, lymphocyte subpopulation.

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА И ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ

Левашова О. А., Алешина Н. И., Золкорняев И. Г., Баранова Н. И.

ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Минздрава России, Пенза, Россия

Проведена сравнительная оценка С-реактивного белка (СРБ), уровня фактора некроза опухоли, интерлейкинов 6 и 10 у больных ишемическим инсультом различной степени тяжести в остром периоде в динамике на 1, 3 и 7 сутки. Концентрация СРБ у больных ишемическим инсультом была повышена на всех этапах наблюдения. Уровни изучаемых цитокинов показали разнонаправленные изменения в зависимости от тяжести церебральной ишемии. Полученные данные свидетельствуют о значительной роли воспаления в патогенезе острой недостаточности мозгового кровообращения.

Ключевые слова: ишемический инсульт, С-реактивный белок, цитокины.

Острая церебральная ишемия включает большое количество факторов, таких как гипоксия, реперфузионные повреждения, оксидантный стресс, а также воспалительную реакцию. Эти процессы имеют динамический характер, сопровождаются вовлечением различных механизмов на разных стадиях ишемического каскада. Известно, что важнейшими факторами воспаления являются цитокины. Цитокиновый дисбаланс и локальная воспалительная реакция в ответ на повреждающее действие ишемии приводят к повреждению ткани мозга, гематоэнцефалического барьера, нарушениям микроциркуляции и могут служить новыми терапевтическими мишенями [1]. Поэтому представляет интерес динамическое изучение факторов, характеризующих развитие воспалительной реакции с участием цитокинов при острой церебральной ишемии.

Целью настоящего исследования явилось изучение уровня С-реактивного белка (СРБ), фактора некроза опухоли альфа (ФНОα) и интерлейкина 6 (ИЛ-6) у больных ишемическим инсультом различной степени тяжести.

Материалы и методы. Обследовано 33 пациента с ишемическим инсультом в каротидном бассейне в возрасте 65±6,7 лет, поступившие в стационар в первые 24 часа от начала

развития заболевания. Тяжесть неврологического дефицита оценивалась по шкале Национального института здоровья (NIHSS). Ишемический характер инсульта подтверждался методами нейровизуализации – компьютерной или магнитно-резонансной томографией. В зависимости от тяжести ишемического инсульты пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили пациенты с инсультом легкой и средней степени тяжести (от 4 до 14 баллов по шкале NIHSS) (n=21), во вторую группу вошли 12 человек с тяжесть от 15 до 22 баллов по соответствующей шкале. Группу сравнения составили 15 человек сопоставимого возраста.

Концентрацию СРБ определяли иммунотурбидиметрическим методом реактивами «Диасис» (Германия), уровень цитокинов измеряли с помощью тест-систем для иммуноферментного анализа («Вектор Бест», Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических методов при помощи программы STATISTICA 6,0. Полученные данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me [25 %; 75 %]). Сравнение количественных признаков проводили по критерию Манна-Уитни. Корреляции изучаемых показателей оценивали по критерию Спирмена. Критической величиной уровня значимости (p) считали значение 0,05.

Результаты и обсуждение. Определение СРБ у больных ишемическим инсультом выявило повышение данного показателя во все сроки наблюдения у всех обследованных пациентов. Значения уровня белка у пациентов 1 группы составило 9 [0,5; 22] мг/л в первые сутки, 16 [2; 34] мг/л на 3-и сутки и 21 [10; 46] на 7-е сутки наблюдения. Наиболее высокие концентрации СРБ выявлены у больных с тяжелым инсультом (2 группа): 35 [5; 78] мг/л, 136 [27; 199] мг/л и 152 [90; 242,5] мг/л на 1-е, 3-и и 7 сутки наблюдения соответственно, что статистически значимо отличалось от группы контроля и значений 1 группы. Уровень СРБ во второй группе повышался к 3 суткам развития инсульта и сохранялся повышенным до 7 суток, в то время как в первой группе повышение уровня СРБ не было таким значительным. Известно, что воспаление играет важную роль в патогенезе инсульта [2]. Оно активно вовлечено в процесс развития атеросклероза сосудов, лежащего в основе патогенеза подавляющего большинства случаев ишемического инсульта. Кроме того, активизация воспалительных процессов во время острой гипоксии мозговой ткани способствует расширению площади некроза.

Концентрация ФНОα у пациентов 1 группы составила 2,5 [0; 4,5] пг/мл, 3,9 [1,3; 46,8] пг/мл и 3,4 [1,7; 4,1] пг/мл на 1-е, 3-и и 7-е сутки наблюдения. У пациентов 2 группы концентрация изучаемого цитокина составили 0 [0; 1,95] пг/мл, 1,3 [0; 6,8] пг/мл и 1,9 [0,1; 8,5] пг/мл в аналогичные временные интервалы, значения показателей контрольной группы – 0,5 [0,4; 1,35] пг/мл. При сравнении полученных данных статистически значимые различия выявлены у больных ишемическим инсультом легкой и средней степени тяжести и группой контроля на 3-и и 7-е сутки наблюдения. В настоящее время роль ФНОα при острой церебральной ишемии представляется неоднозначной [3], поскольку данный цитокин может оказывать как нейропротекторное, так и нейротоксическое действие. Вероятно, что преобладание защитной или повреждающей роли цитокина во многом зависят от размеров очага, временного интервала и, возможно, функционального полиморфизма гена, кодирующего ФНОα.

Значения интерлейкина-6 у пациентов с инсультом легкой и средней степени тяжести составили 8,4 [3,8; 13,6] пг/мл, 12,3 [9,2; 53,8] пг/мл и 11,2 [6,25; 28,75] пг/мл на 1-е, 3-и и 7-е сутки соответственно. У больных с тяжелым инсультом уровни изучаемого цитокина были 9,6 [4,7; 44,8] пг/мл, 35,0 [25,7; 67,9] пг/мл и 28,7 [4,6; 157,0] пг/мл в соответствующие дни наблюдения. При сравнении содержания ИЛ-6 у больных ишемическим инсультом различной степени тяжести нами не обнаружены статистически значимые различия между изучаемыми группами. Однако уровень ИЛ-6 при поступлении был выше в возрастной группе старше 65 лет – 10,8 [8;12,7] пг/мл, тогда как у более молодых пациентов (≤ 65 лет) – 6,15[4,35;7,1] пг/мл (p = 0,005).

При проведении корреляционного анализа выявлена положительная зависимость уровня СРБ и тяжести ишемического инсульта в 1-е (r=0,37, p=0,0177), 3-и (r=0,56, p=0,004) и 7-е сутки наблюдения (r=0,53, p=0,012). Концентрация СРБ в первые сутки имела положительную корреляцию с ИЛ 6 в 1 (r=0,62, p=0,005) и 3 сутки исследования (r=0,68, p=0,004).

Таким образом, изучение молекулярных механизмов экспрессии и патофизиологической

роли провоспалительных цитокинов в формировании метаболических нарушений при острой церебральной ишемии в будущем позволит разработать новую терапевтическую стратегию по предотвращению отсроченной гибели клеток мозга и улучшению исхода заболевания у пациентов с инсультом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dziedzic T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke / T. Dziedzic // Expert Review of Neurotherapeutics.– 2015.– V. 15(5).– P. 523-531.
2. C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis / R.L. VanGilder, D.M. Davidov, K.R. Stinehart et al. // J. Clin. Neurosci.– 2014.– V.21 (4).– P. 547-553.
3. Гончар И.А., Степанова Ю.И., Прудывус И.С. Роль фактора некроза опухоли-альфа и других провоспалительных цитокинов в формировании и развитии инфаркта головного мозга / И.А. Гончар, Ю.И. Степанова И.С. Прудывус // Лабораторная диагностика. Восточная Европа.– 2013.– Т. 1.– С. 84-94.

THE ASSESSIMENT OF THE DYNAMICS OF C-REACTIVE PROTEIN AND CYTOKINES IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STOKE IN THE ACUTE PHASE

Levashova O.A., Aleshina N.I., Zolkornjaev I.G., Baranova N.I.

Penza's Institute of Post Studies, Penza, Russia

We did a comparative evaluation of C-reactive protein (CRP), the level of tumor necrosis factor (TNF), interleukin 6 and 10 in patients with ischemic stroke of various severities in the acute period on the 1st, 3rd and 7th days. The concentration of CRP in patients with ischemic stroke increased in all stages of monitoring. The levels of studied cytokines showed the opposite changes depending on the severity of cerebral ischemia. The data obtained indicate a significant role of inflammation in the pathogenesis of acute cerebrovascular insufficiency.

Keywords: ischemic stroke, C-reactive protein, cytokines.

РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА В ТКАНИ БЫСТРОРАСТУЩЕЙ ЛЕЙОМИОМЫ МАТКИ БОЛЬШИХ РАЗМЕРОВ

Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Воронин Д.Н., Кирсанов А.Н.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

Целью работы было оценить характер экспрессии мРНК факторов с про- и антиапоптотическим действием в лейомиоме матки больших размеров. Выявлено, что миоматозных узлах была достоверно повышена по сравнению с миометрием экспрессия мРНК XIAP, PPARγ и PTEN. При этом в ткани пролиферирующих Ki-67^{+} лейомиом отмечался более высокий уровень экспрессии мРНК XIAP, TGFβ1, TGFβ2 и сниженные показатели синтеза PPARγ и PTEN по сравнению с Ki67-негативными миоматозными узлами.

Ключевые слова: лейомиома матки, апоптоз, регуляция, TGFβ.

Лейомиома матки является доброкачественной гормонально-зависимой опухолью миометрия предположительно моноклонального происхождения, состоящей из гладкомышечных клеток и большого количества внеклеточного матрикса [1]. Лейомиома мат-

ки в настоящее время относится к наиболее распространенным гинекологическим заболеваниям, поскольку встречается у 20-50 % всех женщин репродуктивного возраста [1]. Несмотря на то, что эта опухоль очень редко подвергается злокачественному перерождению (менее 1 % всех случаев), основные клинические проявления лейомиомы, такие как обильные менструальные кровотечения, сопровождающиеся выраженным болевым синдромом и нарушениями репродуктивной функции, существенно снижают качество жизни пациенток с лейомиомой [2]. Размер миомы матки может варьировать от нескольких миллиметров до 20 см и более, причем в ряде случаев увеличение опухоли происходит очень быстро, более, чем на 2-5 см за год. Механизмы, ведущие к быстрому увеличению размеров миомы матки, до конца не установлены. Предполагается, что ее рост сопровождается изменениями в продукции и рецепции половых стероидных гормонов, провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста непосредственно в ткани опухоли [1]. Остаются менее изученными особенности регуляции апоптоза в миоматозных узлах. Нет единого мнения о том, какие механизмы определяют высокую или низкую пролиферативную активность клеток миомы.

Целью нашей работы было оценить характер экспрессии мРНК факторов с про- и антиапоптотическим действием в лейомиоме матки больших размеров в зависимости от интенсивности пролиферативных процессов в ткани опухоли для уточнения механизмов ее доброкачественного роста.

Материалом для исследования служили полученные в ходе хирургического лечения 18 пациенток с лейомиомой матки биоптаты миоматозных узлов и ткани неизмененного миометрия. Размер опухоли варьировал от 6 до 12 см. Из образцов ткани выделяли тотальную РНК феноловым методом, которую переводили в кДНК. В полученных образцах определяли уровень экспрессии мРНК Х-связанного ингибитора апоптоза (XIAP), рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором (PPARγ), фосфатазы и гомолога тензина (PTEN), маркера пролиферации Ki-67, а также TGFβ1 и TGFβ2 методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Было установлено, что в ткани лейомиомы отмечалось достоверное повышение по сравнению с миометрием уровня экспрессии мРНК XIAP, PPARγ и PTEN.

Полученные **результаты** свидетельствуют о том, для ткани лейомиомы матки характерно одновременное усиление синтеза факторов, обладающих как про-, так и анти-апоптотическим действием. Известно, что XIAP ингибирует апоптоза в результате связывания и инактивации каспаз -9, -3, -7 и инактивировать их активность, что подавляет развитие Fas-индуцированного апоптоза [3]. Установлено, что изменения в продукции XIAP связаны с развитием различных видов патологии, в том числе с опухолевым ростом. В опухолевых клетках экспрессия XIAP резко повышается, причем высокий уровень синтеза этого фактора часто ассоциируется с неблагоприятным прогнозом заболевания [3]. Таким образом, высокий уровень синтеза в ткани миомы XIAP может играть важную роль в обеспечении роста опухоли. Однако наряду с высоким уровнем экспрессии ингибитора апоптоза в миоматозных узлах по нашим данным значительно повышен синтез факторов с проапоптотическим действием – PPAR gamma и PTEN. Известно, что ядерный рецептор PPARγ выполняет многочисленные функции в организме, такие как усиление чувствительности к инсулину, регуляция обмена жиров, модуляция воспалительных реакций и процессов клеточной пролиферации [4]. Было показано, что лиганды PPAR gamma ингибируют рост клеток карциномы, индуцируя арест клеточного цикла и запуск в них апоптоза [4]. Другой изученный нами проапоптотический фактор PTEN является эволюционно консервативной фосфатазой двойной специфичности, которая удаляет фосфаты с белковых и липидных субстратов и ингибирует киназный сигнальный каскад по PI3K/Akt пути, подавляя активность клеточной пролиферации и индуцируя апоптоз [5]. Можно предположить, что повышение экспрессии PPARγ и PTEN компенсирует высокий уровень активности ингибитора апоптоза XIAP в миоматозных узлах, определяя доброкачественный характер роста лейомиомы матки. Особую роль в механизмах, регулирующих развитие и роста лейомиомы матки, отводят TGFβ. Известно, что TGFβ может оказывать как ингибирующее, так и стимулирующее действие на прогрессию клеточного цикла, пролиферацию и гипертрофию в различных тканях [1]. Поскольку TGFβ является

важнейшим симулятором выработки различных компонентов ЭЦМ, эти свойства TGFβ определяют важную роль данного фактора роста в механизмах развития и роста миомы матки. Мы оценили экспрессию двух изоформ TGFβ – TGFβ1 и TGFβ2 и выявили выраженную тенденцию к усилению экспрессии мРНК как TGFβ1, так и TGFβ2. На следующем этапе нашего исследования мы провели дифференцированный анализ синтеза в миоматозных узлах факторов, регулирующих апоптоза, в зависимости от интенсивности пролиферативных процессов в ткани опухоли. Было установлено, что в ткани пролиферирующих Ki-67$^+$ лейомиом, отмечается более высокий уровень экспрессии мРНК XIAP, TGFβ1, TGFβ2 и сниженные показатели синтеза PPARγ и PTEN по сравнению с Ki67-негативными миоматозными узлами.

Таким образом, баланс соотношения экспрессии факторов с анти- и проапоптотическим действием и TGFβ в ткани лейомиомы матки играет важную роль в обеспечении доброкачественного типа роста опухоли. В тех случаях, когда в ткани миоматозных узлов доминирует активность проапоптотических факторов и снижен синтез TGFβ, отмечается более низкая пролиферативная активность опухолевых клеток и меньшие размеры самой опухоли.

(Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-05042-а)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chegini N. Proinflammatory and profibrotic mediators: principal effectors of leiomyoma development as a fibrotic disorder / N. Chegini // Semin Reprod Med.– 2010.– V. 28, № 3.– P. 180-203.
2. Иммунные механизмы быстрого роста миомы матки / А.И. Малышкина, Н.Ю. Сотникова, Ю.С. Анциферова и др. // Иваново: ОАО «Издательство Иваново».– 2010.– 272 с.
3. Obexer P., Ausserlechner M.J. X-linked inhibitor of apoptosis protein – a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy / P. Obexer, M.J. Ausserlechner // Front Oncol.– 2014.– V. 4.– P. 197.
4. Growth inhibition and apoptosis induced in human leiomyoma cells by treatment with the PPAR gamma ligand ciglitizone / D.H. Nam., S. Ramachandran, D.K. Song et al. // Mol Hum Reprod.– 2007.– V.13.–№ 11.– P. 829-836.
5. Zhang, S., Yu, D. PI(3) king apart PTEN's role in cancer / S. Zhang, D. Yu // Clin Cancer Res.– 2010.– V.16.– № 17.– P. 4325-4330.

APOPTOSIS REGULATION IN THE GROWING LARGE LEIOMYOMA TISSUE

Sotnikova N. Yu., Antsiferova Yu.A., Voronin D.N., Kirsanov A.N.

Federal State Budget Establishment Ivanovo's Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V.N. Gorodkov of Ministry of Health Care of Russian Federation, Ivanovo, Russia

The aim if the work was to estimate the character of mRNA expression of factors with the pro- and anti-apoptotic action in large leiomyoma tissue. It was established that in leiomyomas the XIAP, PPARγ and PTEN mRNAs expression were significantly increase in comparison to the myometrium tissue. Tissues of the proliferating Ki-67$^+$ leiomymas are characterized by the more higher expression of XIAP, TGFβ1, TGFβ2 mRNAs and decreased synthesis of PPARγ and PTEN comparing to the Ki67-negative leiomyomas nodules.

Keywords: uterine leiomyoma, apoptosis, regulation, TGFβ.

М1 И М2 МАКРОФАГИ В ЭНДОМЕТРИИ ПАЦИЕНТОК С БЫСТРОРАСТУЩЕЙ ЛЕЙОМИОМОЙ МАТКИ

Воронин Д. Н., Малышкина А. И., Кирсанов Д. Н., Нагорный С. Н.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия.

В эндометрии пациенток с пролиферирующей миомой матки повышен уровень $CD14^+$ $CD16^+$ макрофагов, продуцирующих как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины. В эндометрии, расположенном в непосредственной близости от пролиферирующей лейомиомы, увеличено содержание $CD14^+CD16^{++}$ «неклассических» макрофагов с высоким уровнем продукции цитокинов, характерных для М2 типа.

Ключевые слова: лейомиома матки, эндометрий, М1 и М2 макрофаги, $CD16^+$ макрофаги.

Исследования последних лет свидетельствуют о важной роли клеток врожденного иммунитета, а именно, тканевых макрофагов, в регуляции противоопухолевого иммунного ответа. Показано, что опухолевая трансформация ткани сопровождается усиленной инфильтрацией так называемыми ТАМ – макрофагами, ассоциированными с опухолью, которые имеют преимущественно фенотип М2 клеток с высоким уровнем продукции TGFβ и IL-10, что ведет к угнетению активности цитотоксических иммунных реакций и способствует усилению клеточной пролиферации и опухолевой прогрессии [1]. Лейомиома матки является доброкачественной опухолью миометрия, развитие и рост которой связаны с действием половых стероидных гормонов и различных факторов роста [2]. Показано, что в ткани миоматозных узлов, а также в эндометрии, расположенном в непосредственной близости от опухоли, усилена инфильтрация макрофагами [3]. Эти данные позволяют предположить, что пул эндометриальных макрофагов может непосредственно участвовать в регуляции роста лейомиомы.

В связи с этим, **целью** нашего исследования было установить особенности экспрессии мембранных рецепторов и продукции про- и противовоспалительных цитокинов эндометриальными макрофагами различной локализации у пациенток с быстрорастущей лейомиомой матки больших размеров для уточнения роли М1 и М2 макрофагов в патогенезе быстрого роста данной опухоли.

Нами было проведено обследование 32 пациенток с лейомиомой матки больших размеров (диаметр узлов 6-12 см). Материалом для исследования служили биоптаты миоматозных узлов, а также эндометриальной ткани, забранной в проекции миоматозного узла и с противоположной стенки матки. Эндометрий 12 здоровых фертильных женщин использовали в качестве контроля. Мембранную экспрессию CD68, CD14, CD16, HLA-DR, CD11b молекул и внутриклеточную продукцию IL-10, IL-12, IFNγ и TGFβ1 макрофагами определяли методом проточной цитометрии. В ткани миоматозных узлов оценивали наличие экспрессии мРНК маркера пролиферации Ki-67 методом RT-PCR. При анализе данных мы не выявили отличий в содержании макрофагов, продуцирующих IL-10, IL-12, IL-1β, и TGFβ1, в эндометрии различной локализации. Только в эндометрии, расположенном вдали от лейомиомы, отмечалось повышение внутриклеточной продукции макрофагами IFNγ. Кроме того, вне зависимости от места локализации, эндометриальные макрофаги пациенток с лейомиомой матки характеризовались сниженным уровнем мембранной экспрессии CD11b молекул по сравнению с контролем. Исследования, проведенные нами ранее, показали, что при миоме матки в эндометрии, расположенном под опухолью, значительно повышается содер-

жание макрофагов с фенотипом так называемого «промежуточного типа» $CD14^+CD16^+$ [4]. Как известно, в последние годы была принята новая классификация моноцитов/макрофагов, основанная на оценке уровня экспрессии CD16 молекул [5]. Согласно этой классификации, выделяют пул «классических» CD16-негативных фагоцитов, «промежуточный тип» $CD14^+CD16^+$ клеток и «неклассические» $CD14^+CD16^{++}$ фагоциты. Показано, что клетки с «классическим» фенотипом, в основном, участвуют в фагоцитозе, «промежуточные» фагоциты играют важную роль в развитии воспалительных реакций, а «неклассические» – выполняют преимущественно регуляторные функции [5]. Для уточнения особенностей функционирования эндометриальных макрофагов при лейомиоме матки, мы провели дифференцированный анализ содержания в эндометрии клеток с различной экспрессией CD16 молекул в зависимости от интенсивности пролиферативных процессов в самой опухоли. Было установлено, что у пациенток с пролиферирующими $Ki\text{-}67^+$ лейомиомами в эндометрии, расположенном под миоматозным узлом, значительно повышается количество «неклассических» $CD14^+CD16^{++}$ макрофагов, а в ткани эндометрия, локализованного вдали от опухоли, увеличивается уровень «промежуточных» $CD14^+CD16^+$ макрофагов. Поскольку мы не выявили значимых изменений в содержании эндометриальных M1 и M2 макрофагов при анализе продукции цитокинов в общем макрофагальном гейте, мы провели дифференцированный анализ $HLA\text{-}DR^+$, $CD11b^+$, $IL\text{-}10^+$, $IL\text{-}12^+$ и $TGF\beta1^+$ клеток в пулах эндометриальных макрофагов с различным уровнем экспрессии CD16 молекул. Анализ данных показал, что «классические» эндометриальные макрофаги, имеющие фенотип $CD14^{++}CD16^-$, характеризовали минимальным уровнем экспрессии HLA-DR молекул и внутриклеточной продукции IL-10 и TGFβ1, тогда как продукция IL-12 в этом пуле макрофагов была максимальной. Для макрофагов с «промежуточным» фенотипом $CD14^+CD16^+$ была характерна высокая экспрессия HLA-DR и CD11b молекул, более высокая по сравнению с «классическими» макрофагами продукция IL-10 и TGFβ1 и достаточно высокая внутриклеточная продукция IL-12, сравнимая с таковой у «классических» макрофагов. Отличительной характеристикой популяции «неклассических» $CD14^+CD16^{++}$ макрофагов являлась максимально высокая внутриклеточная продукция IL-10 и TGFβ1 и минимальная продукция IL-12.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить об аккумуляции в эндометрии пациенток с пролиферирующей миомой матки макрофагов «промежуточного» типа, которые продуцируют как провоспалительные (IFNγ, IL-12), так и противовоспалительные (IL-10 и TGFβ1) цитокины, а также характеризуются высокой экспрессией HLA-DR молекул. Для эндометрия, расположенного в непосредственной близости от пролиферирующей лейомиомы, характерна усиленная инфильтрация ткани «неклассическими» макрофагами с высоким уровнем продукции цитокинов, характерных для M2 типа.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-05042-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy / A. Sica, T. Schioppa, A. Mantovani et al. // Eur J Cancer.– 2006.– V. 42(6).– P. 717-727.
2. Chegini N. Proinflammatory and profibrotic mediators: principal effectors of leiomyoma development as a fibrotic disorder / N. Chegini // Semin Reprod Med.– 2010.– V.28, № 3.– P. 180-203.
3. Kitaya K., Yasuo T. Leukocyte density and composition in human cycling endometrium with uterine fibroids / K. Kitaya, T. Yasuo // Hum. Immunol.– 2010.– V. 71, № 2.– P. 158-163.
4. Зависимость фенотипа эндометриальных макрофагов от их локализации у пациенток с лейомиомой / А.Н. Кирсанов, А.И. Малышкина, Д.Н. Воронин и др. // Российский Иммунологический Журнал.– 2015.– Т. 9(18), № 2 (1).– С. 395-397.
5. The $CD14^+CD16^+$ Inflammatory Monocyte Subset Displays Increased Mitochondrial Activity and Effector Function During Acute Plasmodium vivax Malaria / L.R. Antonelli, F.M. Leoratti, P.A. Costa et al. // PLoS Pathog.– 2014.– V.9.– e1004393.

M1 AMD M2 MACROPHAGES IN THE ENDOMETRIUM OF PATIENTS WITH GROWING UTERINE LEIOMYOMA

Voronin V. N., Malyshkina A. I., Kirsanov A. N., Nagorny S. N.

Federal State Budget Establishment Ivanovo's Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V. N. Gorodkov of Ministry of Health Care of Russian Federation, Ivanovo, Russia

In the endometrium of patients with proliferating uterine leiomyoma the level of $CD14^+CD16^+$ macrophages, producing both pro and anti-inflammatory cytokines, was increased. In the endometrium with neighboring leiomyoma nodule the high amount of non-classical $CD14^+CD16^{++}$ macrophages producing cytokines of M2 type was seen.

Keywords: uterine leiomyoma, endometrium, M1 amd M2 macrophages, $CD16^+$ macrophages.

ВЗАИМОСВЯЗЬ СИСТЕМНОЙ И ЛОКАЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ sTNF-R2 С АКТИВНОСТЬЮ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ Th2 ТИПА У ПАЦИЕНТОК С ЭНДОМЕТРИОЗОМ

Анциферова Ю. С., Малышкина А. И., Красильникова А. К.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

У пациенток с эндометриозом выявлено повышенное содержание sTNF-R2 в сыворотке крови и перитонеальной жидкости, увеличение сывороточного уровня IL-4, IL-6, а также количества периферических Th2 лимфоцитов. Была установлена взаимосвязь между высокими показателями содержания sTNF-R2 в сыворотке крови и перитонеальной жидкости женщин с эндометриозом и повышенным сывороточным и перитонеальным уровнем IL-4 и высоким содержанием $CD4^+IL\text{-}5^+$ и $IL\text{-}6^+$ перитонеальных лимфоцитов.

Ключевые слова: эндометриоз, sTNF-R2, цитокины Th2 типа, периферическая кровь, перитонеальная жидкость.

Эндометриоз является одним из наиболее распространенных гинекологических заболеваний, ведущих к развитию болевого синдрома и бесплодия. В основе патогенетических механизмов эндометриоза, определяющих возможность эктопического развития и роста эндометриальной ткани на поверхности органов и тканей брюшной полости, лежат, по мнению многих исследователей, аутоиммунные нарушения, поскольку у пациенток с эндометриозом есть признаки локального хронического воспаления, усилена продукция цитокинов Th2 типа и ряда аутоантител, таких как анти-фосфолипидные анти-гистоновые, анти-эндометриальные и др. [1]. Кроме того, при эндометриозе, как и при других аутоиммунных заболеваниях, снижен апоптоз, нарушены реакции клеточно-опосредованного иммунитета, а также усилена продукция ряда провоспалительных цитокинов, в том числе TNFα [1, 2]. По данным литературы, TNFα усиливает адгезионные свойства эндометриальных клеток и их пролиферативную активность, что может иметь большое значение на ранних этапах формирования и развития очагов эндометриоза [3]. Важную роль в реализации биологического действия TNFα играют его специфические рецепторы – TNF-R1 и TNF-R2, экспрессия которых при многих аутоиммунных заболеваниях резко усилива-

ется [3]. Однако особенности функционирования рецепторов TNFα при эндометриозе изучены пока еще недостаточно. Отсутствуют данные о возможной взаимосвязи между содержанием растворимых форм рецепторов TNFα и активностью гуморальных иммунных реакций у пациенток с эндометриозом.

В связи с этим, **целью** нашего исследования было оценить особенности системной и локальной продукции sTNF-R2, а также определить его возможное участие в регуляции гуморальных иммунных реакций при эндометриозе различной степени тяжести для уточнения иммунных механизмов патогенеза данного заболевания.

Было обследовано 246 пациенток с эндометриозом (из них 195 женщин с эндометриозом 1-2 стадии и 51 женщина с эндометриозом 3-4 стадии). Показатели 30 здоровых фертильных женщин использовали в качестве контрольных. Материалом для исследования служила периферическая кровь и перитонеальная жидкость. Оценивали относительное содержание $IL\text{-}4^+$, $IL\text{-}5^+$, $IL\text{-}6^+$ клеток в популяции $CD4^+$ лимфоцитов крови/перитонеальной жидкости с помощью моноклональных антител методом проточной цитометрии на цитометре FACSCanto II (BD, USA). Кроме того, определяли концентрацию IL-4, IL-6, sTNF-R2 в сыворотке крови и в перитонеальной жидкости методом ИФА. Анализ данных показал, что при эндометриозе как на системном уровне, так и на локальном уровне достоверно повышалось содержание растворимой формы специфического рецептора TNFα – sTNF-R2. При этом концентрация sTNF-R2 в сыворотке крови и в перитонеальной жидкости коррелировала со степенью тяжести эндометриоза и была максимальной у пациенток с эндометриозом 3-4 стадии. Таким образом, накопление растворимой формы рецептора TNFα в сыворотке крови и в перитонеальной жидкости при эндометриозе усиливается по мере прогрессирования заболевания. Известно, что TNF-R1 широко экспрессируется практически всеми типами клеток, а TNF-R2 представлен в основном на клетках иммунной системы, преимущественно на Т-лимфоцитах [3]. Взаимодействие TNFα с TNF-R2 активирует NF-κB-сигналинг в клетке и стимулирует транскрипцию антиапоптотических протеинов, включая c-FLIP, c-IAPs и митоген-активированные фосфатазы [4]. Можно предположить, что высокая экспрессия TNF-R2, ассоциированная с повышенной продукцией самого TNFα, приводит к накоплению у пациенток с эндометриозом активированных лимфоцитов, следствием чего является усиленная системная и локальная продукция цитокинов, развитие хронического воспаления и аутоиммунные нарушения. Для уточнения механизмов, лежащих в основе аутоиммунных нарушений при эндометриозе, мы проанализировали особенности продукции Th2-типа цитокинов при данном заболевании. Было установлено, что у пациенток с эндометриозом повышался сывороточный уровень IL-4, IL-6, а также увеличивалось содержание периферических Th2 лимфоцитов с фенотипом $CD4^+IL\text{-}4^+$, $CD4^+IL\text{-}5^+$, $CD4^+IL\text{-}6^+$ и перитонеальных $IL\text{-}6^+$ лимфоцитов по сравнению с показателями женщин контрольной группы. Дифференцированный анализ особенностей продукции цитокинов Th2-типа в зависимости от степени тяжести эндометриоза показал, что у женщин с «малыми» формами эндометриоза изменения цитокинового статуса отмечались преимущественно на системном уровне и характеризовались высоким содержанием в крови Th2 лимфоцитов и IL-6. Подгруппа женщин с эндометриозом 3-4 степени тяжести характеризовалась преимущественным усилением продукции IL-4 как на системном, так и на локальном уровне. Нами была выявлена взаимосвязь между особенностями содержания sTNF-R2 и продукцией цитокинов Th2-типа при эндометриозе. Так, высокие показатели содержания sTNF-R2 в сыворотке крови и перитонеальной жидкости женщин с эндометриозом ассоциировались с повышенным сывороточным и перитонеальным уровнем IL-4, а также с повышенным содержанием перитонеальных лимфоцитов с фенотипом $CD4^+IL\text{-}5^+$ и $IL\text{-}6^+$.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что важную роль в усилении активности Th2-типа иммунных реакций при эндометриозе играют IL-6 и IL-4, высокий уровень продукция которых может лежать в основе аутоиммунных нарушений и выработки аутоантител, отмечаемых у пациенток с эндометриозом. Изменения в продукции IL-4 и IL-6 могут определяться усиленной активацией лимфоцитов крови и перитонеальной жидкости, в том числе за счет усиления экспрессии ими sTNF-R2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eisenberg V. H., Zolti M., Soriano D. Is there an association between autoimmunity and endometriosis? / V.H Eisenberg, M. Zolti, D. Soriano //Autoimmun Rev.– 2012.– V.11, № 11.– P. 806-814.
2. Роль цитокинов перитонеальной жидкости в регуляции инвазивных свойств эндометриальных клеток при эндометриозе / Н. Ю. Сотникова, Ю. С. Анциферова, Е. С. Филиппова и др. // Мать и дитя в Кузбассе.– 2011.– № 1.– С. 304-309.
3. Haider S., Knöfler M. Human Tumour Necrosis Factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium / S. Haider, M. Knöfler // Placenta.– 2009.– V. 30, № 2.– P.111-123.
4. Tumor Necrosis Factor Receptors: Biology and Therapeutic Potential in Kidney Diseases / M. M. Speeckaert, R. Speeckaert, M. Laute et al. //Am J Nephrol.– 2012.– V.36.– P. 261-270.

THE RELATIONSHIP BETWEEN SYSTEMIC AND LOCAL sTNF-R2 PRODUCTION AND Th2 IMMUNE REACTIONS ACTIVITY IN PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS

Antsiferova Yu. S., Malyshkina A. I., Krasylnikova A. K.

Federal State Budget Establishment Ivanovo's Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V. N. Gorodkov of Ministry of Health Care of Russian Federation, Ivanovo, Russia

In patients with endometriosis the increased serum and peritoneal content of sTNF-R2, high serum level of IL-4, IL-6, and elevated amount of peripheral Th2 lymphocytes were found. The relationship between high serum and peritoneal amount of sTNF-R2 and increased serum and peritoneal level of IL-4 and high content of $CD4^+IL\text{-}5^+$ and $IL\text{-}6^+$ peritoneal lymphocytes were established.

Keywords: endometriosis, sTNF-R2, Th2 cytokines, peripheral blood, peritoneal fluid.

РОЛЬ ЛИГАНДОВ NKG2D ИММУНОРЕЦЕПТОРА В РАЗВИТИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Абакушина Е. В.[1], Неприна Г. С.[1], Козлов И. Г.[2]

[1]МРНЦ им. А. Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИРЦ», Обнинск; [2]ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева, ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

NK-клетки играют важную роль в противоопухолевом иммунном ответе. Взаимодействие лигандов с рецептором NKG2D приводит к активации NK-клеток и субпопуляций Т-лимфоцитов. Однако трансформированные клетки способны сбрасывая молекулы MICA со своей поверхности. У онкологических больных их можно обнаружить в сыворотке крови. Показано, что у больных меланомой и раком кишечника повышено содержание растворимых форма молекул MICA в сыворотке крови. У группы больных с высоким уровнем sMICA (более 4000 пг/мл) наблюдается ингибирование NKG2D на лимфоцитах. Это может служить фактором неблагоприятного прогноза.

Ключевые слова: NK-клетки, рецептор NKG2D, стресс-индуцированные молекулы MICA, меланома, рак желудка и кишечника.

Введение. Возникновение злокачественных клеток в организме и неконтролируемый рост опухоли зависят от многочисленных дефектов в иммунологическом распознавании и не эффективном уничтожении таких клеток. Хорошо известно, что ключевую роль в противоопухолевой защите играют различные типы эффекторных клеток, к которым принадлежат две субпопуляции лимфоцитов: цитотоксические Т-лимфоциты

и NK-клетки [1]. Одним из механизмов распознавания опухоль-трансформированных клеток является взаимодействие активирующего рецептора NKG2D на цитотоксических Т-лимфоцитах и NK-клетках с лигандами – стресс-индуцированными молекулами MICA (major histocompatibility complex class I chain-related protein A/B), родственными антигенам MHC класса I или белкам семейства ULBP1-6 (UL16-binding protein family member 1-6). Как и MICA/B, поверхностные белки ULBP представлены на клетках при опухолевом перерождении [2]. Данные молекулы являются ранними маркерами для противоопухолевого иммунного ответа. Наличие MICA-положительных опухолевых клеток в организме больного должно приводить к активации NKG2D-положительных цитотоксических лимфоцитов и элиминации опухоли. Однако злокачественные клетки способны сбрасывать эти молекулы со своей поверхности, что помогает им уйти от иммунного надзора. Растворимые формы молекул MICA (sMICA) могут быть обнаружены в сыворотке крови онкологических больных на ранних стадиях заболевания [3]. Изучение лиганд-рецепторного взаимодействия может привести к лучшему пониманию функционирования NK-клеток у онкологических больных.

Целью исследования было определение содержания стресс-индуцированных молекул sMICA, NK-клеток и экспрессии на них активирующего рецептора NKG2D в крови онкологических больных.

Материалы и методы. В работе использовали периферическую кровь 29 больных меланомой и 20 больных раком желудка и кишечника. Контрольную группу составили 20 здоровых добровольцев. С помощью иммуноферментного анализа в сыворотках крови пациентов оценивали содержание sMICA. Оценку поверхностной экспрессии CD16/56, NKG2D (CD314) проводили с использованием флуоресцентномеченых антител на цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США).

Основные результаты. Показано, что у большинства больных меланомой и раком кишечника уровень sMICA значительно превышает контрольные значения, что может служить одним из диагностических маркеров ($p<0,05$) [3, 4]. Среднее содержание sMICA при меланоме составило 3048 пг/мл; в группе больных раком кишечника – 3790 пг/мл. В зависимости от уровня sMICA больные были поделены на 3 группы в каждой нозологии: 1 группа с низким уровнем sMICA (<1500 пг/мл), 2 группа со средним (1500-4000 пг/мл) и 3 группа с высоким содержанием sMICA (>4000 пг/мл). У больных меланомой 1 группу составили 35 % пациентов, вторую – 42 %, а 3 группу 23 %. У больных раком кишечника большая часть пациентов составила 1 группу – 91 %, в третьей группе были оставшиеся пациенты. Больных с промежуточным уровнем sMICA не было выявлено.

Показано, что у всех больных меланомой и в первой группе больных раком кишечника несколько повышено содержание NK-клеток в периферической крови по сравнению с контрольной группой. Также обнаружено, что у большей части больных меланомой в первой и второй группе повышена экспрессия рецептора NKG2D на NK-клетках до 15 %, по сравнению с контролем (9 %). У больных 1 гр. раком кишечника экспрессия на NK-клетках составила 20 %, а на всех лимфоцитах 52 %. Данный факт указывает на активацию цитотоксических лимфоцитов. У больных раком кишечника в третьей группе, наоборот, выявлено снижение количества активированных лимфоцитов несущих CD314 до 42 %, а число NK-клеток было сравнимо с контрольной группой. Именно в этой группе больных прослеживалось наибольшее число случаев прогрессирования основного заболевания, что может быть связано с ингибированием рецептора NKG2D растворимыми формами молекул MICA, что подтверждает механизм ускользания опухоли из-под иммунного надзора.

Заключение. В работе выявлен повышенный уровень стресс-индуцированных молекул MICA у онкологических больных. Обнаружена взаимосвязь между уровнем лигандов и экспрессией рецептора NKG2D на лимфоцитах крови у онкологических больных. Показано, что с повышением уровня sMICA у больных меланомой увеличивается количество циркулирующих NK-клеток, однако у больных раком кишечника прослеживается обратная тенденция. Содержание рецептора NKG2D и число NK-клеток уменьшается с увеличением sMICA, что, вероятно, связано с различным иммунопатогенезом данных злокачественных новообразований. Также можно сделать вывод о том, что высокий уровень иммунорегуляторных молекул MICA, лигандов NKG2D, в сыворотке крови больных меланомой и ра-

ком кишечника может служить фактором неблагоприятного прогноза, что подтверждает ранее полученные данные [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакушина Е. В., Кузьмина Е. Г., Коваленко Е. И. Основные свойства и функции NK-клеток человека / Е. В. Абакушина, Е. Г. Кузьмина, Е. И. Коваленко // Иммунология.– 2012.– Т. 33, № 4.– С. 220-224.
2. Salih H.R., Goehlsdorf D., Steinle A. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients / H. R. Salih, D. Goehlsdorf, A. Steinle // Hum Immunol.– 2006.– V. 67.– P. 188-195.
3. Увеличение растворимых форм стресс-индуцированных молекул MICA при онкологических заболеваниях / Е. В. Абакушина, А. В. Клинкова, Л. М. Каневский, Е. И. Коваленко // Молекулярная медицина.– 2014. № 3.– С. 34-38.
4. NKG2D иммунорецептор и его лиганды в периферической крови больных меланомой и раком кишечника / Маризина Ю. В., Абакушина Е. В., Неприна Г. С., Пасова И. А. // Злокачественные опухоли.– 2015.– Т. 4, спецвыпуск 2.– С. 313.
5. Критерии отбора пациентов больных меланомой для иммунотерапии активированными лимфоцитами на основе исходного уровня стресс-индуцированных молекул MICA / Абакушина Е. В., Маризина Ю. В., Пасова И. А., Козлов И. Г. и др. // Медицинская иммунология.– 2015. Т. 17, № S.– С. 228.

ROLE OF LIGANDS FOR NKG2D IMMUNORECEPTORS IN THE DEVELOPMENT OF CANCER

Abakushina E. V.[1], Neprina G. S.[1], Kozlov I. G.[2]

[1]A. Tsyb MRRC, Obninsk, Russia; [2]Oncology and Immunology named after D. Rogachev, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

NK-cells play an important role in the antitumor immune response. The interaction of ligands with the receptor leads to activation of NKG2D NK-cells and subsets of T-lymphocytes. However, the transformed cells are able to shedding of molecules MICA from the surface. These molecules can be detected in the serum of cancer patients. It was shown that in patients with melanoma and colorectal cancer increased level of soluble MICA in serum. In group of patients with high level of sMICA (>4000 pg/ml) observed inhibition of expression of NKG2D on lymphocytes. It can serve as a negative prognostic factor.

Keywords: NK-cells, NKG2D receptor, stress-induced molecule MICA, melanoma, gastric and colorectal cancer.

ДИСБАЛАНС ПРОДУКЦИИ МАРКЕРНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННОЙ, АТОПИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ И ПРИ СОЧЕТАНИИ АУТОИММУННОГО И АТОПИЧЕСКОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

Свиридова В. С., Пронина Н. А.

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Целью работы явилась сравнительная оценка функциональной активности регуляторных субпопуляций Т-клеток у больных бронхиальной астмой, ревматоидным артритом, а также у лиц с сочетанием этих заболеваний. Исследована продукция *in vitro* маркерных цитокинов Т-хелперов 1 (IL-2), Т-хелперов 2 (IL-4), Т-хелперов 3 (TGFβ) и Т-регуляторов1 (IL-10) у больных всех обследованных групп. Дана оценка особенностям цитокинового статуса при рассмотренных патологических состояниях.

Ключевые слова: бронхиальная астма, ревматоидный артрит, Т-хелперы, Т-регуляторы1.

Физиология и патология иммунной системы является актуальным и перспективным направлением для изучения в связи с постоянно наблюдающимся ростом заболеваемости как атопическими, так и аутоиммунными заболеваниями [1,2]. Несмотря на имеющиеся на настоящий момент многочисленные данные, касающиеся функциональной активности иммуноцитов, не до конца ясна роль иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов в развитии того или иного иммунопатологического состояния.

Цель. Провести сравнительную оценку продукции маркерных цитокинов иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов у больных ревматоидным артритом (РА), бронхиальной астмой (БА) и у лиц с сочетанием этих патологических состояний.

Нами было обследовано 32 человека с РА (критерии включения: возраст 40-50 лет; I-II степень активности; стаж заболевания более 5 лет), 30 человек, страдающих БА (критерии включения: возраст 40-50 лет; легкое персистирующее течение, поддающееся адекватному контролю препаратами базисной терапии; состояние обострения; стаж заболевания более 5 лет). Группу лиц с сочетанной патологией составили 25 больных с сочетанием ревматоидного артрита и бронхиальной астмы. Критерии включения были аналогичны критериям других групп пациентов.

Всем пациентам было проведено общеклиническое обследование, аллерготестирование для подтверждения атопического механизма развития заболевания у больных бронхиальной астмой и для выявления сенсибилизации у пациентов, страдавших ревматоидным артритом (в данной группе лиц выявление сенсибилизации к какой-либо группе аллергенов служило критерием исключения).

Группу контроля составили 10 практически здоровых добровольцев в возрасте 40-45 лет. Добровольцы не имели отягощенного анамнеза, клинических проявлений аутоиммунных или атопических заболеваний, результаты аллерготестирования были отрицательными.

Обследование проводилось в отсутствие острых инфекционных процессов. Во время обследования исключалось проведение пациентам прививок, а также прием ими иммунотропных препаратов.

Была исследована продукция маркерных цитокинов Т-хелперов типа 1 (IL-2), Т-хелперов типа 2 (IL-4), Т-хелперов типа 3 (TGFβ) и Т-регуляторов 1 (IL-10) [3] у пациентов всех обследованных групп. Цитокины определяли в супернатанте суточных культур клеток цельной крови методом иммуноферментного анализа (базальная продукция цитокинов, и секреция, стимулированная фитогемагглютинином (ФГА) («Difco», Германия)).

В группе больных РА на фоне угнетения продукции IL-4 (как спонтанной, так и митоген-индуцированной) по сравнению с контрольными величинами, мононуклеары периферической крови пациентов характеризовались более интенсивной секрецией других цитокинов. При этом базальная продукция IL-2 превышала контрольные значения, тогда как индуцированная митогеном была достоверно ниже, чем соответствующий показатель, зафиксированный нами в группе здоровых добровольцев.

У пациентов, страдающих бронхиальной астмой, на фоне низких значений базальной и митоген-индуцированной секреции IL-2, зафиксированных нами в супернатантах культур клеток цельной крови, отмечалось увеличение продукции других исследованных цитокинов по сравнению с соответствующими контрольными величинами.

У лиц с сочетанием БА и РА спонтанная продукция исследованных цитокинов не превышала аналогичные показатели группы здоровых добровольцев, за исключением показателя базальной секреции TGFβ, в то время, как индуцированная митогеном продукция не отличалась достоверно от показателей группы здоровых доноров.

При исследовании концентраций цитокинов в культурах клеток цельной крови пациентов, нами не было зарегистрировано индивидуальных значений, отличающихся от средневыборочных величин более чем на 2 стандартных отклонения, что, вероятно, объясняется однородностью сформированных групп больных.

При сравнении зафиксированных нами параметров цитокинового статуса в группах пациентов, нами было выявлено угнетение продукции IL-2 в группе больных бронхиальной астмой, снижение секреции IL-4 у лиц, страдавших ревматоидным артритом, уменьшение концентрации IL-10 в супернатанте клеточных культур больных сочетанной патологией. Кроме того, было выявлено достоверное угне-

тение митоген-индуцированной продукции TGFβ в данной группе пациентов. При сравнении других показателей цитокинового статуса межгрупповые различия не подтвердились.

Таким образом, нами были зафиксированы изменения цитокиновой продукции мононуклеарами периферической крови во всех обследованных группах пациентов. Причем лимфоциты больных с сочетанием бронхиальной астмы и ревматоидного артрита характеризовались также и нарушением способности к активации, что выражалось в недостаточном усилении цитокиновой продукции в ответ на митогенную стимуляцию.

Выявленные нами во всех группах пациентов признаки усиления функционирования субпопуляций клеток с супрессорной активностью, вероятно, отражают попытку иммунной системы контролировать воспалительный процесс в организме больного. Однако, возможно, степень активации данных субпопуляций является определяющим фактором в развитии того или иного патологического состояния иммунной системы, поскольку важен не сам факт повышения или понижения уровня маркерных цитокинов, а их динамика и соотношение оппозитных пулов иммунорегуляторных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новые подходы к лечению пациентов с сочетанием бронхиальной астмы и ХОБЛ – фокус на пролонгированные М-холинолитики / К. А. Зыков, О. Ю. Агапова, В. Б. Бейлина и др. // РМЖ.– 2014.– Т. 25.– С. 1836.
2. Мазуров В. И., Жугрова Е. С. Лефлуномид в лечении ревматоидного артрита / В. И. Мазуров, Е. С. Жугрова // РМЖ.– 2013.– Т. 6.– С. 328.
3. Фрейдлин И. С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции / И. С. Фрейдлин // Мед. иммунология.– 2005.– Т. 7(4).– С. 347-354.

IMBALANCR PRODUKTION OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE AND ATOPIC DESEASE AND WITH A COMBINATION OF AUTOIMMUNE AND ATOPIC INFLAMMATION

SviridovaV.S., Pronina N. A.

Siberian state medical university, Tomsk, Russia

The aim of this data is comparable estimation of functional activity of regulatory subpopulations of T-cells in patients with bronchial asthma, rheumatoid arthritis and in persons with combination of this diseases. The production of the marker cytokines of T-helper (Th) 1 (IL-2), Th2 (IL-4), Th3 (TGFβ) and T-regulators of the type 1 (Tr1) (IL-10) in vitro is analysed in all patients. The data contains estimation of peculiarity of cytokine status in all reseach pathologies.

Keywords: bronchial asthma, rheumatoid arthritis, T-helpers, T-regulators of the type 1.

БАЛАНС TH17- И TREG-ЛИМФОЦИТОВ В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Кононова Т. Е., Уразова О. И., Новицкий В. В., Захарова П. А., Игнатов М. В., Чурина Е. Г., Филинюк О. В., Полетика В. С.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

В результате исследования факторов дифференцировки Th17- и Treg-лимфоцитов и их количества установлено, что у пациентов с инфильтративным ТЛ увеличение секреции IL-6, снижение продукции TGFβ (в случае лекарственной устойчивости возбудителя) при нормальном уровне IL-1β *in vitro* сопровождается повышением экспрессии гена *RORC2* в лимфоцитах и содержания Th17-лимфоцитов в крови. У больных с диссеминированным ЛУ ТЛ гиперпродукция TGFβ способствует повышению экспрессии гена *FOXP3* в лимфоцитах и количества Treg.

Ключевые слова: Th17-лимфоциты, Treg-лимфоциты, цитокины, транскрипционные факторы, туберкулез легких.

Развитие и прогрессирующее течение инфекционных заболеваний (в том числе туберкулеза) зависит от баланса в организме различных субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов (Th). При этом дифференцировка и пролиферация Th17-лимфоцитов, осуществляющих протективные функции в процессе реализации противоинфекционного иммунитета, происходит в тесной взаимосвязи с регуляторными Т-клетками (Treg), избыточная активность которых, напротив, проводит к ослаблению иммунных реакций [1, 2, 3, 4]. Изучение механизмов, регулирующих баланс Th17- и Treg-лимфоцитов у больных туберкулезом, является актуальным как с фундаментальной, так и практической точек зрения.

Цель. Оценить баланс Th17- и Treg-лимфоцитов при различных клинических формах туберкулеза легких.

Материал и методы исследования. Обследовано 122 пациента ОГБУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр» с впервые выявленным ТЛ (89 мужчин и 33 женщины, средний возраст 41,35±11,33 лет). Пациенты были разделены на группы в зависимости от клинической формы (инфильтративный, диссеминированный) и варианта (лекарственно-чувствительный (ЛЧ) и лекарственно-устойчивый (ЛУ)) заболевания. Контрольную группу составили 45 здоровых доноров. Материалом для исследования служила венозная кровь. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови методом градиентного центрифугирования (ρ=1,077 г/см^3). $CD4^+CD161^+IL\text{-}17A^+$ (Th17) и $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Treg) лимфоциты типировали методом проточной цитофлуориметрии. Процедуру окрашивания проводили согласно протоколам фирмы производителя («Becton Dickinson», США). Для определения содержания цитокинов (интерлейкина (IL) 1β, IL-2, IL-6, и трансформирующего фактора роста (TGF) β) в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов использовали твердофазный иммуноферментный метод (ELISA) («R&D Systems», США). Выделение тотальной РНК из клеток осуществляли сорбентно-колоночным методом по инструкции производителя («QIAGEN», Германия). Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции, используя реагенты фирмы «Синтол» (Россия). Фрагмент кДНК амплифицировали методом ПЦР в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I («Синтол», Россия). Уровень экспрессии генов определяли с помощью сравнительного метода ΔΔCt, в качестве референсного гена использовали β-актин. Статистический анализ полученных результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ «Statistica for Windows» Version 6.0 («StatSoftInc.», США, 2007).

Результаты. При исследовании секреции цитокинов, определяющих развитие Th17-лимфоцитов, у больных с инфильтративным и диссеминированным ТЛ (в случае ЛЧ варианта) выявлено увеличение продукции IL-6 мононуклеарными лейкоцитами в 1,3 раза ($p<0,05$). Концентрация IL-1β *in vitro* у больных ТЛ не отличалась от соответствующего показателя в группе здоровых доноров. Секреция TGFβ мононуклеарными лейкоцитами крови при инфильтративном ЛУ ТЛ оказалась ниже (в 1,3 раза ($p=0,046$)), а при диссеминированном ЛУ ТЛ, напротив, выше (в 1,9 раза ($p=0,015$)) соответствующего показателя у здоровых доноров. При оценке относительного и абсолютного содержания $CD4^+CD161^+IL\text{-}17A^+$ Th17-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с ТЛ выявлено достоверное его повышение ($p<0,05$), за исключением больных с диссеминированным ЛУ ТЛ. В этих же группах исследования регистрировалось увеличение уровня мРНК гена транскрипционного фактора RORC2 в лимфоцитах приблизительно в 2 раза ($p<0,05$). В результате исследования секреции цитокинов, определяющих развитие Treg-лимфоцитов, у пациентов с ТЛ (вне зависимости от клинической формы и варианта заболевания) установлено снижение продукции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами. Концентрация TGFβ *in vitro*, как указывалось ранее, оказалась повышенной у пациентов с диссеминированным ЛУ ТЛ. Примечательно, что при оценке количества $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg-лимфоцитов в крови, а также уровня мРНК гена транскрипционного фактора FoxP3 в лимфоцитах статистически достоверное их повышение было отмечено лишь у больных этой группы (в 2,3 раза ($p=0,038$) и в 1,6 раза ($p=0,004$) соответственно).

Выводы: при ТЛ гиперсекреция IL-6 мононуклеарными лейкоцитами крови в сочетании с низкой концентрацией TGFβ (в случае инфильтративного ЛУ ТЛ) и повышением уровня мРНК гена *RORC2*, по-видимому, является ключевым механизмом стимуляции дифференцировки Th17-лимфоцитов, способствующих формированию эффективной противотуберкулезной защиты и контролю инфекционного процесса. У больных диссеминированным ТЛ, выделяющих лекарственно-устойчивые штаммы *M. tuberculosis*, гиперсекреция TGFβ в сочетании с повышенным уровнем экспрессии гена *FOXP3* может сопровождаться активацией дифференцировки Treg-лимфоцитов, обусловливающих формирование иммуносупрессии и развитие более тяжелой формы заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen X., Oppenheim J. J. Th17 cells and Tregs: unlikely allies / X. Chen, J. J. Oppenheim // Journal of Leukocyte Biology.– 2014.– V. 95.– P. 723-731.
2. Zheng S. G. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive / S. G. Zheng // American Journal of Clinical and Experimental Immunology.– 2013.– V. 2, № 1.– P. 94-106.
3. Опосредованная Т-лимфоцитами-хелперами типа 17 регуляция антибактериального (противотуберкулезного) иммунитета / Т. Е. Кононова, О. И. Уразова, В. В. Новицкий и др. // Молекулярная биология.– 2013.– Т. 47, № 6.– С. 883-890.
4. Факторы дифференцировки Th17- и Treg-лимфоцитов при туберкулезе легких / Т. Е. Кононова, О. И. Уразова, В. В. Новицкий и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2015.– Т. 159, № 2.– С. 158-161.

BALANCE OF TH17- AND TREG-LYMPHOCYTES IN THE PULMONARY TUBERCULOSIS IMMUNOPATHOGENESIS

Kononova T. E., Urazova O. I., Novitskii V. V., Zakharova P. A., Ignatov M. V., Churina E. G., Filinuk O. V., Poletika V. S.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

The study of differentiation factors and amounts of Th17- and Treg-lymphocytes found that in patients with infiltrative pulmonary tuberculosis (PT) the increased secretion of IL-6 and the reduction of production of TGFβ (in the case of drug resistance) at a normal level of IL-1β *in vitro* followed by increasing *RORC2* gene expression in lymphocytes and amounts of Th17-lymphocytes in blood. In patients with disseminated drug-resistant PT an overproduction of TGFβ promotes increasing *FOXP3* gene expression in lymphocytes and amounts of Treg.

Keywords: Th17-lymphocytes, Treg-lymphocytes, cytokines, transcription factors, pulmonary tuberculosis.

ЦИТОКИН-ОПОСРЕДОВАННАЯ (IL-7, G-CSF, GM-CSF, EPO, IL-8) РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВАЦИОННОГО СТАТУСА Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Гончаров А. Г., Шмаров В. А., Малащенко В. В., Меняйло М. Е., Газатова Н. Д., Тодосенко Н. М., Мельников А. Е., Мелащенко О. Б., Мархайчук А. З., Швецова Е., Шунькин Е. О.

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия

Показано, что IL-7 способен усиливать активацию $CD4^+$ и $CD4^-$ Т-клеток, ассоциированную с экспрессией молекулы CD25. IL-8 может оказывать негативное влияние на активацию $CD4^+$ и $CD4^-$ Т-клеток. G-CSF усиливает функциональную активность, обусловленную экспрессией молекулы CD38 на $CD3^+$ лимфоцитах в основном за счет $CD4^+$ Т-лимфоцитов, GM-CSF – за счет $CD4^-$ Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: Т-лимфоцит, активация, CD25, CD38, гемопоэтин.

Гемопоэтины являются важнейшими участниками механизмов адаптации к изменяющимся условиям внешней среды. Функциональное значение гемопоэтинов состоит в стимуляции кроветворения, в том числе восполнении количества иммунокомпетентных клеток, но и, по-видимому, также в регуляции адаптивных иммунных реакций и поддержании иммунной памяти. Изучение цитокин-опосредованной (IL-7, G-CSF, GM-CSF, Epo, IL-8) регуляции активационного статуса Т-лимфоцитов человека позволит сформировать представления о фундаментальных механизмах адаптогенеза и формирования иммунной памяти, создать теоретическую основу для разработки новых методических подходов к лечению заболеваний опосредованных патологией иммунной системы.

Цель. Изучить влияние интерлейкина-7 (interleukin-7, IL-7), IL-8, гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), эритропоэтина (erythropoietin, Epo) на регуляцию активационного статуса Т-лимфоцитов человека.

Материалы и методы. Т-лимфоциты выделяли из мононуклеарных клеток здоровых доноров (17 доноров обоих полов, средний возраст составил 30±9 лет) методом позитивной магнитной сепарации с использованием магнитных частиц, коньюгированных с анти-CD 3 антителами (Miltenyi Biotech, Германия). Содержание Т-клеток в исследуемых образцах составляло не менее 99 %. Выделенные клетки культивировали в концентрации $1{,}0\times10^6$ клеток/мл в бессывороточной среде TexMACS (Miltenyi Biotech) с активатором (частицами, коньюгированными с антителами к CD2, CD3 и CD28 – T-Cell activation/expansion Kit human, Miltenyi Biotech) или без них в контроле в течение 48 ч. Перед культивированием в опытные пробы добавляли исследуемые гемопоэтины. В эксперименте был использован диапазон концентраций (0,01 нг/мл, 0,10 нг/мл, 1,00 нг/мл, 10,00 нг/мл) рекомбинантных форм IL-7, IL-8, G-CSF, GM-CSF (Miltenyi Biotech, Германия), а также Epo-β (Эпокрин, Россия) в концентрациях 0,1 МЕ/мл, 1,0 МЕ/мл, 10,0 МЕ/мл и 100,0 МЕ/мл. Активатор имитирует функции антигенпрезентирующей клетки в отношении активации Т-лимфоцита. Экспрессию поверхностных молекул на клетках исследовали методом проточной цитометрии с использованием меченных флюорохромами антител к молекулам CD3, CD4, CD25, CD38 (BioLegend, США). В общем пуле Т-клеток ($CD3^+$), в популяциях Т-хелперов ($CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD4^-$) определялось число активи-

рованных $CD25^+$ и $CD38^+$ клеток. При статистической обработке данных для каждой выборки вычисляли медиану, первый и третий квартили. Для оценки достоверности различий выборок использовали критерий Вилкоксона. Различия считались достоверными при уровне значимости $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Ранее нами было показано, что G-CSF, GM-CSF, IL-7 и Epo могут прямо влиять на активацию и функциональные свойства Т-лимфоцитов в культуре мононуклеарных клеток. В частности, Epo способен супрессировать провоспалительную активность Т-клеток [1].

IL-7 может поддерживать антигензависимую активацию Т-клеток, усиливая пролиферативные процессы и продукцию цитокинов. Являясь незаменимым фактором выживаемости наивных Т-лимфоцитов, IL-7 поддерживает гомеостаз антиген-специфичных Т-клеток памяти, регулирует уровнь апоптоза и антигеннезависимой пролиферации [2].

Внесение IL-7 в сочетании с активатором во всем диапазоне концентраций приводило к достоверному увеличению числа $CD25^+$ Т-лимфоцитов по сравнению с положительным контролем, как в общем Т-клеточном пуле, так и в популяциях $CD4^+$ и $CD4^-$ клеток. По количеству $CD38^+$ Т-лимфоцитов мы не обнаружили достоверных отличий между пробами с IL-7 или без него. Гетерогенные $CD4^+$ и $CD4^-$ популяции не ответили увеличением CD 38$^+$ Т-лимфоцитов на IL-7 опосредованный стимул, что может быть связано с избирательной активностью данного гемопоэтина в отношении Т-клеток, а именно действием его на малочисленные субпопуляции Т-лимфоцитов.

IL-8 не является классическим гемопоэтическим фактором, в то же время, как хемокин, принимает участие в Т-клеточном гомеостазе, в развитии воспалительной реакции. В максимальной концентрации (10,00 нг/мл) IL-8 снижал количество $CD25^+$ клеток как среди $CD4^+$, так и среди $CD4^-$ Т-лимфоцитов, и не влиял на число $CD38^+$ клеток.

G-CSF играет ключевую роль в пролиферации и дифференцировке клеток гранулоцитарного ростка кроветворения, а также экспрессия рецептора G-CSF выявлена на лимфоцитах [3]. В ходе экспериментальной работы было установлено, что добавление G-CSF не влияло на пролиферативную активность и раннюю активацию Т-клеток, обусловленную экспрессией молекулы CD25. В то же время, нами были получены данные о том, что G-CSF повышает функциональную активность Т-лимфоцитов, опосредованную экспрессией трансмембранной молекулы CD38. G-CSF в концентрации 0,01 нг/мл статистически значимо увеличивал содержание $CD38^+$ клеток среди $CD3^+$ Т-лимфоцитов, культивируемых с активатором. Влияние на популяцию $CD4^-$ Т-лимфоцитов установлено не было. Было выявлено положительное влияние G-CSF в концентрациях 0,01 и 0,10 нг/мл на количество $CD38^+$ клеток среди $CD4^+$ Т-лимфоцитов.

GM-CSF является одним из основных гемопоэтинов, влияющих на гранулоцитарный и макрофагальный ростки кроветворения, причем действует не только на низкодифференцированные, но и на созревшие в функциональном отношении клетки, участвующие в развитии воспалительных реакций [4].

Согласно нашим данным, GM-CSF не оказывал влияние на пролиферативную активность Т-лимфоцитов, связанную с экспрессией трансмембранной молекулы CD25. В то же время, GM-CSF в диапазоне концентраций от 0,01 до 1,00 нг/мл статистически значимо увеличивал содержание $CD38^+$ клеток среди $CD3^+$ Т-лимфоцитов, культивируемых с активирующими частицами. Также было выявлено положительное влияние GM-CSF в концентрации 0,10 нг/мл на содержание $CD38^+$ клеток среди $CD4^-$ Т-лимфоцитов.

Эритропоэтин – основной регулятор эритропоэза, стимулирующий образование эритроцитов из поздних клеток-предшественников. Однако, эритропоэтиновый рецептор идентифицирован и на негемопоэтических клетках, в том числе на Т-лимфоцитах [5]. Добавление Epo (в различных концентрациях) к активированным клеткам не оказывало существенного влияния на пролиферативную и функциональную активность Т-лимфоцитов, ассоциированную с экспрессией CD 38 и CD 25 молекул.

Выводы:

1. IL-7 уже в минимальной используемой в эксперименте концентрации (0,01 нг/мл) способен усиливать активацию $CD4^+$ и $CD4^-$ Т-клеток, ассоциированную с экспрессией молекулы CD 25.

2. IL-8 может оказывать негативное влияние на активацию $CD4^+$ и $CD4^-$ Т-клеток.

3. G-CSF усиливает функциональную активность обусловленную экспрессией трансмем-

бранной молекулы CD38 на $CD3^+$ Т-лимфоцитах в основном за счет $CD4^+$ Т-лимфоцитов.

GM-CSF стимулирует увеличение функциональной активности Т-лимфоцитов, опосредованной экспрессией молекулы CD38 на поверхности $CD3^+$ Т-лимфоцитов преимущественно за счет $CD4^-$ Т-лимфоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прямое влияние гемопоэтинов на функциональную активность Т-лимфоцитов / А.Г. Гончаров, В.А. Шмаров, В.В. Малащенко и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9, № 18.– С. 49-51.
2. Бойчук С.В., Дунаев П.Д. Роль интерлейкина 7 (IL-7) в патогенезе и терапии ВИЧ-инфекции / С.В. Бойчук, П.Д. Дунаев // Цитокины и воспаление.– 2008.– Т. 7, № 1.– С. 3-8.
3. Characterization of granulocyte colony-stimulating factor receptor expressed on human lymphocytes / K. Morikawa, S. Morikawa, M. Nakamura et al. // Br J Haematol.– 2002.– V. 118.– P. 296-304.
4. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know / S. Yufang, H Liu Catherine, A. Roberts et al. // Cell Research.– 2006.– V. 16.– P. 126-133.
5. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin / W. Jelkmann // Intern. Med.– 2004.– V. 43(8).– P. 649-659.

CYTOKINE MEDIATED (IL-7, G-CSF, GM-CSF, EPO, IL-8) REGULATION OF HUMAN T CELLS ACTIVATION STATUS

Goncharov A.G., Shmarov V.A., Malashchenko V.V., Meniailo M.E., Gazatova N.D., Todosenko N.M., Melnikov A.E., Melashcenko O.B., Markhaychuk A.Z., Svecova J., Shunkin E.O.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

It is shown that IL-7 is able to enhance the CD25 associated activation of $CD4^+$ and $CD4^-$ T cells. IL-8 may negatively affect on the activation of $CD4^+$ and $CD4^-$ T cells. G-CSF increases the functional activity due to the expression of CD38 molecule on $CD3^+$ lymphocytes mainly via $CD4^+$ T lymphocytes, while GM-CSF through $CD4^-$ T cells.

Keywords: T cell, activation, CD25, CD38, hematopoietin.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК У ЖЕНЩИН С ГИПЕРТЕНЗИЕЙ НА СЕВЕРЕ

Морозова О.С., Каббани С.М., Поповская Е.В., Щеголева Л.С.

ФАНО России ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики Российской академии наук, Институт физиологии природных адаптаций, Архангельск, Россия

У 41,66±2,14 % обследованных женщин с АГ и у 33,33±1,85 % здоровых женщин выявлены повышенные уровни среднего содержания клеток ($CD95^+$); у 41,66±2,14 % женщин с Аг и у 36,66±1,94 % здоровых женщин выявлена выраженная лимфопролиферация ($CD10^+$).

Ключевые слова: артериальная гипертензия, фенотипы лимфоцитов, Север.

Артериальная гипертония (АГ) является наиболее распространенным хроническим заболеванием, увеличивающим смертность и ухудшающим прогноз жизни населения. В Российской Федерации около 39,2-41,1 % населения имеют повышенное артериальное давление (АД), в том числе в Архангельской области – 30,12 % населения. АГ является фак-

тором риска развития ишемической болезни сердца (ИБС) и служит основной причиной сосудистых заболеваний мозга, в том числе инсульта [1, 2], особенно в экстремальных климатических условиях Севера [3, 4, 5].

Цель работы. Выявить особенности иммунного статуса у женщин с гипертензией и здоровых женщин в возрасте 40-60 лет, проживающих на Севере.

Материалы и методы. Проведена экспедиция в пос. Пинега Архангельской области (март 2011 г.), обследовано 30 женщин, в возрасте 40-60 лет, страдающих артериальной гипертензией и 31 женщина 40-60 лет, не имеющих диагноза АГ. Иммунологические исследования проведены в лаборатории физиологии иммунокомпетентных клеток Института физиологии природных адаптаций УрОРАН, г. Архангельск. В периферической крови определяли: концентрацию фенотипов лимфоцитов CD 5$^+$, CD 10$^+$, CD 71$^+$, CD 95$^+$; абсолютное содержание лимфоцитов. Содержание фенотипов лимфоцитов определяли с помощью непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител (НПЦ «МедБиоспектр», Россия) на препаратах лимфоцитов типа «высушенной капли». Абсолютное содержание лимфоцитов определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза. Использован пакет прикладных программ математической статистики «Statistica 6.0».

Основные результаты. Среднее абсолютное содержание лимфоцитов в периферической крови составило 2,50±0,17×10^9 кл/л., лимфоцитозы установлены у 14,81±1,27 %, лимфопении – у 11,11±1,10 % женщин с гипертензией. В группе женщин, не имеющих диагноза АГ, среднее абсолютное содержание лимфоцитов составило 2,44±0,15×10^9 кл/л., лимфоцитозы установлены у 9,67±0,99 %, лимфопении у 9,67± 0,99 % обследованных.

У обследованных женщин с АГ выявлено низкое содержание Т – лимфоцитов с рецепторами CD5$^+$ (0,66±0,05×10^9 кл/л.), значения находятся ниже общепринятых физиологических норм. Дефицит содержания Т – клеток установлен у 84,61±3,05 % людей. В группе женщин, не имеющих диагноза АГ, концентрации CD5$^+$ составляют 0,53±0,04×10^9 кл/л., дефицит содержания у 100,00±3,20 % женщин. Уровень среднего содержания клеток с рецепторами к апоптозу (CD95$^+$) у женщин с гипертензией находится на верхней границе общепринятых физиологических норм и составляет 0,55±0,04×10^9 кл/л., при этом у 41,66±2,14 % обследуемых регистрируются повышенные средние значения показателя. У здоровых обследованных женщин, не имеющих диагноза АГ, уровень (CD 95+) составляет 0,51±0,04×10^9 кл/л., повышенные значения регистрируются у 33,33±1,85 % женщин.

Среднее содержание фенотипов с рецепторами к трансферрину (CD71$^+$) в среднем составляло 0,60±0,06×10^9 кл/л. у женщин с гипертензией и 0,58±0,04×10^9 кл/л. в группе здоровых женщин. Данные показатели находятся выше границ общепринятых физиологических норм. При этом у 43,47±2,18 % женщин с гипертензией и 55,17±2,38 % здоровых женщин значения (CD71$^+$) находятся выше общепринятых физиологических норм.

Пролиферативная активность CD10$^+$ у женщин с гипертензией в среднем равна 0,56± 0,04×10^9 кл/л., при этом установлено, что повышенные значения данного показателя наблюдали у 41,66±2,14 % людей. В группе здоровых лиц CD10$^+$ составляет 0,54±0,05×10^9 кл/л., у 36,66±1,94 % обследованных показатель находится выше общепринятых физиологических норм. Выявлена статистически достоверная прямая зависимость в группе женщин, страдающих АГ, между CD5$^+$ и CD10$^+$ (r=0,83; p<0,05); CD71$^+$ и CD95$^+$ (r=0,85; p<0,05); CD10$^+$ и CD71$^+$ (r=0,76; p<0,05). Выявлена статистически достоверная прямая зависимость в группе женщин, не имеющих диагноза АГ, между CD5$^+$ и CD10$^+$ (r=0,77; p<0,05); CD5$^+$ и CD71$^+$ (r=0,72; p<0,05).

Таким образом, у обследованных лиц 40-60 лет, с гипертензией, среднее содержание клеток с рецепторами к апоптозу (CD95$^+$) составляет 0,55±0,04×10^9 кл/л., что несколько выше, по сравнению с группой здоровых женщин 0,51±0,04×10^9 кл/л. Повышенные уровни среднего содержания (CD95$^+$) выявлены у 41,66±2,14 % обследуемых с гипертензией, у 33,33±1,85 % здоровых женщин. Пролиферативная активность (CD10$^+$) у женщин с АГ в среднем равна 0,56±0,04×10^9 кл/л. по сравнению с показателем у здоровых женщин 0,54±0,05×10^9 кл/л. Повышенные значения показателя наблюдали у 41,66±2,14 % женщин с гипертензией, у 36,66±1,94 % здоровых. Абсолютное среднее содержание лимфоцитов в периферической крови у лиц с АГ составило 2,50±0,17×10^9 кл/л. по сравнению с показателем

в группе здоровых лиц- 2,44±0,15×10^9 кл/л. При этом у лиц с АГ лимфоцитозы и лимфопении регистрируются гораздо чаще – у 14,81±1,27 % и 11,11±1,10 % женщин, соответственно. В группе здоровых лиц лимфоцитозы установлены у 9,67±0,99 %, лимфопении – у 9,67±0,99 % обследованных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коломоец Н.М., Бакшеев В.И. Гипертоническая болезнь и ишемическая болезнь сердца: руководство для врачей, обучающих пациентов в школе больных гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца / Н.М. Коломоец, В.И. Бакшеев // Москва: Медицина.– 2003.– 336 с.
2. Морозова О.С., Поповская Е.В. Иммунологическая реактивность у мужчин с гипертензией в условиях Арктики / О.С. Морозова, Е.В. Поповская // Вестник Уральской медицинской академической науки.– 2014.– № 2(48).– С. 86-87.
3. Иммунологическая реактивность и сердце / Л.К. Добродеева, О.А. Миролюбова, И.И. Чернов и др. // Сыктывкар: Издательство Коми научного центра УрОРАН.– 2002.– 264с.
4. Филиппова О.Е. Соотношение лимфоидных субпопуляций в иммунном ответе / О.Е. Филиппова // Вестник Уральской медицинской академической науки.– 2014.– № 2(48).– С. 102-104.
5. Щеголева Л.С. Резервные возможности иммунного гомеостаза у человека на Севере / Л.С. Щеголева // Екатеринбург: УрОРАН.– 2007.– 207 с.

PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF LYMPHOID CELLS IN WOMEN WITH HYPERTENSION IN THE NORTH

Morozova O.S., Kabbani S.M., Popovskaya E.V., Shchegoleva L.S.

Federal Agency of scientific organization of Russia Federal state budget institution of science, Federal center for integrated study of the Arctic Russian Academy of Sciences, Institute of physiology of natural adaptations, Arkhangelsk, Russia

In the examined women with hypertension revealed elevated levels the average grade of the cells ($CD95^+$) in 41,66±2,14 % of patients; 33,33±1,85 % of healthy women, against the background of severe lymphoproliferative ($CD10^+$) from 41,66±2,14 % of women with hypertension; of 36,66±1.94 % in healthy women.

Keywords: arterial hypertension, the phenotypes of lymphocytes, North.

НЕЙТРОФИЛЬНО-ЛИМФОЦИТАРНОЕ ОТНОШЕНИЕ, УРОВЕНЬ СРП И СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ

Карпунина Н.С.[1], Наумов С.А.[2]

[1]ГБОУ ВПО ПГМУ им.ак.Е.А.Вагнера Минздрава России;
[2]ГБУЗ ПК «Клинический кардиологический диспансер»,
Пермь, Россия

Определяли нейтрофильно-лимфоцитарное отношение (НЛО), уровень С-РП и интерлейкинов-1β, -4, -6, -17, ФНО-α методом ИФА у пациентов с различными формами острого коронарного синдрома (ОКС). НЛО не имело достоверных межгрупповых отличий. У лиц с Q-позитивным ИМ выявлены максимальные уровни ИЛ-1β, -4, -6, -17 и ФНО-α на фоне угнетения продукции ИЛ-4. Пациенты с ОКС без подъема сегмента ST на ЭКГ имели вторые по абсолютной величине показатели провоспалительных маркеров, за исключением СРП и ИЛ-6.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, С-РП, цитокины.

Сердечно-сосудистые заболевания, несмотря на современные технологии диагностики и лечения, продолжают лидировать по распространенности, инвалидизации и смертности населения. Благодаря эпидемиологическим исследованиям, был выявлен ряд неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды, способных оказывать влияние на возникновение и течение заболеваний, ассоциированных с атерогенезом. Установлено, что такие ведущие факторы риска как артериальная гипертония, дислипидемия, курение составляют только половину всех причин кардиоваскулярной патологии. У остальных пациентов не представляется возможным объяснить развитие болезни с этих позиций. Очевидно, этим и мотивируется возросший в конце XX века интерес к воспалительной теории атеросклероза. Субклиническое воспаление, обусловленное последовательным каскадом взаиморегулируемых факторов, включающих клеточный, гуморальный иммунитет, первичные (интерферон, интерлейкины, факторы роста) и вторичные (белки острой фазы воспаления, компоненты системы комплемента) медиаторы, ведет к экспрессии факторов, активирующих тромбообразование с последующей окклюзией коронарной артерии [1]. Тем не менее, мнение о роли цитокиновой активации в развитии и течении внутрикоронарного тромбоза остается неоднозначным. В доступной литературе отсутствуют сведения о комплексной оценке указанных субстанций, и их возможной прогностической значимости.

Изложенное выше определило **цель** настоящего исследования – изучить уровень СРП, сывороточных цитокинов и нейтрофильно-лейкоцитарное отношение у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС).

Материалы и методы. Исследование проводили в 2015 году, оно было открытым, параллельным, одномоментным, неконтролируемым. К критериям исключения относили нарушения углеводного обмена, эндокринную патологию, бронхиальную астму, пороки сердца, злокачественные новообразования, острые воспалительные или обострение хронических воспалительных заболеваний в предшествующие 2 недели. После оформления согласия на участие в исследовании и в соответствии с критериями исключения были сформированы профильные группы, сопоставимые по возрасту и полу: I – пациенты с ОКС без подъема сегмента ST на ЭКГ – 40 человек (средний возраст 59 [55; 63,5] лет, мужчин – 21); II группа – 20 человек с ОКС с подъемом сегмента ST на ЭКГ (средний возраст 58 [51,5; 62,5] лет, мужчин –12); контрольную группу составили 35 условно здоровых (средний возраст 59 [54,0; 66,0] лет, мужчин – 19). Основанием для распределения пациентов в группы служили результаты традиционных клинико-инструментальных обследований. У всех пациентов в полном объеме были выполнены лечебно-диагностические рекомендации, касающиеся догоспитального этапа оказания помощи, тромболизис во второй группе не проводили в связи с возможностью быстрой доставки в региональный сосудистый центр. Давность болевого синдрома во всех случаях не превышала 6 часов. Условно здоровыми считали лиц, не имевших характерных объективных и документально подтвержденных признаков ишемической болезни сердца. Всем больным при поступлении выполняли общий анализ крови, определяли уровень С-реактивного протеина высокочувствительным методом, а также содержание в сыворотке крови интерлейкинов-1β, -4, -6, -17, фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) методом иммуноферментного анализа при помощи соответствующих тест-систем ЗАО «Вектор-БЕСТ», г. Новосибирск. Уровень СРП считали нормальным, если он не превышал 5 мг/л, ФНО-α – 2,5 пг/мл, ИЛ-1β – 15 пг/мл, ИЛ-6 – 30 пг/мл, ИЛ-17 – 50 пг/мл. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0. Полученные результаты представлены в виде медианы, 25- и 75-процентилей, с достоверным различием при $p<0,05$. Для исследования связи двух признаков вычисляли непараметрический коэффициент ранговой корреляции Спирмена (R) с аналогичной интерпретацией р-уровня.

Основные результаты. Отношение нейтрофилов к лимфоцитам, которое имеет, по последним данным, весомое значение для развития сердечно-сосудистых заболеваний [2], в нашем исследовании не имело достоверных межгрупповых отличий и составило 1,7 [1,1; 2,17], 2,1 [1,17; 3,3] и 2,0 [1,34; 2,39] соответственно. Хотя следует отметить, что максимальными были значения именно у пациентов с тяжелой формой ОКС, сопровождавшейся окклюзией коронарной артерии. Существенные отличия по уровню СРП получены между

I и II группами (p=0,00005), несмотря на то, что медиана во всех группах находилась в пределах норматива: 4,0 [2,25; 5,1] мг/л, 4,6 [4,1; 5,5] мг/л и 4,7 [3,9; 5,1] мг/л соответственно. В отношении цитокинового профиля из всех обследованных наиболее неблагоприятным представляется сочетание, характеризующее лиц с Q-позитивным ИМ: максимальные уровни провоспалительных цитокинов на фоне угнетения продукции ИЛ-4 как противовоспалительного медиатора. Уровень ИЛ-1 составил 7,2 [6,24; 8,54] пг/мл, ИЛ-6 – 9,16 [4,64; 11, 25] пг/мл, ФНО-α – 8,0 [6,48; 9,00] пг/мл, тогда как ИЛ-4 – 1,6 [0,8; 2,3] пг/мл. Достоверные различия с группой контроля получены по уровню ФНО-α (p=0,0001), ИЛ-1 (p=0,000), ИЛ-17 (p=0,02). При сравнении с группой ОКС без подъема сегмента ST на ЭКГ значимые отличия получены по уровню ФНО-α (p=0,01) и ИЛ-1 (p=0,000001). Увеличение ФНО-α в сыворотке было напрямую связано с выработкой ИЛ-1β и ИЛ-6 (R=0,51, p=0,02 и R=0,73, p=0,0002 соответственно), ИЛ-1β коррелировал с уровнем ИЛ-17 (R=0,68, p=0,03). Интерес представлял также поиск особенностей, характеризующих ОКС без подъема сегмента ST на ЭКГ, как клинический эквивалент дестабилизации атеросклеротической бляшки – процесса, протекающего с участием медиаторов воспаления. Пациенты из этой группы имели вторые по абсолютной величине показатели провоспалительных маркеров, за исключением СРП и ИЛ-6: уровень ИЛ-1 составил 1,3 [0,8; 1,8] пг/мл, ИЛ-6 – 5,1 [3,0; 8,1] пг/мл, ФНО-α – 3,35 [2,2; 4,3] пг/мл, при этом ИЛ-4-1,9 [1,1; 2,7] пг/мл.

Таким образом, установлены существенные отличия в содержании провоспалительных цитокинов в крови пациентов с различными формами ОКС, причем их концентрация нарастает в зависимости от тяжести повреждения миокарда. Все больные значимо отличались от здоровых ровесников по многим изучаемым параметрам, что позволяет говорить о формирующихся взаимоотношениях между тем или иным видом острой коронарной патологии и воспалительной реакцией с участием определенного набора медиаторов воспаления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ложкина Н.Г. Острый коронарный синдром: клинические, биохимические и молекулярно-генетические аспекты отдаленного прогнозирования: автореф.дисс. на соиск. учен. степ. докт. мед.наук (14.01.05) / Ложкина Наталья Геннадьевна.– Новосибирск, 2015.– 43 с.
2. Di Gangi C. Neutrophil-lymphocyte ratio: Predicting cardiovascular and renal complications in patients with diabetes / C. Di Gangi // J Am Assoc Nurse Pract.– 2016.– doi: 10.1002/2327-6924.12366.

NEYTROPHIL-LYMPHOCYTE RATIO, LEVELS OF CRP AND SERUM CYTOKINES IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

Karpunina N.S.[1], Naumov S.A.[2]

[1]Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University; [2]Clinical Cardiological Health Centre, Perm, Russia

The aim was to study the levels of C-RP, serum cytokines and neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) in patients with different forms of acute coronary syndrome (ACS). CBC, hsC-RP and serum Il-1β, -4, -6, -17, TNF-α were measured by ELISA. NLR was non-significant within compared groups. The highest levels of Il-1β, -4, -6, -17, TNF-α together with the lowest Il-4 were in patients with STEMI. Patients of the 1st group were the second in all inflammatory markers, except C-RP and Il-6.

Keywords: acute coronary syndrome, C-RP, cytokines.

ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОПЕНИЕЙ И ОСТЕОПОРОЗОМ НА ФОНЕ ОСТЕОАРТРОЗА

Гладкова Е. В., Мамонова И. А., Карякина Е. В., Пучиньян Д. М., Бабушкина И. В., Ромакина Н. А., Белова С. В.

ФГБУ «Саратовский НИИ травматологии и ортопедии» Минздрава России, Саратов, Россия

У пациентов с остеоартрозом и остеопеническим синдромом были изучены цитокины сыворотки крови, субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и маркеры метаболизма костной ткани в дооперационном периоде и через 3 месяца после тотального эндопротезирования тазобедренного сустава. Выявлены отдельные признаки иммунодепрессии, которая сохранялась спустя 3 месяца после операции и оказывала негативное влияние на ремоделирование костной ткани.

Ключевые слова: клеточный иммунитет, остеопения, остеопороз, остеоартроз.

Поздние стадии развития дегенеративно-деструктивных изменений суставов при остеоартрозе (ОА) сопровождаются активным поступлением в биологические жидкости организма фрагментов коллагена и протеогликанов, клеточного детрита – продуктов деградации хряща и субхондральной кости, что вызывает активацию иммунокомпетентных клеток и выработку цитокинов, обуславливающих вторичный иммунный ответ [1]. Особенности метаболического статуса данной категории пациентов обусловлены выраженными локальными структурными изменениями и системным снижением минеральной плотности костной ткани (МПКТ) [2].

Цель исследования. Изучить отдельные аспекты гуморального и клеточного иммунитета у пациентов с остеопеническим синдромом и ОА.

Материалы и методы. В исследование были включены 28 пациентов (64±4,2 года) с ОА и остеопеническим синдромом различной степени выраженности, без сопутствующих заболеваний, оказывающих влияние на изучаемые показатели. Всем пациентам в динамике: до эндопротезирования тазобедренного сустава и через 3 месяца после операции проводили лабораторно-инструментальное обследование. МПКТ оценивали путём проведения двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DXA) с использованием Hologic Discovery QDR (США). Остеопенический синдром характеризовался величиной Т-критерия -1,1 SD и ниже. Методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием спектрофотометра автоматического многофункционального ЕРОСН™ определяли содержание в сыворотке крови маркеров метаболизма костной ткани: С-концевых телопептидов, образующихся при деградации зрелого коллагена I типа, уровень остеокальцина и костного изофермента щелочной фосфатазы, провоспалительных: ФНО-α, Il-1β, Il-6 и противовоспалительных: Il-4 и Il-10 сывороточных цитокинов. Методом лазерной проточной цитофлюориметрии на цитометре FACS Canto II (BD, США) было проведено типирование лимфоцитов периферической крови с определением числа Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток (естественных киллеров), участвующих в координации и осуществлении иммунного ответа, в том числе за счет цитокинопосредованных механизмов. Определение субпопуляционного состава клеток периферической крови осуществляли с использованием набора BD Multitest 6-Color TBNK Reagent (BD, США). Группу контроля составили 20 практически здоровых лиц. Статистическую обработку

полученного материала проводили с предварительным определением размера выборки на основании анализа мощности по O'Brien с использованием «UnifyPow» в «SAS macro». Статистически достоверными различия считали при показателе вероятности $p<0,05$ («Medstat»), проведенном после определения нормальности распределения вариационных рядов по Колмогорову-Смирнову.

Результаты. При оценке маркеров костного метаболизма были выявлены признаки разобщения процессов ремоделирования в виде снижения активности костеобразования на фоне активной костной резорбции, что подтверждалось существенным ($p<0,05$) повышением содержания фрагментов коллагена 1 типа у пациентов с остеопеническим синдромом по сравнению с нормальными показателями (0,484±0,060 нг/мл) (0,430±0,037 нг/мл), снижением ($p<0,05$) концентрации остеокальцина, основного неколлагенового белка кости до (14,48±1,56 нг/мл) по сравнению с нормальными показателями (23,26±2,78 нг/мл).

Кроме того, у пациентов с остеопеническим синдромом (по данным рентгеновской абсорбциометрии) и остеоартрозом по сравнению со здоровыми лицами в дооперационном периоде выявлены признаки активизации провоспалительного звена гуморального иммунитета, что нашло свое отражение в повышении концентрации в сыворотке крови ФНО-α (4,4±0,5 (пг/мл) и (3,0±0,2 (пг/мл)), Il-1β (6,8±0,5 (пг/мл)) и (4,9±0,4 (пг/мл)), Il-6 (5,8±0,6 (пг/мл)) и (2,7±0,3 (пг/мл)), соответственно. В то же время, отмечалось снижение содержания противовоспалительных цитокинов, достигавшее со стороны Il-10 статистически значимых показателей. В то же время у данной категории пациентов наблюдалось снижение как абсолютного, так и относительного содержания Т-лимфоцитов за счет популяции Т-супрессоров, определяемых по ($CD3^+$ $CD8^+$) и увеличение популяции Т-хелперов, определяемых по ($CD3^+CD4^+$) [3]. Каких-либо существенных различий в содержании В-лимфоцитов не наблюдали. Таким образом, несмотря на увеличение содержания Т-хелперов у пациентов с остеопеническим синдромом на фоне ОА, снижение уровня противовоспалительных цитокинов свидетельствовало об их функциональной недостаточности. Полученные данные можно расценить как вариант пролонгированной вторичной иммунологической реакции на последствия разрушения тканей пораженных суставов.

Спустя 3 месяца после проведения оперативного вмешательства МПКТ пациентов не отличалась от исходной, что обусловлено недостаточным резервом времени, необходимого для получения анатомических результатов при изменении костного метаболизма, регистрируемых при использовании рентгеновской абсорбциометрии [4]. При изучении показателей гуморального иммунитета отмечали некоторое снижение активности провоспалительных цитокинов и увеличение активности противовоспалительных цитокинов, однако статистически значимых различий с дооперационным периодом достигнуто не было. Субпопуляционный состав лимфоцитов характеризовался незначительным снижением числа Т-супрессоров, уровень Т-хелперов оставалось повышенным. Статистически значимых изменений со стороны маркеров метаболизма костной ткани не отмечали, несмотря на отчетливую тенденцию к активизации процессов костеобразования.

Таким образом, у пациентов через 3 месяца после ТЭП сохранялись признаки иммунодепрессии с дисбалансом про- и противовоспалительного звена иммунитета и некоторым снижением остеобластического потенциала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Показатели иммунитета у пациентов с асептической нестабильностью коленного сустава / М. В. Чепелева, О. К. Чегуров, Е. И. Кузнецов и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – № 8. – С. 18-21.
2. Цитокинопосредованные особенности метаболического состояния костной ткани при эндопротезировании крупных суставов у больных остеартрозом / Е. В. Карякина, Е. В. Гладкова, А. С. Федонников и др. // В книге: XI конгресс Российского артроскопического общества, посвященный 130-летию со дня рождения академика Н. Н. Приорова. Москва. – 2015. – С. 45-46.
3. Мамонова И. А., Пучиньян Д. М., Гладкова Е. В. Особенности клеточного иммунитета у больных с коксартрозом / И. А. Мамонова, Д. М. Пучиньян, Е. В. Гладкова //Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – № S. – С. 337-338.
4. Система лабораторно-инструментальной оценки состояния метаболизма костной ткани / Е. В. Гладкова, А. С. Федонников, Е. Е. Царева и др. // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1-5. – С. 925-928.

THE CHARACTERISTICS OF CELLULAR IMMUNITY INDEXES IN OSTEOPENIC AND OSTEOPOROTIC PATIENTS IN THE PRESENCE OF OSTEOARTHROSIS

Gladkova E.V., Mamonova I.A., Karyakina E.V., Puchin'yan D.M., Babushkina I.V., Romakina N.A., Belova S.V.

Federal Government-Financed Institution «Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics» of Ministry of Public Health of the Russian Federation, Saratov, Russia

Cytokines in blood serum, pattern of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and metabolic markers of bone tissue were studied in osteopenic and osteoporotic patients presurgically and 3 months after total hip replacement. There were some singular signs of immunodepression revealed preserving 3 months postsurgically and having negative effect on bone tissue remodelling.

Keywords: cellular immunity, osteopenic, osteoporotic, osteoarthrosis.

ПОЛУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ АКТИВИРОВАННЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОМУ АНТИГЕНУ HER2/neu

Кузнецова М.С., Лопатникова Ю.А., Максютов А.З., Куликова Е.В., Хантакова Ю.Н., Сенников С.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Разработан протокол получения чистых популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухолевого белка HER2/neu. Показан высокий цитотоксический эффект полученных клеток в отношении клеток линии MCF-7, по сравнению с общей фракцией активированных мононуклеаров.

Ключевые слова: цитотоксические Т-лимфоциты, антигенспецифические клетки, дендритные клетки, HER2/neu, стимуляция противоопухолевого иммунного ответа.

Минимальная опухолевая нагрузка, сохраняющаяся после удаления основной части злокачественного новообразования, лежит в основе существующей проблемы рецидивов опухолей и развития метастазов, приводящих к увеличению уровня смертности и инвалидизации среди онкологических пациентов. Фундаментальные и клинические исследования последних лет подтверждают эффективность использования потенциала иммунной системы для устранения опухолевых клеток, диссеминированных в организме пациента [1].

Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) на сегодняшний день считаются основными эффекторами в реализации противоопухолевого клеточного иммунитета. В большинстве исследований для активации противоопухолевых ЦТЛ используют дендритные клетки (ДК), поскольку ДК способны наиболее эффективно распознавать и представлять опухолевые антигены Т-лимфоцитам в условиях *in vitro* и *in vivo* [2,3,4]. Развитие методов обнаружения антигенспецифических Т-лимфоцитов позволило обосновать новые подходы к стимуляции специфического иммунного ответа. На сегодняшний день стало возможным выделение ЦТЛ, специфичных к определенным антигенным детерминантам, из смешанных

популяций мононуклеарных клеток, что позволяет направлять специфический клеточный иммунный ответ против клеток, несущих определенные антигены. Таким образом, создание технологии получения популяций противоопухолевых антигенспецифических ЦТЛ с использованием ДК и технологии выделения антигенспецифических клеток представляется перспективным для получения на её основе Т-клеточных препаратов для адаптивного переноса пациентам с целью устранения опухолевых клеток.

Цель исследования – получение популяций антигенспецифических ЦТЛ и оценка их цитотоксического эффекта по отношению к опухолевой линии MCF-7.

Материалы и методы. Объектом исследования являются мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) условно здоровых доноров, HLA A02-позитивных по генотипу. Незрелые дендритные клетки получали из прилипающей фракции МНК ПК культивированием в присутствии цитокинов ГМ-КСФ и ИЛ-4. Созревание ДК стимулировали добавлением ФНО-α в культуру незрелых ДК. Для антигенной активации зрелых ДК опухоль-ассоциированным антигеном HER2/neu использовался метод магнитной трансфекции ДНК-конструкцией pMax, кодирующей эпитопы белка HER2/neu (эпитопы KIFGSLAFL, RLLQETELV). Анализ содержания антигенспецифических клеток проводился методом проточной цитометрии. Выделение антигенспецифических Т-лимфоцитов проводилось методом обратимого окрашивания клеток антигенспецифическими реагентами – тетрамерами,– и магнитной сортировки Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам KIFGSLAFL и RLLQETELV белка HER2/neu на сепараторе MiniMacs. Для стимуляции пролиферативной активности и повышения жизнеспособности HER2/neu-специфичных Т-лимфоцитов выделенные популяции антигенспецифических клеток культивировали в присутствии коктейля цитокинов IL-2, IL-7, IL-15 в конечной концентрации 50нг/мл для каждого цитокина. Для оценки цитотоксического эффекта полученных популяций производилось совместное культивирование HER2/neu-специфичных Т-лимфоцитов с клетками опухолевой линии MCF-7, прижизненно меченными CFSE, в 10:1 соотношении Т-лимфоцитов к опухолевым клеткам. Для обнаружения клеток с поврежденной мембраной совместная культура метилась иодидом пропидия (PI). Цитотоксическая активность HER2/neu-специфичных ЦТЛ против опухолевых клеток оценивалась с помощью проточной цитометрии по проценту PI-позитивных опухолевых клеток.

Результаты. Разработан протокол получения HER2/neu-специфичных Т-лимфоцитов, включающий стадии получения зрелых ДК из МНК ПК, магнитной трансфекции зрелых ДК ДНК-конструкцией, сокультивирования антиген-активированных ДК с аутологичными лимфоцитами, магнитной сепарации ЦТЛ, специфичных к эпитопам HER2/neu и стимуляции выделенных ЦТЛ цитокинами (ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15). Полученные популяции ЦТЛ содержат более 90 % $CD8^+$ клеток, доля HER2/neu-специфичных клеток в 14-дневной культуре выделенных ЦТЛ составляет более 75 %. Анализ цитотоксичности HER2/neu-специфических Т-клеток показал достоверно более высокий уровень цитотоксического эффекта в отношении клеточной линии MCF-7, по сравнению с цитотоксичностью общей фракции активированных МНК (49,3 % поврежденных опухолевых клеток против 22,3 %).

Заключение. Разработанная технология позволяет получать популяции HER2/neu-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, способных оказывать выраженный цитотоксический эффект на клетки опухолевой линии MCF-7. Описанный протокол может быть использован в дальнейшем для создания на его основе клеточной вакцины, направленной на устранение опухолевых клеток для предотвращения распространения метастазов и предупреждения рецидивов после удаления основной опухолевой нагрузки у пациентов с HER2/neu-гиперэкспрессирующими опухолями.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (Соглашение № 14.607.21.0043).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palucka K., Ueno H., Banchereau J. Recent developments in cancer vaccines / K. Palucka, H. Ueno, J. Banchereau // The journal of immunology.– 2011.– V. 186, № 3.– P. 1325-1331.
2. Effect of mature dendritic cells primed with autologous tumor antigens from patients with epithelial ovarian cancer on stimulation of the cytotoxic im-

mune response in culture of mononuclear cells / I. A. Obleukhova, V. V. Kurilin, M. A. Goncharov et al. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine.– 2013.– V.156, № 1.– P. 161-164.
3. Dendritic cells transfected with a DNA construct encoding tumor-associated antigen epitopes induce a cytotoxic immune response against autologous tumor cells in a culture of mononuclear cells from colorectal cancer patients / E. V. Kulikova, V. V. Kurilin, J. A. Shevchenko et al. // Scandinavian Journal of Immunology.– 2015.– V. 82, № 2.– P. 110-117.
4. Radford K. J., Tullett K. M., Lahoud M. H. Dendritic cells and cancer immunotherapy / K. J. Radford, K. M. Tullett, M. H. Lahoud // Current Opinion in Immunology.– 2014.– V. 27.– P. 26-32.

OBTAINING OF ACTIVATED ANTITUMOR CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTES POPULATIONS SPECIFIC TO TUMOR-ASSOCIATED ANTIGEN HER2/neu

Kuznetsova M. S., Lopatnikova J. A., Maksyutov A. Z., Kulikova E. V., Khantakova J. N., Sennikov S. V.

FSBSI "Research Institute Of fundamental and clinical Immunology", Novosibirsk, Russia

A protocol of obtaining pure populations of cytotoxic T lymphocytes specific for tumor protein HER 2/neu epitopes has been developed. High cytotoxic effect of obtained cells against cell line MCF-7 has been showed compared to the total fraction of activated mononuclear cells.

Keywords: cytotoxic T lymphocytes, antigen-specific cells, dendritic cells, HER2/neu, stimulation of antitumor immune response.

ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ ФРАКЦИЙ АУТОАНТИТЕЛ ПОДКЛАССОВ ИММУНОГЛОБУЛИНА G К ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ

Киреев Ф. Д., Лопатникова Ю. А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Аутоантитела к цитокинам являются важными эффекторными молекулами, регулирующими их биологическую активность. Целью работы была разработка протоколов выделения фракций подклассов IgG аутоантител к фактору некроза опухоли. Разработан протокол получения фракций подклассов IgG аутоантител к фактору некроза опухоли, включающий комбинацию гель-фильтрации, позитивной и негативной аффинной хроматографии и ультрацентрифугирование на фильтрах по молекулярной массе. Проведено выделение подклассов IgG аутоантител к фактору некроза опухоли из препарата иммуноглобулина человека, что в дальнейшем позволит оценить их влияние на биологическую активность фактора некроза опухоли.

Ключевые слова: аутоантитела, подклассы IgG, хроматография, фактор некроза опухоли.

Важное значение в регуляции биологической активности цитокинов в норме и при патологии придаётся аутоантителам, специфичных к различным цитокинам, в том числе, и к фактору некроза опухоли (TNF) [1]. Было показано участие аутоантител к TNF в патогенезе ревматоидного артрита и бронхиальной астмы [2]. Полученные данные свидетельствуют, что различные подклассы IgG могут участвовать в патогенезе этих заболеваний

и, вероятно, обладают разной активностью в отношении медиатора. Однако, данные выводы сделаны на основе содержания подклассов при различных стадиях заболеваний и требуют оценить их влияние на биологическую активность TNF, для чего необходимо получить фракции подклассов IgG анти-TNF аутоантител. Сведения о подходах к очистке подклассов IgG в литературе скудны. Известно, что вследствие низкой аффинности IgG3 к Protein A возможно отделить его от трех других подклассов [3]. В других работах для выделения фракций подклассов IgG использовали комбинацию позитивной и негативной аффинной хроматографии на сорбентах, полученных при связывании подкласс-специфических моноклональных антител с сефарозой [4].

Цель работы. Разработать метод выделения отдельных подклассов аутоантител к фактору некроза опухоли с помощью комплекса методов хроматографии.

Материалы и методы. В качестве источника иммуноглобулинов был использован препарат «Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для внутривенного введения» (ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия). Перенос иммуноглобулинов в буферный раствор проводили хроматографией на сорбенте Bio-Gel P6 DG (Bio-Rad, США). Для выделения IgG использовали сорбент Protein G Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Швеция). Для выделения IgG3 проводили 1 цикл негативной аффинной хроматографии IgG на колонке HiTrap Protein A HP 1 ml (GE Healthcare, Швеция) с аффинным сорбентом Protein A Sepharose High Performance (HP). Элюат представлял собой смесь антител подклассов IgG1, IgG2 и IgG4. Для выделения иммуноглобулинов подклассов IgG1 и IgG2 проводили негативную аффинную хроматографию элюата: 5 циклов на колонке с сорбентом анти-IgG2-Sepharose 4B и 7 циклов – с анти-IgG1-Sepharose 4B, соответственно. Для удаления примеси IgG4 использовали колонку с аффинным сорбентом анти-IgG4-Sepharose 4B. Для очистки получаемых фракций подклассов IgG от примеси TNF был использован метод ультрацентрифугирования на фильтрах Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Merck Millipore, Ирландия) в буфере glycine-HCl, pH 2,5, при 6000 g. Выделение аутоантител к TNF проводили с использованием сорбента Affi-Gel 15 (Bio-Rad, США), связанного с рекомбинантным человеческим TNF. Оценку чистоты выделенных подклассов IgG, примеси TNF и содержания подклассов иммуноглобулина IgG во фракции специфических антител к TNF проводили методами иммуноферментного анализа (ИФА).

Результаты. Для получения фракций подклассов аутоантител к TNF из препарата иммуноглобулина разработаны протоколы, включающие гель-фильтрацию, позитивную и негативную аффинную хроматографию и ультрацентрифугирование по молекулярной массе. Перенос белков препарата иммуноглобулина в буфер, необходимый для дальнейших процедур аффинной очистки антител, был проведён с помощью колонки с сорбентом Bio-Gel P6 DG. Высокомолекулярные фракции, собранные с этой колонки, наносили на колонку с сорбентом Protein G Sepharose Fast Flow. 30 мг выделенного на этой колонке IgG использовали для разделения IgG3 от остальных подклассов. Чистая фракция IgG3 была получена из общего IgG за 1 цикл хроматографии на колонке HiTrap Protein A HP 1 ml, содержащей сорбент Protein A Sepharose HP. В целевой фракции содержание IgG3 составило 0,058 мг/мл. Чистая фракция IgG1 была получена из элюированной фракции с колонки Protein A HP 1 ml за 5 циклов хроматографии на колонке с сорбентом анти-IgG2-Sepharose 4B и 1 цикл хроматографии на колонке с сорбентом анти-IgG4-Sepharose 4B. В целевой фракции содержание IgG1 составило 43 мкг/мл, примеси других подклассов отсутствовали. Чистая фракция IgG2 была получена из элюированной фракции с колонки Protein A HP 1 ml за 7 циклов хроматографии на колонке с сорбентом анти-IgG1-Sepharose 4B и 1 цикл хроматографии на колонке с сорбентом анти-IgG4-Sepharose 4B. В целевой фракции содержание IgG2 составило 36 мкг/мл, примеси других подклассов отсутствовали. Далее было проведено удаление из фракций подклассов IgG аутоантигенов, находящихся в комплексе с аутоантителами. С этой целью использовали кислый буфер (pH 2,5) для диссоциации иммунных комплексов и центрифугирование на фильтре с мембраной, имеющей размер пор, соответствующий молекулам массой 100 kDa. Выделение специфических антител к TNF из полученных фракций подклассов IgG было проведено на колонке с сорбентом Affi-Gel 15–TNF. Содержание соответствующих подклассов во фракциях антител к TNF составило: IgG1 – 500 нг/мл, IgG2 – 100 нг/мл, IgG3 – 150 нг/мл.

Выводы. В данной работе нами разработан протокол получения фракций подклассов IgG аутоантител к TNF, что позволит эффективно исследовать биологические эффекты этих антител в норме и при различных патологиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: Pathogenesis and mechanisms / M. Watanabe, K. Uchida, K. Nakagaki et al. // Cytokine & Growth Factor Reviews.– 2010.– V. 21(4).– P. 263-273.
2. Голикова Е. А. Аутоантитела к фактору некроза опухоли при ревматоидном артрите и бронхиальной астме: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук (14.03.09) / Голикова Елена Алексеевна.– Новосибирск, 2013.– 20 с.
3. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis / I. V. Nikolayenko, O. Yu. Galkin, N. I. Grabchenko et al. // Ukrainica Bioorganica Acta.– 2005.– V.2.– P. 3-11.
4. The separation of human serum IgG into subclass fractions by immunoaffinity chromatography and assessment of specific antibody activity / P. Bird, J. Lowe, R. P. Stokes et al. // J Immunol Methods.– 1984.– V.71(1).– P. 97-105.

PURIFICATION OF IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES AUTOANTIBODIES TO TUMOR NECROSIS FACTOR

Kireev F. D., Lopatnikova J. A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

Autoantibodies to cytokines are important biological effector molecules regulating cytokine activities. The aim of the study was to develop a protocol to purify immunoglobulin G subclasses autoantibodies to tumor necrosis factor. The proposed protocol is a combination of gel filtration, positive and negative affinity chromatography and ultracentrifugation depending on molecular mass. Purification of immunoglobulin G subclasses autoantibodies to tumor necrosis factor from commercial intravenous immunoglobulin was performed. This will enable to evaluate their effects on tumor necrosis factor biological activity.

Keywords: autoantibodies, IgG subclasses, chromatography, tumor necrosis factor.

МИГРАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ

Силков А. Н., Мелентьев В. С., Фалалеева С. А., Максютов Р. А.[1], Куликова Е. В., Сенников С. В.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии; [1]ФГБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск, Россия

В работе проведено исследование миграционной активности макрофагов в различные органы мышей в норме и при индукции острого воспаления печени. У интактных животных донорские моноциты/макрофаги были выявлены в селезенке (0,7±0,08 % всех клеток) и периферической крови (0,25±0,04 %) в печени выявлены единичные клетки. У животных с индукцией воспаления в печени донорские клетки составили 0,22±0,02 %, в селезенке 0,05±0,01 % и в периферической крови 0,02±0,01 %.

Ключевые слова: целевая доставка, моноциты/макрофаги, клеточная миграция.

Одним из достижений современной терапии хронических воспалительных (аутоиммунных) заболеваний является использование биологических молекул для системного блокирования активности цитокинов. Однако системное применение блокаторов устраняет не только па-

тогенетически значимые эффекты цитокинов, но и их важные регуляторные функции, что сопряжено с развитием нежелательных эффектов. В этой связи поиск/разработка подходов целевой доставки биологически-активных молекул к местам локализованных патологических процессов является актуальной научной задачей. Возможность целевой доставки биотерапевтических препаратов в виде генетических конструкций в иммунокомпетентных клетках позволит проводить синтез терапевтических молекул самими «транспортными» клетками *in situ* [1]. В качестве системы целевой доставки перспективны моноциты/макрофаги, для которых характерна активная миграция в очаги локального воспаления и участие в его регуляции [2].

Цель исследований – экспериментальное обоснование использования иммуноактивных клеток для целевой доставки векторов, экспрессирующих естественные регуляторные белки.

Материалы и методы. ***Животные.*** В работе использовано 30 самок мышей линии С 57BL/6. Животные содержались в виварии НИИФКИ на стандартном рационе при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище.

Получение моноцитов/макрофагов проводили из клеток костного мозга (КМ). Клетки культивировали в полной среде RPMI1640 (Биолот, Россия) с добавлением 20нг/мл рекомбинантного мышиного M-CSF (Miltenyi Biotech, Германия) в инкубаторе при 37 °С, 100 % влажности и 5 % CO2. Смену среды производили каждые 2-3 суток.

Фенотипирование моноцитов/макрофагов. Фенотипическую характеристику клеток в культуре проводили в динамике с использованием моноклональных антител к CD115, CD11b, Ly6c (BioLegend, США), меченных разными флюорофорами с последующей одновременной детекцией на проточном цитофлюориметре FACS Verse (BD, США).

Индукция острого воспаления печени у мышей. Индукцию острого воспаления в печени у мышей линии С 57BL/6 выполняли 2 методами. Первый индукцией внутривенным введением митогена конканавалин А (20 мг), второй пероральным введением 300 мг/кг ацетаминофена (парацетамола). Активность воспаления оценивали по динамике уровня печеночных ферментов АЛТ и АСТ в сыворотке крови мышей. Трансаминазы определяли с использованием соответствующих наборов Вектор-бэст (г. Новосибирск) с детекцией результатов на мультиплексном анализаторе TriStar (Bertholt Tecnology, Германия).

Окраска моноцитов/макрофагов прижизненным красителем и оценка миграции. Для оценки миграции клеток в организме животных, полученные *in vitro* моноциты/макрофаги, тотально метили интернализуемым флуоресцентным красителем Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Окрашивание CFSE проводили по методике, описанной ранее [3]. Окрашенные клетки вводили животным внутривенно в боковую вену хвоста в количестве $5*10^6$ клеток в среде RPMI 1640. Через 24 и 48 часов после инъекции животных выводили из эксперимента, получали суспензию клеток костного мозга, печени, селезенки и МНК периферической крови. На проточном цитофлюориметре оценивали число CFSE позитивных клеток в клеточных суспензиях органов при оценке не менее 10^6 событий.

Результаты. В процессе культивирования клеток костного мозга в присутствии рекомбинантного M-CSF уже к 3 суткам наблюдается увеличение процента $CD11b^+$ моноцитов/макрофагов с 10 до 20 %. К 10 суткам селекции этот показатель составлял в среднем 80 %. При этом доля клеток, несущих общий маркер миелоидных клеток Ly-6c, снижалась с 40 % в начале культивирования до 3,5 % к десятым суткам.

Оба исследованных способа индукции острого воспаления печени показали сходную динамику изменения сывороточного уровня трансаминаз. Повышение трансаминаз детектируется через 2 часа после индукции с пиком на 8 часов и снижением до нормативных значений к 48 часам.

Для оценки миграции меченные CFSE макрофаги вводили внутривенно и через 24 часа определяли их число в периферической крови, костном мозге, печени и селезенке реципиентов. У интактных животных донорские макрофаги были выявлены преимущественно в селезенке, в среднем 70 донорских клеток на 10000 клеток органа (0,7±0,08 %). В селезенке животных экспериментальной группы выявлялось в среднем 5 донорских макрофагов на 10000 спленоцитов (0,05±0,01 %). В периферической крови интактных животных определялось 25 донорских клеток на 10000 мононуклеарных клеток крови (0,25±0,04 %), а у животных с индукцией воспаления число донорских макрофагов было на

порядок меньшим, 2 донорских макрофага на 10000 мононуклеаров (0,02±0,01 %). В печени интактных животных выявлялись единичные донорские макрофаги, 1-2 на 10000 клеток органа, а у животных с индукцией печеночного воспаления в среднем было по 22 донорских макрофага на 10000 клеток печени (0,22±0,02 %).

В модели острого воспаления печени введенные макрофаги мигрируют преимущественно в пораженный орган, в отличие от интактных животных, у которых выявляется депонирование донорских клеток в селезенке. Это подтверждает потенциал макрофагов для использования в качестве средства целевой доставки терапевтических препаратов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ грант 15-29-01120 офи_м.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. mRNA-engineered mesenchymal stem cells for targeted delivery of interleukin-10 to sites of inflammation / O. Levy, W. Zhao, L. J. Mortensen et al. // Blood.– 2013.– V. 122, № 14.– P. 23-32.
2. Active Targeted Macrophage-mediated Delivery of Catalase to Affected Brain Regions in Models of Parkinson's Disease / Y. Zhao, M. J. Haney, V. Mahajan et al. // J Nanomed Nanotechnol.– 2011.– S. 4.– P. 003.
3. Parish C. R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies / C. R. Parish // Immunol Cell Biol.– 1999,– V. 77, № 6.– P. 499-508.

MIGRATION ACTIVITY OF MACROPHAGES AT THE INTRAVENOUS INJECTION

Silkov A. N., Melent'ev V.S., Falaleeva S. A., Maksyutov R. A.[1], Kulikova E. V., Sennikov S. V.

Research Institute for Fundamental and Clinical Immunology; [1]State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk, Russia

The migration activity of macrophage was studied in various organs of mice in normal and after induction of acute liver inflammation. In intact animals donor monocytes/macrophages were detected in the spleen (0,7 ± 0,08 % of all cells) and peripheral blood (0,25 ± 0,04 %) in the liver were identified single cells. Donor cells were presented into the animals with induced inflammation in the liver 0,22 ± 0,02 %, in the spleen 0.05 ± 0.01 % and in peripheral blood 0,02 ± 0,01 %.

Keywords: targeted delivery, monocytes / macrophages, cell migration.

СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОКОМПЕТЕТНЫХ КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМИ СОЧЕТАНИЯМИ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ 1 И 2 ТИПА К TNF-АЛЬФА В СУБПОПУЛЯЦИЯХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ УСЛОВНО-ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Альшевская А. А., Беломестнова И. А., Кузнецова М. С.

ФГБНУ "Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии", Новосибирск, Россия

Работа посвящена изучению распределения рецепторов 1 и 2 типа к провоспалительному цитокину TNFα в субпопуляциях иммунокомпетентных клеток периферической крови. В результате исследования было установлено, что Т-лимфоциты, В-лимфоциты и моноциты отличаются как по содержанию клеток с разными комбинациями мембраносвязанных рецепторов к TNFα, так и по стабильности экспрессии рецепторов на клеточной мембране при культивировании.

Ключевые слова: рецепторы к цитокинам, фактор некроза опухоли альфа, субпопуляции иммунокомпетентных клеток, сочетанная экспрессия рецепторов.

Система цитокинов как медиаторов межклеточного взаимодействия играет важнейшую роль на всех этапах развития иммунопатологических реакций. Однако, биологические эффекты цитокинов на таргетные клетки во многом зависят не только от стандартно измеряемых уровней сывороточных медиаторов и растворимых рецепторов, но и от уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов на поверхности клеток [1, 2]. Для TNFα показано существование двух типов мембраносвязанных рецепторов, имеющих как сходства, так и различия в строении и сигнальных путях. Рецепторы TNFα 1 типа экспрессируются почти всеми типами клеток и, помимо воспалительных эффектов, способны обеспечивать TNFα-индуцированный апоптоз, в то время как рецепторы TNFα 2 типа экспрессируются преимущественно клетками крови, лимфоидными и эпителиальными клетками и участвуют в реализации пролиферативных процессов. Изменение количества рецепторов 1 и 2 типа к TNFα на клетках показано при патологических состояниях [3]. Баланс рецепторов разных типов на клетке может оказаться критичным для переключения между типом ответа клетки на медиатор [4], а при изменении соотношения между клетками с различными комбинациями экспрессируемых рецепторов в субпопуляции может являться одним из механизмов, способствующих нетипичным формам взаимодействия рецептор-цитокин (например, обратная сигнализация). В связи с этим, представляется важным и актуальным изучение содержания иммунокомпетентных клеток с различными сочетаниями экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNFα в субпопуляциях периферической крови.

Цель работы. Оценить соотношение клеток с разными комбинациями мембраносвязанных рецепторов 1 и 2 типа к TNFα в субпопуляциях иммунокомпетентных клеток и стабильность их экспрессии в культуре.

Материалы и методы. Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли стандартно из венозной крови условно-здоровых доноров путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина. Уровень экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNFα на Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и моноцитах определялся оптимизированным протоколом [5] с использованием моноклональных антител TNFR1-PE, TNFR2-APC (R&D systems, USA), CD19-PerCP, CD3-FITC (Biolegend, USA), CD14-V450 (BD, USA). Сортировка клеток с различной комбинацией экспрессии 1 и 2 типов рецепторов к TNFα была выполнена методом проточной сортировки (FacsAria I, BD, USA) Культивирование отсортированных фракций проводилось в течение 72 ч в условиях 37°C и 5 % CO_2.

Результаты. Был оптимизирован протокол проточной сортировки для выделения 4 субпопуляций клеток: $TNFR1^+TNFR2^-$, $TNFR1^+TNFR2^+$, $TNFR1^-TNFR2^+$, $TNFR1^-TNFR2^-$. Среднее процентное содержание данных субпопуляций среди интактных клеток составляло соответственно: 10,3 %, 2,03 %, 10,13 %, 77,8 % (для В-клеток), 13,0 %, 1,94 %, 8,06 %, 77,0 % (для Т-клеток), 39,24 %, 43,48 %, 6,6 %, 10,68 % (для моноцитов). Было установлено, что отсортированные Т-лимфоциты, изначально имевшие высокий уровень экспрессии TNFR2, сохраняют его и после 72-часового культивирования; в культуре клеток Т-лимфоцитов, не экспрессирующих TNFR2, после культивации не более 2 % клеток начинают экспрессировать рецептор 2 типа. Среди популяций моноцитов выявляется наибольшее количество дубль-позитивных клеток $TNFR1^+TNFR2^+$ (43,48 % клеток), а также среди моноцитов более высокий процент клеток (39,24 %), несущих на своей поверхности только TNFR1. Т-лимфоциты и В-лимфоциты демонстрируют схожее распределение рецепторов внутри субпопуляций, с существенно меньшим содержанием дубль-позитивных клеток (2,03 % и 1,94 % соответственно).

Заключение. Таким образом, результаты показали, что три основные субпопуляции иммунокомпетентных клеток отличаются по коэкспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNFα. При этом для Т-лимфоцитов уровень экспрессии рецепторов к TNFα остается стабильным в течение 72 ч культивирования отсортированных фракций.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00783 (мол-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes / L. Conti, M. Cardone, B. Varano et al. // Eur J Immunol. – 2008. – V. 38(3). – P. 750-762.

2. Influence of type-I Interferon receptor expression level on the response to type-I Interferons in human pancreatic cancer cells / S. Booy, C.H. van Eijck et al. // J Cell Mol Med.– 2014.– V. 18(3).– P. 492-502.
3. Expression of TNFα membrane-bound receptors in the peripheral blood mononuclear cells (PMBC) in rheumatoid arthritis patients / S. V. Sennikov, A. A. Alshevskaya, N. S. Shkaruba et al. // Cytokine.– 2015.– V. 73(2).– P. 288-294.
4. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R 2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R 1-dependent activation of caspase-8 / M. Fotin-Mleczek, F. Henkler, D. Samel et al. // J Cell Sci.– 2002.– V. 115(Pt 13).– P. 2757-2770.
5. Quantitative flow cytometric analysis of expression of tumor necrosis factor receptor types I and II on mononuclear cells / J. A. Lopatnikova, F. F. Vasilyev, A. A. Alshevskaya et al. // J Recept Signal Transduct Res.– 2013.– V. 33(1).– P. 49-55.

CONTENT OF IMMUNOCOMPETENT CELLS WITH DIFFERENT CO-EXPRESSION COMBINATION OF RECEPTORS TYPE 1 AND 2 TO TNF-ALPHA IN PERIPHERAL BLOOD CELL SUBSETS OF HEALTHY DONORS

Alshevskaya A. A., Belomestnova I. A., Kuznetsova M. S.

FSBSI "Research Institute Of fundamental and clinical Immunology", Novosibirsk, Russia

Distribution of receptor types 1 and 2 to pro-inflammatory cytokine TNFα by immunocompetent cell subsets of peripheral blood was studied. T-cells, B-cells and monocytes were found to differ in content of cells with different combinations of membrane-bound receptors to TNFα and in expression stability of receptors on cell membrane during cultivation.

Keywords: cytokine receptors, tumor necrosis factor alpha, immunocompetent cell subsets, receptors co-expression.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ИНДЕКСОВ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Бусырев Ю. Б., Карпунина Т. И.

ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера, Пермь, Россия

В ходе проведенных исследований установлена перспективность оценки лейкоцитарного и ядерного индексов, а также индексов отношения лимфоцитов и нейтрофилов к моноцитам для дифференциальной диагностики этиологии механической желтухи.

Ключевые слова: лейкоцитарные индексы, механическая желтуха.

Разнообразные по своей патогенетической сути заболевания гепатобилиарной системы и поджелудочной железы сопровождаются развитием механической непроходимости на различных уровнях желчных протоков. Это состояние, проявляющееся желтушной окраской кожи и склер пациента, объединяется единым понятием «механическая желтуха». Обтурационная желтуха – сложный симптомокомплекс, который возникает в результате механического препятствия оттоку желчи вследствие стриктуры, сдавления или закупорки желчных путей, что значительно утяжеляет состояние больного и нередко осложняет

лечение основного заболевания. Чем раньше выявлен характер патологического процесса и выполнено рациональное пособие, тем лучше и результат лечения [1]. В последнее время при необходимости экстренной оценки состояния пациентов и прогнозирования его развития предлагается использовать различные лейкоцитарные индексы [2, 3, 4, 5].

В этой связи **целью** выполненного исследования послужил сравнительный анализ показателей некоторых из них при механической желтухе различного генеза.

Материалы и методы. В работе проанализированы данные 29 больных с механической желтухой различного генеза, в том числе 1 группа (12 человек) – с опухолевыми заболеваниями гепатопанкреатодуоденальной зоны без холангита; 2 группа (9 человек) – различные заболевания с доброкачественной обтурацией протоков в сочетании с холангитом; 3 группа (8 человек) – доброкачественная обтурация протоков без холангита.

Исследование периферической крови проведено традиционными методами. На основе лейкограммы рассчитывали интегральные гематологические показатели, выражая их в условных единицах, взяв за основу методические подходы Мустафиной Ж. Г. и соавторов (1999).

Сравнительный анализ полученных данных выполняли с помощью пакета прикладной программы «Statistica-6». Достоверность различий между группами оценивали с учётом непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение. Роль лейкоцитов в сохранении гомеостаза в организме человека не вызывает сомнений. Лейкоцитарные индексы, в которых использованы параметры лейкограммы, считаются показателями, характеризующими степень выраженности эндогенной интоксикации. Установлено, что они имеют диагностическое и прогностическое значение, так как позволяют оценить работу эффекторных механизмов иммунной системы, а также уровень иммунологической реактивности [5].

В качестве показателей, характеризующих неблагополучие в эндосреде организма пациентов с механической желтухой, мы рассчитали следующие лейкоцитарные индексы:

1. Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ), характеризующий соотношение уровня нейтрофилов (палочкоядерных + сегментоядерных) и суммы лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов. ЛИИ отражает активность процессов фагоцитоза и пролиферации нейтрофилов. Уровень ЛИИ практически совпадал в группах наблюдений, составляя соответственно 2,57±0,83; 2,55±0,84 и 2,75±0,49 ($p>0,05$).

2. Индекс Кребса (ИК), представляющий собой отношение общего количества нейтрофилов к лимфоцитам. Этот показатель косвенно характеризует, во-первых, активность фагоцитарных реакций и факторов специфического иммунитета, во-вторых, их участие в поддержании общей реактивности организма. ИК в 1-й группе составил 4,4±1,04; во 2-й – 4,7±1,89 и в 3-й – 5,8±2,66. Достоверно различались его показатели у пациентов 1-й и 2-й групп ($p=0,041$), а также 1-й и 3-й ($p=0,047$). Различия ИК во 2-й и 3-й группах, как и всех других индексов, оказались статистически незначимыми ($p<0,05$).

3. Ядерный индекс Г. Д. Даштаянца (ЯИ) – это отношение общего количества моноцитов и палочкоядерных нейтрофилов к уровню сегментоядерных нейтрофилов. Индекс характеризует скорость регенерации нейтрофилов и моноцитов, а также продолжительность их циркуляции в кровяном русле. Величина ЯИ в 1-й группе составила 0,11±0,045 и была значительно меньше по сравнению со 2-й (0,28±0,201; $p=0,0007$) и с 3-й (0,23±0,117; $p=0,025$) группами.

4. Лейкоцитарный индекс (ЛИ) – это отношение количества лимфоцитов к нейтрофилам (палочкоядерные+сегментоядерные), отражает взаимоотношения гуморального и клеточного звеньев иммунной системы. Величина ЛИ в 1-й группе составила 0,35±0,212 и была значимо больше по сравнению со 2-й (0,26±0,126; $p=0,040$) и с 3-й (0,21±0,094; $p=0,047$) группами, различия между которыми оказались несущественными.

5. Индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов (ИСНМ) позволяет судить о соотношении компонентов микрофагально-макрофагальной системы. Величина ИСНМ в 1-й группе составила 20,55±19,319 и была существенно выше по сравнению со 2-й (6,80±2,790; $p=0,0024$) и с 3-й (8,67±7,217; $p=0,016$) группами.

6. Индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ) показывает баланс между этими клетками, отражая взаимоотношения аффекторного и эффекторного звеньев иммунологического процесса. Величина ИСЛМ 1-й группе составила 7,30±7,395 и была существенно выше

по сравнению со 2-й (1,72±1,181; p=0,0013) и с 3-й (3,14±2,490; p=0,012) группами.

Сравнительный анализ полученных результатов позволяет констатировать следующее. Лейкоцитарный индекс интоксикации достоверно не различался в группах сравнения, отражая сопоставимый уровень эндогенной интоксикации у всех пациентов. Индекс Кребса оказался наименьшим в 1-й группе и, хотя различия с показателями ИК во 2-й и 3-й группах были статистически значимыми, их выраженность не дает повода рассматривать этот параметр в качестве маркера того или иного фактора, обусловившего обтурацию. Напротив, величины ЛИ, ИСНМ и ИСЛМ у пациентов с новообразованиями превышали аналогичные показатели в группах сравнения, а ЯИ у них был существенно снижен. Специфичность рассматриваемых показателей при разной этиологии механической желтухи, а также их значение для дифференциальной диагностики причин ее развития и прогностической оценки состояния больного требует дальнейшего исследования. Между тем наш опыт позволяет говорить о перспективности такого подхода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаев А.Г. Госпитальная хирургия. Синдромология: учеб. пособие/под ред. Н.О. Миланова, Ю.В. Бирюкова, Г.В. Синявина.– Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013.– 440 с.
2. Никитина В.А. Использование лейкоцитарных индексов в качестве маркеров для диагностики эндогенной интоксикации у пациентов с механической желтухой//http://medicinarf.ru/public/11531/(Дата обращения 23.04.2016).
3. Prognostic significance of neutrophil to lymphocyte ratio in pancreatic cancer: A meta-analysis /J.J.Yang, Z.G. Hu, W.X. Shi et al. //World J Gastroenterol.– 2015.– Vol. 21(9).– P. 2807-2815.
4. How obesity affects the neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratio, systemic immune-inflammatory index and platelet indices: a retrospective study/ Y. Furuncuoğlu, S. Tulgar, A. Dogan et al. // Eur Rev Med Pharmacol Sci.– 2016.– Vol. 20(7).– P. 1300-1306.
5. Интегральные лейкоцитарные индексы как критерий оценки тяжести течения эндогенной интоксикации и эффективности проводимого лечения у детей с атопическим дерматитом / Т.В. Кобец, Е.В. Гостищева, А.А. Кобец и др.// Матер. Республиканской науч.– практич. конференции. Алушта, 2012. URL: http://drcobez.narod.ru/st 025.htm (Дата обращения 23.04.2016).

COMPARATIVE EVALUATION OF LEUKOCYTE INDEXES WITH OBSTRUCTIVE JAUNDICE OF VARIOUS ORIGINS

Busyrev Y.B., Karpunina T.I.

Perm State Medical University named academician Wagner E.A., Perm, Russia

In the process of the investigations conducted, the prospects of the evaluation of leukocyte and core indexes, and also indexes of the relationship of lymphocytes and neutrophils to monocytes for the differential diagnosis of the etiology of obstructive jaundice were established.

Keywords: leucocyte indexes, obstructive jaundice.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ НАНОАНТИТЕЛ К TNF ЧЕЛОВЕКА

Василенко Е. А.[1], Мохонов В. В.[1], Горшкова Е. Н.[1], Ефимов Г. А.[1,2], Шварев Д. С.[2], Розов Ф. Н.[1,3], Тиллиб С. В.[4], Новиков Д. В.[1], Круглов А. А.[1,3], Недоспасов С. А.[1,2,3]

[1]ННГУ им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород; [2]Институт молекулярной биологии В. А. Энгельгардта РАН, Москва; [3]МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва; [4]Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Ранее сообщалось, что в некоторых моделях заболеваний макрофаги могут быть источником «патогенного» TNF, таким образом, блокирование макрофагального TNF может стать перспективной стратегией для их терапии. Целью данной работы было изучение фунциональных свойств биспецифических наноантител Bv-1, Bv-1c и Bv-1mut. Мы показали, что исследуемые белки с высокой эффективностью связывают TNF, дозы 100 нМ достаточно для обеспечения 100 % ингибирующего эффекта *in vitro*. По сравнению с системным направленное TNF-блокирование более эффективно защищает мышей от гибели в модели острой гепатотоксичности *in vivo*.

Ключевые слова: TNF, биспецифические наноантитела.

Применение антицитокиновой терапии показало высокую эффективность при лечении многих аутоиммунных заболеваний [1]. В частности, снижение уровня провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (TNF), приводит к значительному и резкому уменьшению выраженности симптомов ревматических заболеваний. С другой стороны, полное блокирование TNF, участвующего в развитии иммунного ответа и защите организма от инфекций, связано с риском развития нежелательных побочных эффектов [2]. При развитии ряда заболеваний «патогенный» цитокин может продуцироваться различными типами клеток. В частности, на мышиной модели аутоиммунного артрита было показано, что патогенным является TNF, производимый клетками макрофагально-моноцитарного ряда, а Т-клеточный TNF обеспечивает защитный эффект [3]. Кроме того, макрофаги являются основным источником патогенного TNF в случае LPS/D-GAL-индуцируемого септического шока [4]. Таким образом, возможным подходом к антицитокиновой терапии является использование специфических блокаторов TNF, которые могли бы избирательно удерживать TNF на поверхности продуцирующих его клеток, препятствуя его проникновению в кровоток и сохраняя защитные функции цитокина в остальном организме [3, 5].

Ранее на базе уникальных однодоменных антител мозоленогих (лама, верблюд) были сконструированы белки, которые могут нейтрализовать TNF, экспрессируемый макрофагами.

В данной работе исследовали следующие биспецифические наноантитела: Bv-1, способное связывать TNF человека и молекулярный поверхностный маркер макрофагов мыши F4/80 белки; Bv-1mut, в состав которого помимо домена, связывающего TNF, входит мутированная аминокислотная последовательность антител к F4/80, исключающая связывание. Кроме того, в качестве контроля использовали Bv-1c, биспецифическое наноантитело против лактоферрина и человеческого TNF. Таким образом, исходя из их структуры, Bv-1c и Bv-1mut должны связывать TNF на системном уровне, а Bv-1 – только TNF, экспрессируемый макрофагами.

Исследуемые белки были экспрессированы в штамме Rosetta 2(DE3)pLysS *E. coli* и очищены с помощью металл-хелатной хроматографии.

С помощью иммуноферментного анализа было выявлено, что пороговый уровень чувствительности исследуемых биспецифических наноантител к рекомбинантному TNF соста-

вил 5 нг/мл, что свидетельствует о высокой эффективности взаимодействия Bv-1, Bv-1c и Bv-1mut с белком-мишенью.

Для исследования блокирующих свойств биспецифических наноантител использовали цитотоксический тест *in vitro* на линии клеток WEHI 164 Cl 13, чувствительной к человеческому TNF, в ходе которого к клеткам добавляли TNF в концентрации 200ЕД и Bv-1, Bv-1c, Bv-1mut в различных дозировках. Была определена минимальная концентрация исследуемых белков, составляющая 100 нМ и обеспечивающая 100 % ингибирующий эффект.

Далее была проведена серия экспериментов *in vivo* на линии мышей huTNFKI, продуцирующих человеческий TNF [3], для определения минимальной эффективной дозы исследуемых белков в модели ЛПС/D-галактозамин-индуцированной острой гепатотоксичности. В мышах дикого типа все эти биспецифические блокаторы неактивны.

Оказалось, что Bv-1 в дозе 1,5 мкг/г веса животного полностью защищал мышей от летальной токсичности в отличие от Bv-1c и Bv-1mut, аналогичная доза которых приводила к 100 % гибели мышей.

На основании этого можно сделать вывод о том, что направленное действие на макрофагальный TNF эффективнее по сравнению с системным.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (договор № 14.Z50.31.0008 от 19 марта 2014 г.) и гранта РФФИ № 16-34-00561 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Современная антицитокиновая терапия аутоиммунных заболеваний / И. В. Астраханцева, Г. А. Ефимов, М. С. Друцкая и др. // Биохимия.– 2014.– Т. 79. № 12.– С. 1605-1616.
2. Demyelination and other neurological adverse events after anti-TNF therapy / E. Kaltsonoudis, P. V. Voulgari, S. Konitsiois et al. // Autoimmunity Reviews.–2014.– V.13.– P. 54-58.
3. Cellular sources of pathogenic and protective TNF and experimental strategies based on utilization of TNF humanized mice / C. Winsauer, A. A. Kruglov, A. A. Chashchina et al. // Cytokine Growth Factor Rev.– 2014.– V. 25.– P. 115-123.
4. Distinct and Nonredundant In Vivo Functions of TNF Produced by T Cells and Macrophages/Neutrophils: Protective and Deleterious Effects / S. Grivennikov, A. Tumanov, D. Liepinsh et al. // Immunity.– 2005.– V. 22.– P. 93-104.
5. Экспериментальные модели артрита с ФНО-зависимым патогенезом / М. С. Друцкая, Г. А. Ефимов, Р. В. Зварцев и др. // Биохимия.– 2014.– Т. 79(12).– С. 1650-1658.

EVALUATION OF THE BISPECIFIC NANOBODIES FUNCTIONAL PROPERTIES AGAINST HUMAN TNF

Vasilenko E. A.[1], Mokhonov V. V.[1], Gorshkova E. N.[1], Efimov G. A.[2], Shvarev D. S.[2], Rozov F. N.[1,3], Tillib S. V.[4], Novikov D. V.[1], Kruglov A. A.[1,3], Nedospasov S. A.[1,2,3]

[1]Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; [2]Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow; [3]Lomonosov Moscow State University, Moscow; [4] Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Previously it was reported that macrophages can be the cellular source of "pathogenic" TNF in several disease models, thus targeted TNF-blocking can be a promising strategy for their treatment. Here we studied the functional properties of bispecific nanobodies Bv-1, Bv-1c and Bv-1mut, which were expressed in E.coli, purified and characterized using ELISA, Cytotoxic assay and LPS/D-Galactosamine-induced acute hepatotoxicity model. We showed that studied proteins bind TNF with high efficiency, 100 nM of the nanobodies is sufficient to ensure the 100 % inhibitory effect in vitro and targeted TNF-blocking is more effective than systemic in protecting mice from acute hepatotoxicity in vivo.

Keywords: TNF, bispecific nanobodies.

ДИНАМИКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ ДО И ПОСЛЕ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА

Мамонова И. А., Гладкова Е. В., Пучиньян Д. М., Бабушкина И. В., Белова С. В.

ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава РФ, Саратов, Россия

Представлены результаты иммулогического обследования пациентов с коксартрозом 3-степени до и после проведения эндопротезирования. Показаны изменения клеточного иммунитета до и после проведения оперативного вмешательства. Установлено выраженное угнетение клеточного звена иммунитета у пациентов с косартрозом до проведения оперативного вмешательства. После проведения оперативного вмешательства наблюдали усугубление имеющихся нарушений, что обусловлено реакцией организма на операционный стресс, массивное повреждение суставных и околосуставных тканей, а также наличие имплантата.

Ключевые слова: остеоартроз, эндопротезирование, клеточный иммунитет.

Основным методом лечения тяжелых форм дегенеративно-дистрофических изменений тазобедренного сустава является его эндопротезирование [1]. Иммунологические нарушения в возникновении послеоперационных осложнений при лечении данной патологии обусловлены как длительно протекающим патологическим процессом в области пораженного сустава, так и хирургической агрессией [2, 3, 4]. Иммунологический статус пациентов до и после эндопротезирования тазобедренного сустава подробно освещен в ряде работ, однако эти исследования малочисленны и противоречивы [5].

Целью исследования явилось изучение показателей клеточного иммунитета у больных до и после эндопротезирования тазобедренного сустава.

Материалы и методы. В исследование включены 20 пациентов с коксартрозом III степени до эндопротезирования и в динамике на 3 и 7 сутки после проведения операции. Средний возраст больных составил 61,2±1,8. В контрольную группу входили 10 практически здоровых добровольцев того же возраста. Из обследования были исключены лица, имеющие сопутствующие аллергические заболевания, носители вирусов гепатита В и С, ВИЧ и другие заболевания, оказывающие влияние на исследуемые показатели.

Типирование лимфоцитов периферической крови осуществляли методом лазерной проточной цитофлюориметрии на цитометре «BD FACS Canto II» (BD, США) с применением набора BD Multitest 6-Color TBNK Reagent (BD, США).

Результаты. Анализ полученных данных показал, что до проведенного оперативного вмешательства у пациентов с коксартрозом наблюдалось снижение абсолютного и относительного числа Т-лимфоцитов по сравнению с показателями контрольной группы, преимущественно за счет Т-супрессоров ($CD3^+$ $CD8^+$). Установлено, что на фоне снижения Т-супрессоров отмечалось достоверное увеличение Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), что подтверждалось увеличением иммунорегуляторного индекса. Установлено статистически значимое повышение числа лимфоцитов с киллерной активностью. Статистически значимых изменений абсолютного и относительного числа В-клеток ($CD3^-CD19^+$) не наблюдалось. Данные изменения расценивали как пролонгированную иммунологическую

реакцию на последствия разрушения тканей сустава.

На 5-7 сутки после проведенного оперативного вмешательства наблюдалось снижение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов ($p<0,001$), как за счет Т-хелперов ($p<0,001$), так и за счет Т-супрессоров ($p<0,001$). Кроме того, отмечено достоверное снижение уровня В-лимфоцитов ($p<0,001$) к 7-мым суткам после эндопротезирования. Статистически значимых изменений количества NK-клеток не наблюдалось. Выявленные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови обусловлены реакцией организма на операционный стресс, массивное повреждение суставных и околосуставных тканей, а также наличие имплантата.

В результате проведенных исследований установлено, что после проведенного оперативного вмешательства по эндопротезированию тазобедренного сустава в ранней послеоперационный период наблюдалось выраженное угнетение клеточного звена иммунитета, что можно связать с реакцией организма на операционный стресс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Винчель Р. В. Оценка кислородзависимых механизмов бактерицидности нейтрофилов и моноцитов в НСТ-тесте у больных после эндопротезирования тазобедренных суставов / Р. В. Винчель // Фундаментальные исследования. – 2006. – № 3. – С. 37.
2. Иммунная реактивность косной ткани у пациентов с остеоартрозом / Е. В. Гладкова, Е. В. Карякина, И. А. Мамонова и др. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № S. – С. 329.
3. Особенности клеточного иммунитета у больных коксартрозом / И. А. Мамонова, Д. М. Пучиньян, Е. В. Гладкова и др. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № S. – С. 337.
4. Оптимизация мониторирования активности дегенеративного процесса у больных остеоартрозом до и после эндопротезирования коленного сустава / С. В. Белова, И. А. Мамонова, Д. М. Пучиньян и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 145.
5. Лабораторные диагностические маркеры при оценке состояния больных остеоартрозом, требующих эндопротезирования крупных суставов (обзор литературы) / В. А. Филиппенко, Ф. С. Леонтьева, Д. В. Морозенко и др. // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2013. – № 2. – С. 122-126.

DYNAMICS OF THE PATTERN OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS BEFORE AND AFTER HIP JOINT ENDOPROSTHESIS

Mamonova I. A., Gladkova E. V., Puchin'yan D.M., Babushkina I. V., Belova S. V.

FSBI "Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopedics" of the Ministry of Health of Russian Federation, Saratov, Russia

The results of immunological investigation of III grade coxarthrosis patients before and after endoprosthesis are presented in the article. Pre- and postsurgical cellular immunity changes are displayed as well as some study results namely significant suppression of cellular immune element in coxarthrosis patients presurgically and disturbances aggravation postsurgically which is due to reaction to surgical stress, large damage of articular and periarticular tissues and the implant.

Keywords: osteoarthrosis, endoprosthetics, cellular immunity.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ АЦИДИФИКАЦИИ ФАГОСОМ У КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА

Шилов Ю. И.[1,2,3], Шилов С. Ю.[1,2], Жукова А. Е.[2], Барков С. Ю.[2], Петухова А. А.[3]

[1]ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; [2]ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава России; [3]ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Установлено, что у самок крыс в фазе проэструса в сравнении с фазой диэструса и с самцами наблюдается более интенсивная флюоресценция частиц зимозана, меченых зеленым pHrodo™, через 120 минут от начала их фагоцитоза лейкоцитами крови. Показатели флюоресценции pHrodo™ с перитонеальными лейкоцитами были выше у самок в фазе проэструса в сравнении с самцами.

Ключевые слова: фагоцитоз, фагосомы, pHrodo™, эстральный цикл.

Ацидификация фагосом или снижение в них уровня pH как важнейшее проявление их созревания реализуется за счет активной закачки ионов водорода при участии протонного мультимерного ферментного насоса – везикулярной H^+-АТФазы, а также активного транспорта из фагосомы катионов, в частности K^+, и закачки в нее анионов, в частности Cl^-, с помощью нескольких других специализированных транспортеров и мембранных каналов [1, 2]. Уровень pH при этом последовательно снижается в ранних фагосомах до 6,5, в поздних – до 5,5, в фаголизосомах – до 4,5 [1]. Удобными молекулярными сенсорами для регистрации закисления фагосом являются pH-чувствительные флюорохромы, в частности красный и зеленый pHrodo™ (Molecular Probes® / Life Technologies), которые не флюоресцируют при физиологических значениях pH, но начинают светиться в кислой среде под действием возбуждающего света с интенсивностью, прямо пропорциональной снижению pH [3]. Ранее нами выявлены выраженные различия показателей уровня флюоресценции фагоцитов крови и перитонеального смыва у самцов и самок нелинейных белых крыс через 120 минут от начала фагоцитоза частиц зимозана, меченого зеленым pHrodo™ [4]. Так, у самок крыс в сравнении с самцами отмечена более интенсивная флюоресценция поглощенных объектов и ее значительно большая вариабельность, что могло быть связано с физиологическими изменениями гормонального зеркала при эстральном цикле самок.

Цель работы. Исследование изменения уровня ацидификации фагосом с использованием зимозана, меченого зеленым pHrodo™, у самок крыс в зависимости от фазы эстрального цикла.

Материалы и методы. Исследования проводили на нелинейных белых крысах в возрасте 4-7 месяцев. Всех животных содержали в условиях вивария на стандартной диете и стандартном освещении (12 ч света и 12 ч темноты). Все исследования проводили в соответствии с международным соглашением об экспериментах на животных. Фазу эстрального цикла у самок определяли общепринятым кольпоцитологическим методом. В эксперимент отбирали животных с устойчивым 4-дневным циклом.

Лейкоциты крови (50 ЕД гепарина/мл крови) выделяли методом седиментации с 0,1 % метилцеллюлозой (Sigma-Aldrich, США). Перитонеальные лейкоциты выделяли методом промывания брюшной полости 10 мл среды 199 с добавлением 10 ЕД/мл гепарина. После двукратного отмывания центрифугированием при 400 g в течение 10 мин клетки ресуспендировали в полной питательной среде (ППС) следующего состава: среда RPMI-1640 без L-глутамина с добавлением 2 мМ GlutaMAX™, 1 мМ пирувата натрия, 1 % заменимых аминокислот в MEM (все Gibco®, Life technologies™), 10 мМ HEPES (Sigma-Aldrich). Концентрацию клеточной суспензии доводили до 25×10^6 клеток/мл ППС. В пробирках Эппендорф смешивали 88 мкл ППС, 4 мкл суспензии лейкоцитов (25×10^6 клеток/мл) и 8 мкл преинкубированной

для опсонизации при 37° С в течение 30 мин смеси равных объемов частиц зимозана, меченого зеленым pHrodo™ (100×10^6 частиц/мл; pHrodo™ Green zymosan A BioParticles® conjugate, Molecular probes® by Life technologies™, P35365, Lot 1617699), и аутоплазмы. После перемешивания смеси на Votex-Genie-2 (Scientific Industries, США) пробы инкубировали при при 37° С в течение 120 мин. Дальнейшие этапы, включавшие лизис эритроцитов, отмывание клеток и анализ интенсивности флюоресценции на планшетном проточном лазерном цитометре Guava EasyCyte (Millipore), позволяющим благодаря конструкции капиллярной проточной ячейки значительно снизить расход реагентов, не отличались от описанных [4].

Для сбора и анализа данных использовали программное обеспечение "Millipore CytoSoft 5.3", модули "Guava Express Plus/Pro". Статистический анализ проводили с использованием методов описательной статистики. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Установлено, что интегральные показатели, характеризующие среднюю интенсивность свечения всех фагоцитированных объектов (гейтирование по общему количеству флюоресцирующих событий), с лейкоцитами крови самок в фазе проэструса (73,438±11,602), характеризующуюся максимальным повышением уровня эстрогенов, выше в сравнении с самками в фазе диэструса (42,833±4,300; p=0,016807 по критерию Дункана), во время которой уровень эстрогенов минимален, а также в сравнении с самцами (28,100±0,731; p=0,001405 к проэструсу по критерию Дункана). Статистически значимых различий показателей с клетками перитонеального смыва у самок, находящихся в фазах диэструса и проэструса, не выявлено. Однако показатели интенсивности флуоресценции у самок, находящихся в фазе проэструса, статистически значимо выше в сравнении с самцами. Обсуждая полученные результаты, важно отметить, что регистрация интенсивности свечения в наших экспериментах осуществлялась через 120 мин от начала фагоцитоза, т.е. намного позже времени, необходимого для достижения плато интенсивности поглощения частиц. Поэтому можно считать, что выявленные различия обусловлены именно уровнем ацидификации фагосом, а не интенсивностью поглощения объектов фагоцитоза. С позиций физиологии фагоцитирующих клеток полученные результаты указывают на то, что у самок крыс кислотность фагосом зависит от физиологического изменения уровня эстрогенов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что уровень ацидификации фагосом при фагоцитозе частиц зимозана, меченых зеленым pHrodo, зависит от физиологического увеличения уровня эстрогенов в фазу проэструса эстрального цикла.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weiss G., Schaible U.E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria /G. Weiss, U.E. Schaible // Immunological Reviews.– 2015.– V. 264 (1).– P. 182-203.
2. Soldati T., Neyrolles O. Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! / T. Soldati, O. Neyrolles // Traffic.– 2012.– V. 13(8).– P. 1042-1052.
3. Development and validation of a flow cytometric method to evaluate phagocytosis of pHrodo™ BioParticles® by granulocytes in multiple species / A. Neaga, J. Lefor, K.E. Lich et al. // J. Immunol. Methods.– 2013.– V. 390(1-2).– P. 9-17.
4. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных клеток и лейкоцитов крови крыс с использованием маркера ацидификации фагосом pHrodo™ / С.Ю. Шилов, А.Е. Жукова, А.А. Петухова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9(18), № 2 (1).– С. 352-354.

CHANGES IN LEVEL OF PHAGOSOMAL ACIDIFICATION IN RATS DEPENDING ON THE PHASE OF THE ESTROUS CYCLE

Shilov Ju.I.[1,2,3], Shilov S.Ju.[1,2], Zhukova A.E.[2], Barkov S.Ju.[2], Petuhova A.A.[3]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB RAS; [2]Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University; [3]Perm State National Research University, Perm, Russia

It was established that intensity of fluorescence of zymosan particles labeled with green pHrodo™ after 120 minutes from the start of phagocytosis blood leukocytes were more intensive in proestrus in compare with diestrus in female rats and with male animals. Levels of the pHrodo™ fluorescence with peritoneal leukocytes were higher in female rats in proestrus compared with male animals.

Keywords: phagocytosis, phagosomes, pHrodo™, estrous cycle.

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ АЛЬФА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ СПЛЕНОЦИТОВ НЕКАСТРИРОВАННЫХ И ОРХИДЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС

Шилов С. Ю.[1,2], Шилов Ю. И.[1,2], Митин А. А.[2], Барков С. Ю.[2]

[1]ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;
[2]ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия

Установлено, что дефицит андрогенов, вызванный орхидэктомией, приводит не только к стимуляции пролиферации лимфоцитов в культурах с конканавалином А, но и повышает чувствительность клеток, участвующих в пролиферативном ответе спленоцитов, к иммуносупрессивному действию агонистов альфа$_1$- и альфа$_2$-адренорецепторов.

Ключевые слова: пролиферативный ответ спленоцитов, орхидэктомия, альфа-адренорецепторы.

Актуальность. Известно, что андрогены могут модулировать экспрессию альфа-адренорецепторов и/или трансдукцию с них сигнала в клетках гладкой мускулатуры, жировой ткани, миокарда, нервной системы [1, 2]. В частности, орхидэктомия приводит к повышению экспрессии альфа$_2$-адренорецепторов в клетках фронтальной коры головного мозга, а введение тестостерона, напротив, снижает ее на уровне транскрипции [3]. Хорошо документировано и влияние андрогенов на клетки иммунной системы [4, 5]. Однако влияние андрогенов на экспрессию альфа-адренорецепторов, трансдукцию с них сигнала в клетках иммунной системы и связанное с этими механизмами изменение чувствительности иммуноцитов к адренергической регуляции изучено недостаточно.

Цель работы – исследование влияния агонистов альфа-адренорецепторов на пролиферативный ответ спленоцитов некастрированных и орхидэктомированных крыс.

Материалы и методы. Исследования выполнены на самцах нелинейных белых крыс в возрасте 4-6 месяцев. Операцию орхидэктомии проводили под эфирным наркозом общепринятым методом за 60 суток до основного эксперимента. Суспензии клеток селезенки получали общепринятыми методами. Пролиферативный ответ клеток селезенки оценивали в культурах с Т-клеточным митогеном конканавалином А (Sigma-Aldrich, США, C0412) в концентрации 5 мкг/мл и в культурах без митогена. Культивирование спленоцитов (5×10^5 клеток/лунку) проводили в 96-луночных круглодонных планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640 без L-глутамина с добавлением 2 мМ GlutaMAX™, 1 мМ пирувата натрия, 1 % заменимых аминокислот в MEM (все Gibco, Invitrogen), 10 мМ HEPES (Sigma-Aldrich, США), 10^{-5} М 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (SC-Biol, Биолот, Россия). Метил-^{3}Н-тимидин (ОАО «Всерегиональное объединение «Изотоп», Москва) вносили по 1 мкКи за 24 ч до окончания культивирования. Через 72 ч от начала культивирования содержимое культур переносили на съемщик со стекловолоконными фильтрами, которые последовательно промывали 10 мл 0,15 М раствором хлорида натрия, 10 мл охлажденной 5 % трихлоруксусной кислотой и 10 мл 0,15 М раствором хлорида натрия. Радиоактивность кислотонерастворимой фракции определяли с использованием сцинтилляционной жидкости ProSafe FC+ (Meridian Biotechnologies Ltd., Великобритания). Исследовали эффекты агониста альфа$_1$-адренорецепторов фенилэфрина гидрохлорида (Sigma-Aldrich, P6126, США) в концентрации 10^{-6} М и агониста альфа$_2$-адренорецепторов клонидина гидрохлорида (Sigma-Aldrich, C7897, США) в той же концентрации. Контролем служили культуры без добавления агонистов адренорецепторов.

Статистический анализ результатов проводили с учетом log-нормального распределения данных. Рассчитывали среднюю арифметическую и ее стандартную ошибку (M±m) для

показателей $\log_{10}$ имп/мин, среднюю геометрическую имп/мин (антилогарифм из средней арифметической $\log_{10}$ имп/мин). Различия считались статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Установлено, что после орхидэктомии развивается повышение пролиферативного ответа спленоцитов в культурах с внесением конканавалина А ($\log_{10}$ имп/мин 4,7270±0,1157; М геом. 53337) по сравнению с аналогичными показателями интактных самцов крыс ($\log_{10}$ имп/мин 4,1891±0,1039; М геом. 15456; p=0,004593). Орхидэктомия не влияет на пролиферацию спленоцитов в культурах без митогена (p>0,05). При внесении в культуры с митогеном агониста альфа$_1$-адренорецепторов (фенилэфрина гидрохлорид, 10^{-6} М) препарат статистически значимо не влияет на пролиферативный ответ некастрированных крыс, но оказывает выраженный супрессивный эффект на пролиферацию спленоцитов орхидэктомированных крыс ($\log_{10}$ имп/мин 4,4044±0,2178; М геом. 25377; p=0,022549 по парному t-критерию Стьюдента к культурам без агониста). При этом полностью отменяется активирующий эффект орхидэктомии по отношению к соответствующим культурам некастрированых самцов (p>0,05 по непарному t-критерию Стьюдента). Полученные результаты указывают на то, что дефицит андрогенов, вызванный орхидэктомией, приводит к повышению чувствительности клеток, участвующих в пролиферативном ответе спленоцитов, к альфа$_1$-адренергической регуляции. Сходные результаты получены и при исследовании действия *in vitro* агониста альфа$_2$-адренорецепторов (клонидина гидрохлорид, 10^{-6} М). Препарат не влияет на митоген-индуцированный пролиферативный ответ лимфоцитов некастрированных крыс ($\log_{10}$ имп/мин 4,1708±0,0981; М геом. 14820; p>0,05 к культурам без агониста), но угнетает его у орхидэктомированных животных ($\log_{10}$ имп/мин 4,4505±0,2010; М геом. 28213; p=0,036158 по парному t-критерию Стьюдента к культурам кастрированных крыс без препарата), при этом в культурах с агонистом отменяется стимулирующий эффект орхидэктомии (p>0,05 к культурам с агонистом некастрированных животных по непарному t-критерию Стьюдента).

Таким образом, дефицит андрогенов, вызванный орхидэктомией, приводит не только к стимуляции пролиферации лимфоцитов в культурах с конканавалином А, но и повышает чувствительность клеток, участвующих в пролиферативном ответе спленоцитов, к иммуносупрессивному действию агонистов альфа$_1$- и альфа$_2$-адренорецепторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Testosterone-augmented contractile responses to α_1- and β_1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart / S. Tsang, S.S.C. Wong, S. Wu et al. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol.– 2009.– V. 296 (4).– P. C766 – C782.
2. Blanco-Rivero J., Balfagón G., Ferrer M. Orchidectomy modulates α_2-adrenoceptor reactivity in rat mesenteric artery through increased thromboxane A_2 formation / J. Blanco-Rivero, G. Balfagón, M. Ferrer // J. Vasc. Res.– 2006.– V. 43(1).– P. 101-108.
3. Effects of testosterone on alpha2A-adrenergic receptor expression in the rat brain / N.N. Dygalo, T.S. Kalinina, N.Y. Sournina et al. // Psychoneuroendocrinology.– 2002.– V. 27(5).– P. 585-592.
4. Гормоны репродукции в регуляции процессов иммунитета / Н.Н. Кеворков, Ю.И. Шилов, С.В. Ширшев и др. // Екатеринбург: Наука, 1993.– 172 с.
5. Эффекты кастрации на иммунный ответ у мышей самцов разных генотипов и индукцию аутоиммунного заболевания / О.П. Колесникова, О.Т. Кудаева, С.А. Арсенова и др. // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета.– 2010.– Т. 2, № 14.– С. 59-62.

EFFECT OF ALFA-ADRENERGIC AGONISTS ON THE PROLIFERATIVE RESPONSE OF SPLENOCYTES OF NON-CASTRATED AND ORCHIDECTOMIZED RATS

Shilov S. Ju.[1,2], Shilov Ju.I.[1,2], Mitin A.A.[2], Barkov S. Ju.[2]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB RAS;
[2]Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

It was found that androgen deficiency caused by orchiectomy, leads not only to stimulation of the lymphocyte proliferation in cultures with concanavalin A, but also increases the sensitivity of cells involved in the proliferative response of splenocytes to the immunosuppressive action of alpha$_1$- and alpha$_2$-adrenoceptor agonists.

Keywords: proliferative response of splenocytes, orchiectomy, alpha-adrenoceptors.

ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ ОБОСТРЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА И ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ЖЕЛУДКА

Меньшикова Е.А., Штаборов В.А.

ФГБУН Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН, Архангельск, Россия

В работе изложены результаты иммунного статуса у жителей Севера при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Установлено, что при хроническом панкреатите иммунные реакции значительно выше. При панкреатите характерны более высокие уровни цитотоксических лимфоцитов, лимфоцитов, способные к пролиферации и апоптозу, а также провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF-α). Высокая степень выраженности иммунной реакции при панкреатите проявляется и на уровне антителообразования с секрецией высоких концентраций IgE.

Ключевые слова: хронический панкреатит, заболевания желудочно — кишечного тракта, иммунитет.

Заболевания желудочно-кишечного тракта занимают третье место по распространению среди всех заболеваний в России. Исходя из статистики, болезни органов пищеварения стали причиной 4,5 % случаев смерти россиян. Причем в 55-56 % случаев речь идет о поражениях печени. Болезни системы пищеварения, в том числе язвенная болезнь и панкреатит, относятся к индикаторной патологии жителей северных территорий, составляя 157,6 на 100 000 населения [3]. Высокий уровень заболеваемости на Севере обусловлен, в первую очередь, социальными и климатическими условиями [3], которые обусловливают формирование экологически зависимых вторичных иммунодефицитов [1].

Цель работы. Выявить особенности иммунных реакций при обострении хронического панкреатита и язвенной болезни желудка.

Материалы и методы. Проведено иммунологическое обследование больных с обострением панкреатита (32 человек) и язвенной болезни желудка (42 человека) в возрасте 30-45 лет. Исследования проводились в медицинской компании «Биокор» г. Архангельска. Комплекс обследования включал изучение содержания в крови фенотипов лимфоцитов, характеризующих процессы активизации, дифференцировки, антителообразования и апоптоза иммунокомпетентных клеток. Содержание фенотипов лимфоцитов и их субпопуляционный состав определяли иммунопероксидазной реакцией и методом проточной цитометрии с помощью аппарата Epics XL. Цитокиновый профиль, иммуноглобулины, нейропептид SP, гастрин-17 изучали иммуноферментным способом, результаты оценивали фотометром Labsystems (Финляндия). Результаты исследования обработаны с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты исследования. При хроническом панкреатите регистрируется умеренный лейкоцитоз (10,59±0,43×10^9 кл/л) за счет увеличения содержания нейтрофилов (7,06±0,89×10^9 кл/л). Уровень фагоцитарной активности нейтрофилов достаточно низок (41,10±0,46 %), дефицит фагоцитарной защиты установлен у большинства обследуемых лиц. Содержание лимфоцитов было довольно значительным (2,52±0,09×10^9 кл/л); лимфоцитоз установлен в 28,13 %. Содержание зрелых Т-клеток ($CD3^+$) было ниже (0,76±0,09×10^9 кл/л) общепринятых границ, дефицит их отмечен в 43,75 %. Содержание активированных Т-клеток ($CD71^+$) составило 0,39±0,04×10^9 кл/л; несколько выше был уровень $CD25^+$ (0,48±0,04×10^9 кл/л) и $HLA\text{-}DRII^+$ (0,56±0,06×10^9 кл/л). Концентрация Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) была повышена (>0,80×10^9 кл/л) у 12 больных (37,50 %). У лиц с хроническим панкреатитом выявлено

относительно высокое содержание лимфоцитов $CD10^+$ (0,61±0,07×10^9 кл/л), их уровни > 0,5×10^9 кл/л отмечены у 17 лиц (53,13 %). Уровень активизации пролиферации лимфоцитов был соразмерен с активностью их апоптоза An^+PI^- (0,59±0,07×10^9 кл/л). Повышенные концентрации цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) установлены у 12 больных (37,5 %), среднее их содержание высокое (0,73± 0,01×10^9 кл/л). Реакции со стороны провоспалительных цитокинов касаются IL-6, концентрация которого в среднем превышала физиологический уровень (59,02±1,18 пг/мл) и установлено у 50 % обследованных лиц. Высокие концентрации IL-6 способствуют увеличению содержания лимфоцитов за счет активизации лимфопролиферации. Концентрации TNF-α повышены в 18,75 %, средний их уровень составил 30,31±0,17 пг/мл, что в переделах нормы. Изменения содержания IgM, IgG и IgA были незначительными; установлена реакция со стороны IgE, концентрации которых превышали нормативный уровень у 19 лиц (59,38 %); в среднем уровень IgE составил 102,57±1,32 МЕ/мл. Обострение хронического панкреатита происходит на фоне низкого содержания в крови нейромедиатора SP (0,98± 0,04 нг/мл), дефицит которого ассоциирован с дефицитом гастрина-17 (1,69±0,04 пмоль/л). Выявлена средняя отрицательная корреляционная взаимосвязь между нейромедиатором SP и IgE (r= –0,41, p<0,05). Уровень содержания онкомаркера РЭА в группе лиц с панкреатитом заметно выше (3,95±0,17 против 2,16±0,21нг/мл, p<0,05). Повышенные концентрации онкофетальных антигенов в крови ассоциированы со стимуляцией клеточно-опосредованной цитотоксичности с повышением содержания $CD3^+CD8^+$ и IgE. В отличие от хронического панкреатита при язвенной болезни желудка и 12-ти перстной кишки ниже уровень реакции со стороны нейтрофилов 4,78±0,08×10^9 кл/л (p<0,05) в 21,43 % случаев. При данной патологии ниже уровень реакции IL-6 (23,05± 1,12 пг/мл, p<0,05) и TNF-α (24,54±0,45 нг/мл), менее выражена реакция со стороны пролиферирующих лимфоцитов $CD10^+$ (0,47± 0,05×10^9 кл/л), цитотоксических клеток $CD3^+$ $CD8^+$ (0,56±0,02×10^9 кл/л) и IgE – 87,33± 1,23 МЕ/мл (p<0,05-0,01). Содержание нейропептида SP в крови в среднем не отличалось от такового при панкреатите (1,04±0,04 нг/мл) с частотой дефицита в 47,62 %. Концентрации гастрина-17 были ниже, чем при хроническом панкреатите (0,96±0,06 пмоль/л), дефицит его установлен у 23 человек (54,76 %).

Итак, обострение хронического панкреатита и язвенной болезни желудка и 12-ти перстной кишки сопровождаются системными иммунными реакциями, уровни которых выше при хронического панкреатита. В 2 раза выше концентрации IL-6, выше активность реакции со стороны нейтрофилов, цитоксических Т-клеток, лимфоцитов, способных к пролиферации и клеток, меченных к апоптозу. Повышенная реактивность цитотоксических лимфоцитов при воспалительных процессах органов брюшной полости, сопровождаемых тканевым повреждением [2]. Высокая степень выраженности иммунной реакции при панкреатите проявляется и на уровне секреций высоких концентраций IgE. Через IgE лимфоциты, макрофаги и эозинофилы реализуют более высокий потенциал антителозависимой цитотоксичности и более высокий уровень эффективности данной защитной реакции [1]. Переключение синтеза иммуноглобулинов на класс IgE отражает сокращение резервов регуляции иммунного гомеостаза. Повышение концентрации в крови РЭА при панкреатите и язвенной болезни связано с более эффективной защиты со стороны покровного эпителия слизистых [2, 4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добродеева Л. К. Иммунологическое районирование / Л. К. Добродеева // Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН.– 2001.– С. 112.
2. Макаров А. И. Иммунологическая реактивность при острых воспалительных заболеваниях органов брюшной полости у хирургических больных: автореферат диссертации док. мед. наук / Макаров А. И.– Архангельск, 2009.– с. 40.
3. Никифорова Н.А., Карапетян Т.А., Доршакова Н. В. Оценка заболеваемости язвенной болезнью населения Европейского Севера России / Н. А. Никифорова, Т. А. Карапетян, Н. В. Доршакова // Экология человека.– 2015.– № 12.– С. 53-58.
4. Hammarström S.The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues / S. Hammarström // Seminars In Cancer Biology.– 1999.– V. 9 (2).– P. 67-81.

IMMUNE RESPONSES IN CHRONIC PANCREATITIS AND GASTRIC ULCERS

Menshikova E. A., Shtaborov V. A.

FGBUN Institute of environmental physiology Ural Branch RAS, Arkhangelsk, Russia

The paper presents the results of the immune status of the residents of the North in diseases of the gastrointestinal tract. It is established that in chronic pancreatitis the immune reaction significantly higher. When pancreatitis is characterized by higher levels of cytotoxic lymphocytes, lymphocytes capable of proliferation and apoptosis, and proinflammatory cytokines (IL-6, TNF-α). A high degree of severity and immune response in pancreatitis is manifested at the level of antibody production with the secretion of high concentrations of IgE.

Keywords: chronic pancreatitis, diseases of the gastrointestinal tract, immunity.

КАЛЬЦИНОЗ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА: СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ Т-КЛЕТОК И ПУРИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

Головкин А. С.[1], Кудрявцев И. В.[2,3], Серебрякова М. К.[2,4], Малашичева А. Б.[1], Шишкова А. А.[1], Жидулева Е. В.[1], Иртюга О. Б.[1], Моисеева О. М.[1]

[1]Северо-западный федеральный медицинский исследовательский центр, им. В. А. Алмазова; [2]НИИ экспериментальной медицины; [3]Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова; [4]Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

При обследовании 33 пациентов с кальцинозом аортального клапана и 26 здоровых доноров установлено, что у пациентов был более низкий уровень $CD3^+CD8^+CD45RA^+C62L^+$ (p=0,0002), а среди них $CD73^+CD39^-$ (p=0,001). В популяции Т-хелперов уровень $CD73^+CD39^-CD45RA^+CD62L^-$ и $CD73^+CD39^-CD45RA^-CD62L^-$ был понижен (p=0,02), а $CD73^-CD39^-CD45RA^+CD62L^-$ повышен (p=0,04). Результаты указывают на значимость изменения субпопуляций циркулирующих Т-клеток и пуринергической регуляции их активности в патогенезе кальциноза аортального клапана.

Ключевые слова: кальцинированный стеноз аортального клапана, субпопуляции Т-клеток, пуринергическая регуляция.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению аденозиновой регуляции, как составной части управления активностью клеток, участвующих в отложении кальциевых депозитов [1]. В результате повреждения клеток высвобождается большое количество АТФ, который, посредством своих метаболитов, активно участвует в кальцификации клапанов сердца. Экспрессируемые на поверхности рецепторы CD39 (эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролаза) метаболизируют АТФ до АДФ, пирофосфата и АМФ. Последний, в свою очередь, расщепляется до аденозина и фосфата поверхностным рецептором CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) [2]. Кроме того, было показано, что циркулирующие активированные Т-клетки эффекторной памяти ассоциированы с кальцификацией аортального клапана [3].

Цель. установить особенности субпопуляционного состава циркулирующих Т-лим-

фоцитов, фенотипированных на основании их дифференцировочного статуса и участия в аденозиновой регуляции при кальцинированном стенозе аортального клапана.

Материал и методы. Было обследовано 33 пациента с тяжелым аортальным стенозом (средний градиент на аортальном клапане 48,3 (46,0;65,0)), а также 26 здоровых доноров. При этом у 17 пациентов был верифицирован врожденный порок сердца – двустворчатый аортальный клапан, у остальных – трехстворчатый. Достоверных различий в эхокардиографических признаках тяжести стеноза у пациентов двух групп отмечено не было.

Для проточной лазерной цитометрии венозная кровь окрашивалась моноклональными антителами: CD25-PE, CD62L-ECD, CD45R0-PC5.5, CD4-PC7, CD8-APC, CD39-FITC, CD3-Alexa Fluor 700 и CD73-Pacific Blue. Анализ проводился на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США). Исследовался уровень экспрессии CD39 и CD73 на популяциях Т-хелперов (Th, $CD3^+CD4^+$) и Т-цитотоксических (Tcyt, $CD3^+CD8^+$): «наивных» (N, $CD45RA^+CD62L^+$), центральной памяти (CM, $CD45RA^-CD62L+$), эффекторной памяти (EM, $CD45RA^-CD62L^-$) и терминально-дифференцированных $CD45RA^+$ клетках эффекторной памяти (TEMRA, $CD45RA^+CD62L^-$).

Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me(25;75%). Значимость различий оценивалась по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты. У пациентов с аортальным стенозом был более низкий уровень «наивных» Т-цитотоксических клеток (3,28 (2,44;4,49)%, p=0,0002) и $CD73^+CD39^-CD3^+$ (13,02 (11,67; 17,49)%, p=0,03), чем у здоровых доноров (5,08 (4,36;8,50)% и 16,17 (12,69;22,24)% соответственно). Кроме того, было отмечено повышенное (p=0,04) количество $CD73^-CD39^+CD3^+$ (4,28 (1,45;5,77)%) по сравнению с таковыми у людей без поражения аортального клапана (2,80 (0,52;4,37)%).

В результате анализа уровня экспрессии CD39 и CD73 на поверхности субпопуляций Th и Tcyt было установлено, что уровень $CD73^+$ $CD39^-$ N Tcyt был достоверно ниже (p=0,001), а $CD73^-CD39^-$ достоверно выше (p=0,003) у пациентов с аортальным стенозом. Была отмечена разница в популяциях Th клеток: уровень $CD73^+CD39^-$ TEMRA и $CD73^+CD39^-$ EM был понижен (p=0,02), а $CD73^-CD39^-$ TEMRA – повышен (p=0,04) в сравнении с таковым у здоровых доноров.

У пациентов с бикуспидальным клапаном было повышено относительное и абсолютное количество Tcyt (p=0,04), абсолютное количество EM Tcyt (p=0,01) и относительное количество $CD73^-CD39^-CD3^+$ (p=0,04) в сравнении с таковыми у пациентов с трикуспидальным клапаном.

Обсуждение. Ранее у реципиентов механических и биологических протезов клапанов сердца нами было отмечено изменение субпопуляционного состава Т-клеток и определен их вклад в развитие кальцификации и дисфункции [4].

В настоящей работе обнаружен различный уровень экспрессии CD39 и CD73 на изучаемых субпопуляциях. Продемонстрирован возможный высокий вклад уровня экспрессии CD73. Его пониженная активность приводит к накоплению АМФ и пирофосфата. Последний, являясь потенциальным ингибитором отложения гидроксиапатита, может разрушаться неспецифической щелочной фосфатазой до фосфата, обладающего прокальцинирующей активностью. Это усугубляется повышенной экспрессией и активностью CD39, приводящей к снижению количества АТФ и дополнительному накоплению АДФ, АМФ и пирофосфата. По-видимому, имеет место компенсаторный механизм сдерживания проостеогенной активности. Сниженная экспрессия CD73, преимущественно на эффекторных Т-клетках, может подтверждать недостаток протективной активности в отношении процессов кальцификации.

Кроме того, АТФ является мощными триггером воспалительной реакции. Конечный продукт деградации – аденозин, обладает супрессивным действием в отношении клеток иммунной системы и является потенциальным противовоспалительным агентом. Повышенное количество аденозина может быть связано с активностью Т-регуляторных клеток, активно экспрессирующих CD39 и CD73, что приводит к угнетению активности Т-эффекторных клеток.

Заключение. Полученные результаты подтверждают гипотезу о значимости изменения субпопуляций циркулирующих Т-клеток в патогенезе кальцификации аортального клапана сердца, а также участии пуринергической регуляции их активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60199).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans / M. M. Adeva-Andany, C. Fernández-Fernández, R. Sánchez-Bello et al. // Atherosclerosis.– 2015.– T.241, № 1.– C. 183-191.
2. ATP and arterial calcification / R. S. Fish, E. Klootwijk, F. W. K. Tam, R. Kleta, D. C. Wheeler, R. J. Unwin, J. Norman // European Journal of Clinical Investigation – 2013.– T.43, № 4.– C. 405-412.
3. Circulating Activated and Effector Memory T Cells Are Associated with Calcification and Clonal Expansions in Bicuspid and Tricuspid Valves of Calcific Aortic Stenosis / R. Winchester, M. Wiesendanger, W. O'Brien et al. // The Journal of Immunology.– 2011.– T.187.– C. 1006-1014.
4. T Cell Response in Patients with Implanted Biological and Mechanical Prosthetic Heart Valves / L. Barbarash, I. Kudryavtsev, N. Rutkovskaya et al. // Mediators of Inflammation.– 2016.– P. 12.

CALCIFIED AORTIC STENOSIS: PERIPHERAL T-CELLS SUBPOPULATIONS AND PURINERGIC REGULATION

Golovkin A.[1], Kudryavtsev I.[2,3], Serebryakova M.[2,4], Malashicheva A.[1], Shishkova A.[1], Zhiduleva E.[1], Irtuga O.[1], Moiseeva O.[1]

[1]Federal Almazov Medical Research Centre; [2]Institution of Experimental Medicine; [3]Pavlov First Saint Petersburg medical university; [4]ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

We analyzed 33 patients with severe calcific aortic stenosis and 26 healthy volunteers. The level of $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD62L^+$ (p=0.0002) and $CD73^+CD39^-$ (p=0,001) in patients was decreased. The level of $CD73^+CD39^-CD45RA^+CD62L^-$ and $CD73^+CD39^-CD45RA^-CD62L^-$ was decreased (p=0.02) and $CD73^-CD39^-CD45RA^+CD62L^-$ was increased (p=0.04). These results indicate the importance of peripheral T-cells subsets and purinergic regulation in pathogenesis of aorta valve calcification.

Keywords: calcified aortic stenosis, T-cells subsets, purinergic regulation.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

Пичугова С. В., Лагерева Ю. Г., Рыбина И. В., Савинова Т. Л.

МАУ «Клинико-диагностический центр»; ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Бесплодие является серьезной проблемой современного здравоохранения, поскольку оно затрагивает около 15% супружеских пар репродуктивного возраста. В последнее время особое внимание уделяется изучению иммунологических факторов бесплодия. Цель исследования – оценить иммунологические аспекты мужского бесплодия. Материалы и методы. Исследованы эякуляты 130 мужчин в возрасте от 22 до 46 лет (спермограмма). Иммунологические исследования включали в себя выявление наличия АСАТ и содержание секретированных цитокинов IL-1b, IL-4, IL-6, IL-10 в сыворотке крови и семенной плазме. Результаты и обсуждение. У пациентов, страдающих бесплодием в спермограмме выявлена астенозооспермия. Кроме того, у инфертильных мужчин диагностированы: повышенный уровень антиспермальных антител в сыворотке крови и фиксированных на поверхности сперматозоидов, увеличение концентрации IL-6 в периферической крови и IL-1b в семенной жидкости. Увеличение уровня провоспалительных цитокинов на системном и локальном уровнях, способствует повышению проницаемости гематотестикулярного барьера, образованию АСАТ, поддержанию хронического воспалительного процесса, выработке активных форм кислорода, повреждающих сперматозоиды, что и вызывает, в конечном итоге, развитие бесплодия.

Ключевые слова: мужское бесплодие, сперматозоиды, цитокины, гормоны, антиспермальные антитела.

Одной из важных проблем здравоохранения является проблема бесплодия, затрагивающая около 15 % супружеских пар репродуктивного возраста [1]. Особый интерес представляет вклад иммунной системы в развитие мужского бесплодия, поскольку, из-за иммунологической привилегированности яичка, мужской репродуктивный тракт и иммунная система долгое время изучались как не оказывающие друг на друга влияние [2]. Цитокины секретируются клетками Сертоли, клетками Лейдига и выполняют в яичке ряд функций: регулируют сперматогенез, дифференцировку зародышевых клеток, стероидогенез [3]. При воспалительных процессах в урогенитальном тракте мужчин отмечается повышение уровня провоспалительных цитокинов, что оказывает отрицательное влияние на сперматогенез, подвижность сперматозоидов, и приводит к развитию мужской инфертильности [2, 3]. Иммунологическая форма бесплодия может развиваться в силу различных патологических состояний (воспаление, травма). Патологический процесс может быть излечен, но аутоиммунные процессы купировать не удается, происходит образование антиспермальных антител (АСАТ), которые выступают одним из иммунологических факторов бесплодия.

Цель работы состояла в исследовании иммунологических аспектов мужского бесплодия.

Материалы и методы. Исследованы эякуляты 130 мужчин в возрасте от 22 до 46 лет (спермограмма). Иммунологические исследования включали в себя выявление наличия АСАТ и содержание секретированных цитокинов IL-1b, IL-4, IL-6, IL-10 в сыворотке крови и семенной плазме.

Результаты. По результатам спермограмм в группе сравнения (30 человек) диагностирована нормозооспермия. Во вторую группу вошли 100 человек с диагностированным бесплодием, у которых по результатам спермограммы была выявлена астенозооспермия и агглютинация сперматозоидов. Оценка концентрации АСАТ показала, что у пациентов основной группы достоверно выше концентрация АСАТ в сыворотке крови и АСАТ класса IgA, фиксированных на поверхности сперматозоидов. Определение уровня анализируемых цитокинов продемонстрировало, что наблюдается выраженное увеличение концентрации IL-6 в периферической крови и IL-1b в семенной жидкости у пациентов, страдающих бесплодием.

Обсуждение результатов. Проведение исследования спермограммы позволило установить нарушение подвижности сперматозоидов, а также выявить агглютинацию сперматозоидов, наличие которой связывают с иммунологическим фактором бесплодия. В последнее время особое внимание уделяется изучению антиспермальных антител в качестве частой непосредственной причины бесплодия [2,4]. Обычно считается, что появление АСАТ в сыворотке крови связано с повышением проницаемости гематотестикулярного барьера. Гематотестикулярный барьер формируется плотными контактами между клетками Сертоли [4]. В ходе сперматогенеза эти соединения подвергаются реструктуризации, чтобы облегчить транзит сперматоцитов на стадии прелептотены через гематотестикулярный барьер, а также содействия миграции развивающихся клеток в сторону просвета канальцев [5]. Цитокины способствуют реструктуризации гематотестикулярного барьера, а тестостерон регулирует его сборку после того, как сперматоциты пересекут барьер [5]. Очевидно, увеличение уровня IL-1b, особенно на фоне снижения уровня тестостерона (что нередко отмечается у мужчин с бесплодием), может приводить к повышению проницаемости гематотестикулярного барьера и развитию аутоиммунных реакций с образованием АСАТ. Увеличение уровня провоспалительных цитокинов на системном и локальном уровнях, способствует повышению проницаемости гематотестикулярного барьера, образованию АСАТ, поддержанию хронического воспалительного процесса, выработке активных форм кислорода, повреждающих сперматозоиды, что и вызывает, в конечном итоге, развитие бесплодия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Associated factors with male infertility: a case control study / Ahmadi M. R., Yasemi M., Peyman H. et.al. // J. Clin. Diagn. Res. – 2014. – V. 8 (9). – P. 11-13.
2. Vivas A. G., Lozano H. J., Velasco H. J. Immune-testicular regulation and cytokines / A. G. Vivas, H. J. Lozano, H. J. Velasco // Invest. Clin. – 2007. – V. 48 (1). – P. 107-121.
3. Tsiporenko SIu. Influence of immunocorrection on the inflammatory process in the urogenital tract in men with infertility / SIu. Tsiporenko // Fiziol. Zh. – 2013. – V. 59 (6). – P. 72-80.
4. Mital P., Hinton B. T., Dufour J. M. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions / P. Mital, B. T. Hinton,

J. M. Dufour // Biol. Reprod. – 2011. – V.84 (5). – P. 851-858.
5. Li M. W., Mruk D. D., Lee W. M. Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging concept of regulation / M. W. Li, D. D. Mruk, W. M. Lee // Cytokine Growth. Factor Rev. – 2009. – V. 20 (4). – P. 329-338.

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF MALE INFERTILITY

Pichugova S. V., Lagereva Y. G., Rybina I. V., Savinova T. L.

Clinical and Diagnostic Center; Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

Infertility is a major problem of modern health care, because it affects about 15 % of couples of reproductive age. In recent years, special attention is paid to the study of immunological infertility factors. The purpose of research – to evaluate the immunological aspects of male infertility. Materials and methods. Ejaculates studied 130 men aged 22 to 46 years old (semen). Immunological studies included the detection of the presence of ACAT and the content secreted cytokines, IL-bIL-14, IL-6, IL-10 in serum and seminal plasma. Results and discussion. Patients suffering from infertility semen analysis revealed asthenozoospermia. Furthermore, infertile men diagnosed: increased sperm antibodies in serum and fixed on the surface of sperm cells, increasing the concentration of IL-6 in peripheral blood and IL-1b seminal fluid. Increased levels of proinflammatory cytokines in the systemic and local levels, contributes to the blood-testis barrier permeability, formation of sperm antibodies, maintenance of chronic inflammation, the development of reactive oxygen species that damage sperm that is, ultimately, the development of infertility.

Keywords: male infertility, sperm cells, cytokines, hormones, sperm antibodies.

Раздел 3
ИММУНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ

НЕЙРОГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ ИММУННОЙ И РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМ КРЫС

Захарова Л. А., Лифанцева Н. В., Шарова В. С., Извольская М. С., Воронова С. Н., Мельникова В. И.

ФГБУН Институт Биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Исследованы морфогенетический эффект моноаминов и их рецепторов на формирование тимуса и ЛПС-индуцированного иммунологического стресса на развитие репродуктивной системы крыс. Показано, что пренатальный дефицит серотонина вызывает усиление клеточного и гуморального иммунного ответа, тогда как дефицит дофамина – подавление клеточного иммунного ответа у взрослого потомства. Эффекты серотонина и дофамина реализуются через рецепторы, экспрессия которых выявлена в тимусе плодов с 16 дня эмбрионального развития. Пренатальное воздействие ЛПС вызывает снижение уровня гонадотропин-рилизинг гормона в гипоталамусе, лютеинизирующего и половых гормонов в крови половозрелого потомства. Заключается, что моноамины и ЛПС оказывают морфогенетический эффект на развитие иммунной и репродуктивной систем крыс в критические периоды их развития.

Ключевые слова: серотонин, дофамин, ЛПС, морфогенетический эффект, иммунная и репродуктивная системы.

В раннем развитии млекопитающих нейрогормоны гипоталамо-гипофизарно-адреналовой и гонадной систем (ГГГС), а также медиаторы иммунной системы – цитокины, программируют процессы развития специализированных органов и тканей плода, в том числе и лимфоидных [1, 2]. Изменения их физиологических концентраций в раннем развитии вызывают нарушения механизмов регуляции гомеостатических систем, обеспечивающих адаптацию взрослого организма, и повышают риски разнообразных заболеваний. Следствием иммунологического стресса, вызванного бактериальной или вирусной инфекцией во время беременности, могут являться такие заболевания, как церебральный паралич, множественный склероз, психоневрологические расстройства [3]. Выявление особенностей функционирования сигнальных молекул, включающихся в регуляцию иммунных и нейроэндокринных процессов в раннем онтогенезе, остается ключевой проблемой и приобретает особое значение при патологических состояниях. Наиболее полно изучены морфогенетические эффекты малых сигнальных молекул – моноаминов на ЦНС, в частности, на дифференцировку катехоламинергических и пептидергических нейронов [4]. Однако исследования об их влиянии на развитие иммунной системы единичны.

Цель работы. Исследовать морфогенетическое влияние серотонина и дофамина на развитие тимуса и бактериального эндотоксина ЛПС (*E. coli*), на развитие репродуктивной системы крыс.

Материалы и методы. В экспериментах использовали крыс Wistar с датированной беременностью. Экспрессию различных типов рецепторов к серотонину и дофамину оценивали с помощью ОТ-ПЦР с 16 эмбрионального дня развития (Э16) по 3 день постнатального периода (П3). На Э13-17 плодам крыс *in utero* вводили ингибиторы синтеза серотонина (пара-хлорофенилаланин, 100 мг/кг) и катехоламинов (альфа-метил-п-тирозин, 100 мг/кг), а на Э17 – антагонист рецепторов серотонина 1а типа (NAN-190, 1 мг/кг). Функциональную активность Т-лимфоцитов оценивали по пролиферативному ответу на Кон А (2,5 мкг/мл) и В-лимфоцитов по количеству антителообразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана

у взрослого потомства. Иммунологический стресс индуцировали в/б введением ЛПС E. coli (18 мкг/кг) самкам крыс на 12-й день беременности. Содержание гонадотропин-рилизинг гормона (ГРГ) в гипоталамусе, лютеинизирующего гормона (ЛГ) и половых стероидов в крови потомства оценивали с помощью РИА и ИФА. Статистическую обработку результатов проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона.

Основные результаты. мРНК рецепторов к серотонину 1a-, 1b-, 2a- и 2b-типов, а также к дофамину Д1-, Д3-типов была обнаружена в тимусе с Э16, и Д5-рецептора – с Э17. Максимальная экспрессия всех типов рецепторов наблюдалась на Э17-18. Пренатальное воздействие антагонистом этих рецепторов приводило к усилению пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на Кон А у взрослых особей. Дефицит серотонина, индуцированный ингибитором его синтеза в период первой волны миграции предшественников в эпителиальную закладку тимуса с Э13, вызывал на П20 снижение массы тимуса и селезенки, снижение количества зрелых субпопуляций Т-лимфоцитов и увеличение незрелых форм в тимусе, увеличение количества В-лимфоцитов в селезенке. В функционировании иммунной системы также наблюдались нарушения: 2-кратное увеличение пролиферативного ответа Т-лимфоцитов тимуса и селезенки на Кон А и 10-кратное увеличение количества АОК к эритроцитам барана в селезенке.

В отличие от серотонина, пренатальный дефицит катехоламинов, индуцированный ингибитором их синтеза, вызывал у половозрелого потомства подавление пролиферативного ответа лимфоцитов тимуса и селезенки на Кон А и не влиял на антителообразование. Анализ клеточного состава субпопуляций тимоцитов у взрослого потомства выявил увеличение численности регуляторных Т-лимфоцитов, что согласуется с наблюдаемым подавлением пролиферативного ответа на Кон А у этих крыс. Добавление дофамина в концентрациях 10^{-8}-10^{-6} М в культуру тимоцитов плодов на Э18 также приводило к снижению пролиферативного ответа на Кон А. Наличие в тимусе плодов рецепторов к дофамину и их функциональная активность свидетельствуют о возможности его прямого действия на развивающийся тимус и подтверждают ведущую роль дофамина в этих эффектах.

В свою очередь иммунная система участвует в регуляции развития ГГГС. Ранее нами было показано, что введение ЛПС самкам крыс на Э12 вызывает у матери и плодов повышенную экспрессию цитокинов – ИЛ-6, МСР-1 и ЛИФ, подавляющих интраназальную миграцию ГРГ-нейронов в мозг [5]. На Э12-15 на пути миграции нейронов на обонятельных и вомероназальных нервах выявлены, наряду с белком промежуточных филаментов – периферином, рецепторы к этим цитокинам. Пренатальное воздействие ЛПС приводило к снижению концентрации ГРГ на 30 % в гипоталамусе половозрелых самцов и самок. Содержание гипофизарного ЛГ в крови 2-недельных самцов и 2-месячных самок снижалось в 2 раза. Содержание тестостерона и эстрадиола у половозрелых особей также снижалось в 2 раза. У самцов этот эффект был обусловлен влиянием эстрадиола, а у самок, в большей степени,– подавлением эффекта тестостерона. Нарушения полового созревания были вызваны провоспалительными цитокинами, содержание которых значительно увеличивается у матери и плодов после пренатального воздействия ЛПС.

Выводы. Моноамины оказывают морфогенетическое влияние на формирование тимуса и ЛПС – на репродуктивную систему крыс в критические периоды их развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fowden A., Forhead A. Endocrine mechanisms of intrauterine programming / A. L. Fowden, A. Forhead // Reproduction.– 2004.– V. 127.– P. 515-526.
2. Zakharova L. A. Plasticity of neuroendocrine-immune interactions during ontogeny: role of perinatal programming in pathogenesis of inflammation and stress-related diseases in adults / L. A. Zakharova // Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.– 2009.– V. 3.– P. 11-27.
3. Захарова Л. А. Перинатальный стресс в программировании мозга и патогенезе психоневрологических заболеваний / Л. А. Захарова // Известия РАН. Серия биол.– 2015.– № 1.– С. 1-10.
4. Tyrosine hydroxylase expression in differentiating neurons of the rat arcuate nucleus: stimulatory influence of serotonin afferents / V. I. Melnikova, M. V. Ugrumov, E. V. Proshlyakova et al. // Neural. Plast.– 2001.– V. 8.– P. 271-284.
5. Sharova V. S., Izvolskaia M. S., Zakharova L. A. Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation affects the Gonadotropin-Releasing Hormone neuron development in fetal mice / V. S. Sharova, M. S. Izvolskaia, L. A. Zakharova // Neuroimmunomodulation.– 2015.– V. 22.– P. 222-232.

NEUROHORMONAL REGULATION OF THE DEVELOPMENT OF THE IMMUNE AND REPRODUCTIVE SYSTEMS OF RATS

Zakharova L.A., Lifanceva N.V., Sharova V.S., Izvolskaia M.S., Voronova S.N., Melnikova V.I.

Koltsov Institute of developmental biology RAS, Moscow, Russia

The morphogenetic effect of monoamines and their receptors on the thymus development as well as of the LPS-induced immunological stress on the reproductive system development in rats were investigated. It was demonstrated that the prenatal deficiency of serotonin causes increased cellular and humoral immune response, while the deficiency of dopamine causes the suppression of cellular immune response in adult offspring. The effects of serotonin and dopamine are realized through their receptors, that were identified in thymus from the 16th day of embryonic development. Prenatal exposure to LPS causes a decrease of the GnRH level in the hypothalamus, as well as of the luteinizing hormone and sex steroid levels in plasma of mature offspring. In conclusion, monoamines and LPS exert a morphogenetic effect on the development of the immune and reproductive systems of rats during critical periods of their development.

Keywords: serotonin, dopamine, LPS, morphogenetic effects, immune and reproductive systems.

ПОЛОВЫЕ СТЕРОИДЫ В РАЗВИТИИ АНОМАЛИЙ ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ У КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ПРЕНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ

Извольская М.С., Игнатюк В.М., Воронова В.Н., Захарова Л.А.

ФГБУН Институт Биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Исследованы отдаленные последствия пренатального иммунологического стресса, индуцированного ЛПС E.coli, на развитие репродуктивной системы крыс. Показано, что у половозрелых крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию ЛПС (50 мкг/кг), наблюдается снижение содержания гонадотропин-рилизинг гормона в гипоталамусе, лютеинезирующего и половых гормонов в крови. Кроме того, у самцов и самок происходят структурные изменения гонад. Антагонисты рецепторов половых гормонов, введенные в ювенильный период, восстанавливают выявленные нарушения до нормы. У самцов данный эффект обусловлен влиянием эстрадиола, а у самок, в большей степени, подавлением эффекта тестостерона. Предполагается, что нарушения полового созревания вызваны цитокинами: ИЛ-6, МСР-1 и ЛИФ, содержание которых увеличивается у матери и плодов после пренатального воздействия ЛПС.

Ключевые слова: ЛПС, провоспалительные цитокины, половые гормоны, репродуктивная система, крысы.

Согласно данным ВОЗ, 8-12% семейных пар детородного возраста страдают бесплодием. В последнее время увеличилось число мужчин с синдромом эмбриональной дисгенезии яичка, включающего такие проявления, как плохое качество спермы, крипторхизм, гипоспадия. У женщин нарушения репродуктивной способности зависят от более широкого спектра заболеваний. Одним из них является синдром поликистоза яичников, возникающий под действием экзогенных стероидов на фолликулогенез в ювенильном

возрасте. Развитие этих заболеваний связывают с влиянием неблагоприятных факторов на становление гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы (ГГГС). Значимым фактором риска для развивающегося организма является иммунологический стресс, индуцированный вирусным или бактериальным инфицированием. Протекающие бессимптомно вагинозы, бактериальные инфекции полости рта и ряд других инфекционных заболеваний матери приводят к активации иммунной системы и повышенной внеплацентарной, а затем и плацентарной продукции провоспалительных цитокинов.

В экспериментальных моделях для имитации бактериального инфицирования часто используют эндотоксин ЛПС. Ранее нами было показано, что пренатальное воздействие ЛПС (*E. coli*) вызывает у матери и плодов мышей увеличение концентрации цитокинов: ИЛ-6, ЛИФ и МСР-1, в несколько раз [1]. В эмбриогенезе провоспалительные цитокины функционируют как морфогенетические факторы. Нарушение баланса их взаимодействия приводит к нарушениям в развитии физиологических систем плода, в частности, к замедлению миграции нейронов, синтезирующих гонадотропин-рилизинг-гормон (ГРГ), который является основным регулятором ГГГС взрослых животных [2]. У половозрелых крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию ЛПС, наблюдается снижение содержания ГРГ, лютеинезирующего и половых гормонов. В ювенильном возрасте у этих животных выявлено повышенное содержание половых стероидов как у самцов, так и самок [3].

Цель работы. Исследовать роль половых гормонов в развитии нарушений полового созревания у крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию ЛПС.

Материалы и методы. В экспериментах использовали крыс Wistar с датированной беременностью. ЛПС вводили в/б (50мкг/кг в 0,9% растворе NaCl) самкам на 12-й день беременности. Рожденным крысятам (самцам и самкам) с 5-го дня постнатального развития (П5) по П14 вводили антагонист (анта) рецепторов эстрадиола (фульвестран, 1,5 мг/кг в кунжутном масле) и самкам антагонист рецепторов тестостерона (флютамид, 20мг/кг в кунжутном масле) с П14 по П30. Одной группе контрольных животных на 12-й день эмбрионального развития (Э12) вводили 0,9% раствор NaCl, а рожденным крысятам в соответствующие сроки – кунжутное масло. Второй группе контрольных животных вводили на Э12 ЛПС, а рожденным крысятам с П5 по П14 – кунжутное масло. В плазме крови потомства определяли содержание тестостерона и эстрадиола с помощью ИФА на П60. У самцов и самок фиксировали гонады в 4% ПФА, замораживали, получали криостатные срезы и окрашивали гематоксилином-эозином.

Основные результаты. После пренатального воздействия ЛПС повышенное на П5-14 содержание тестостерона и эстрадиола в крови рожденных самцов значительно снижалось в постпубертатный период (П60) по сравнению с неинфицированными животными. Анта-эстрадиол не отменял эффект ЛПС. У самок также наблюдалось снижение содержания эстрадиола и тестостерона на П60. Их антагонисты, введенные на П5-14, увеличивали уровень эстрадиола на П60 до уровня контрольных нормальных животных. В то же время после введения анта-эстрадиола самкам на Р14-30, в период повышенного содержания тестостерона, его концентрация в крови еще больше снижалась на П60 по сравнению с контрольными животными. Уровень тестостерона не изменялся после введения самкам анта-тестостерона по сравнению с животными, обработанными ЛПС. Кроме того, пренатальное воздействие ЛПС вызывало значительные структурные изменения гонад у самцов и самок. Анта-эстрадиол восстанавливал их структуру до нормы.

Нарушения полового созревания у крыс связаны, по-видимому, с высоким содержанием провоспалительных цитокинов у матери и плодов, индуцированным ЛПС [1, 3]. Их повышенный уровень приводит к нарушениям организации ГРГ-системы и гипофиза в мозге и гонад на периферии. Герминативные половые клетки крыс активно мигрируют в гонады на Э12, при этом женские половые клетки человека экспрессируют рецепторы к ИЛ-6 и ЛИФ [4]. Их своевременная миграция и первое мейотическое деление определяет строение и функционирование яичника в постнатальном периоде. У самцов же мигрировавшие половые клетки не проходят стадию мейотического деления и развитие семенника, начинающееся с активной пролиферации и миграции мезенхимных клеток, контролируется генетически обусловленными механиз-

мами. Наблюдаемое нами увеличение концентрации половых гормонов у самок и самцов в ювенильном возрасте провоцирует дальнейшее угнетение репродуктивной способности взрослых животных.

Выводы. Пренатальный иммунологический стресс, индуцированный ЛПС, вызывает нарушения развития репродуктивной системы крыс. Антагонисты рецепторов половых гормонов, введенные в ювенильный период, восстанавливают выявленные у самцов и самок нарушения до нормальных показателей. У самцов этот эффект обусловлен влиянием эстрадиола, а у самок, в большей степени,– подавлением эффекта тестостерона. Предполагается, что нарушения полового созревания обусловлены провоспалительными цитокинами: ИЛ-6, ЛИФ и МСР-1, содержание которых увеличивается у матери и плодов после пренатального воздействия ЛПС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharova V.S., Izvolskaia M.S., Zakharova L. A. Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation affects the Gonadotropin-Releasing Hormone neuron development in fetal mice / V. S. Sharova, M. S. Izvolskaia, L. A. Zakharova // Neuroimmunomodulation.– 2015.– V. 22.– P. 222-232.
2. Zakharova L.A., Izvolskaia M. S. In book: Sex Steroids «Interactions between the reproductive and immune systems during ontogenesis: the role of GnRH, sex steroids and immunomediators» / L. A. Zakharova, M. S. Izvolskaia // Zagreb: InTech, 2012.– P. 221-246.
3. Disruptions in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis in rat offspring following prenatal maternal exposure to lipopolysac / M. S. Izvolskaia, Y. Tillet, V. S. Sharova et al. // Stress.– 2016. Online: DOI: 10.3109/10253890.2016.1149695.
4. Developmentally regulated IL-6-type cytokines signal to germ cells in the human fetal ovary / S.L. Eddie1, A. J. Childs, H. N. Jabbour et al. // Mol. Hum. Reprod.– 2012.– V. 18.– P. 88-95.

SEX STEROIDS IN THE DISORDERS OF PUBERTAL DEVELOPMENT IN RATS PRENATALLY EXPOSED TO LPS

Izvolskaia M. S., Ignatuk V. M., Voronova S. N., Zakharova L. A.

Koltsov Institute of Developmental Biology, RAS, Moscow, Russia

Long lasting effects of the prenatal LPS-induced immunological stress on the reproductive system development in rats were investigated. Prenatal exposure to LPS *E. coli* (50 mkg/kg) causes a decrease of the GnRH level in the hypothalamus, as well as of the luteinizing hormone and sex steroid levels in plasma of adult offspring. Besides, structural changes of gonads are observed in males and females. In offspring the reproductive system descriptions were restored by the sex hormone-antagonist treatment during juvenile period. The effect is caused by estradiol in male and, more clearly, inhibition of testosterone in female rats. It is supposed that puberty disorders are caused by elevated levels of cytokines (IL-6, MCP-1 and LIF) in maternal-fetal system during prenatally LPS exposure.

Keywords: LPS, proinflammatory cytokines, sex steroids, reproductive system, rats.

ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОГО И ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ПРИ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ БЕРЕМЕННЫХ

Колесникова Н. В., Охременко О. С., Колесникова Е. В., Павлюченко И. И., Коков Е. А.

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

Цитокины, участвующие в регуляции универсальных патологических процессов с развитием иммунологического дисбаланса, а также нарушениями общей антиоксидантной защиты, при хронической ФПН на поздних сроках беременности подвержены достоверным изменениям: если для физиологической беременности характерным является двукратное увеличение антиоксидантно-цитокинового отношения относительно возрастной нормы, то диагностически значимым маркером хФПН можно считать достоверное его снижение в 2,5 раза. Учет состояния общей антиоксидантной активности и баланс про- и противовоспалительных цитокинов крови может существенно оптимизировать мониторинг течения беременности, обеспечить своевременную диагностику осложнений течения гестации для адекватной коррекции и снижения риска перинатальной патологии.

Ключевые слова: беременность, фетоплацентарная недостаточность, антиоксиданты, цитокины.

Актуальность. Дисбаланс в системе «про-антиоксиданты», обуславливающий развитие окислительного стресса (ОС), [1], во многом обусловлен нарушением механизмов антиоксидантной защиты, и создает неблагоприятные условия для осуществления репродуктивной функции женщины[2]. Известно, что между 10 и 12 неделями гестации (2 триместр беременности) развитие ОС считается естественным явлением, обусловленным активацией лейкоцитов и усиленной митохондриальной продукцией липидных пероксидов, свободных радикаловв плаценте, параллельно с нарастанием неферментных антиоксидантов (витаминов Е и С), а дальнейшее усиление антиоксидантной защиты в последствие отменяет ОС в организме [3]. В случаях более раннего развития ОС (между 8 и 9 неделями беременности) на фоне еще недостаточного локального уровня антиоксидантов не исключено окислительное повреждение трофобласта с последующим прекращением беременности [3]. Если же ОС развивается в самом начале беременности, то это может нарушить развитие плаценты и вызвать дегенерацию синтиоцитотрофобласта с последующей потерей беременности [4]. Исходя из способности прооксидантов модулировать синтез провоспалительных цитокинов, а антиоксидантов – предотвращать эти эффекты [5], а также опираясь на результаты проведенных ранее исследований антиоксидантного и цитокинового статуса периферической крови в поздние сроки физиологической беременности [6], интерес представляло исследование данных показателей у беременных с компенсированной хронической фетоплацентарной недостаточностью (хФПН) в третьем триместре беременности.

Цель. Оценить общую антиоксидантную активность, а также баланс основных про- и противовоспалительных цитокинов в периферической крови беременных с компенсированной хронической ФПН в поздние сроки гестации.

Материалы и методы. Обследовано 38 беременных в возрасте от 20 до 30 лет в поздние сроки (28-40 недель) гестационного процесса с лабораторно-инструментальными признаками компенсированной хФПН и (отсутствие косвенных признаков внутриутробной инфекции и синдрома задержки развития плода) – 1 группа; 2 группу (группу сравнения) составили 25 женщин благоприятного репродуктивного возраста (26,5±0,78 лет) с физиологически протекающей беременностью на тех

же ее сроках, а группу контроля – 25 небеременных здоровых женщин репродуктивного возраста (группа 3). При этом в плазме беременных женщин с помощью автоматического биохимического анализатора «RaytoSuperZ», Rayto, Китай) и набора реактивов NX 2331 (Randox, Великобритания) определяли общую антиоксидантную активность (АОА). Концентрацию провоспалительных цитокинов в сыворотке крови (ИЛ-1β, ИЛ-8, ИФНγ) и противовоспалительного ИЛ-10 определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург) на анализаторе «ASCENT» (Финляндия). Методика статистического анализа результатов включала расчет средней величины с вычислением средней арифметической «M», средней ошибки «m» и вероятности различий «p» с использованием компьютерной программы SPSS Statistics 17,0 для Microsoft. Сравнение средних двух выборок производилось с помощью критерия Стьюдента. Достоверными считались различия 95 % ($p \leq 0{,}01$-$0{,}05$).

Основные результаты. Исследованиями показано, что общая АОА периферической крови в поздние сроки физиологической беременности (ФБ) достоверно увеличивается в 1,4 раза относительно здоровых женщин репродуктивного возраста, тогда как наличие хронической ФПН в этот гестационный период отменяет данный эффект, вследствие чего АОА находится в пределах возрастной нормы. Наряду с этим у пациенток с хФПНв поздние сроки беременности имеет место увеличение сывороточной концентрации провоспалительного ИЛ1β, однако менее выраженное (в 2,3 раза), чем при ФБ (в 2,8 раза). Между тем, содержание провоспалительного ИЛ8 находится в пределах возрастной нормы при ФБ и имеет незначительную тенденцию к возрастанию, а при хФПН – в 13 раз превышает уровень ИЛ8 у небеременных женщин репродуктивного возраста. В отношении ИФНγ выявлен противоположный характер изменений, заключающийся в увеличении его концентрации у женщин с нормальной беременностью (в 2,2 раза) и в достоверном снижении относительно контроля (в 4,3 раза) и относительно ФБ (в 5,4 раза). При оценке противовоспалительного ИЛ10 обнаружено увеличение его содержания как при ФБ (в 2,9 раза), так и беременности, осложненной хФПН (в 1,8 раза). Исходя из разнонаправленного изменения содержания про- и противовоспалительных цитокинов при нормальной и осложненной беременности на поздних ее сроках, интерес представляла оценка отношения таковых, используя провоспалительный индекс (ПВИ), как отношение суммы провоспалительных ИЛ1β, ИЛ8, ИФНγ к концентрации противовоспалительного ИЛ10. Установлено, что при хронической ФПН наблюдается значительное увеличение величины ПВИ (в 2,8 раза) за счет усиления провоспалительного потенциала цитокинов, тогда как при ФБ баланс про- и противовоспалительных цитокинов крови соответствует возрастной норме. С учетом величины ПВИ и общей АОА было рассчитано их отношение, продемонстрировавшее выраженные нарушения антиоксидантно-цитокинового баланса при хронической ФПН. Так если при ФБ в поздние сроки характерным является достоверное двукратное увеличение показателя, то диагностически значимым маркером хФПН можно считать достоверное его снижение в 2,5 раза, обусловленное не только отсутствием адекватного увеличения АОА при беременности, но и существенным возрастанием доли провоспалительных цитокинов в ПВИ.

Анализируя полученные данные в целом, следует заключить, что цитокины, участвующие в регуляции универсальных патологических процессов с развитием иммунологического дисбаланса и нарушениями окислительного метаболизма, при хронической ФПН подвержены достоверным изменениям, учет которых может существенно оптимизировать мониторинг течения беременности, своевременно диагностировать наличие осложнений течения гестации и, соответственно, обеспечить их адекватную коррекцию и снижение риска перинатальной патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Al-Gubory K. H., Fowler P. A., Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes / K. H. Al-Gubory, P. A. Fowler, C. Garrel // Int. J. Biochem. Cell Biol.– 2010.– V.42.– P. 1634-1650.
2. Webster R.P., Roberts V.H., Myatt L. Protein nitration in placenta – functional significance / R. P. Webster, V. H. Roberts, L. Myatt // Placenta.–2008.– V.29.– P. 985-994.
3. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure / E. Jauniaux, A. L. Watson,

J. Hempstock et al. // Am. J. Pathol.– 2000.– V.157.– P. 2111-2122.
4. Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor / T. Cindrova-Davies, H. W. Yung, J. Johns et al. //Am. J. Pathol.– 2007.– V. 171.– P. 1168-1179.
5. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review / S. Gupta, A. Agarwal, J. Banerjee et al. // Obstet Gynecol. Surv.– 2007.– V.62.– P. 335-347.
6. Особенности антиоксидантно-цитокинового статуса в поздние сроки физиологической беременности / И. И. Павлюченко, Е. А. Коков, Н. В. Колесникова и др. // Журнал Теоретической и клинической медицины АН Узбекистана.– 2015.– № 4.– С. 143-146.

FEATURES ANTIOXIDANT AND CYTOKINE STATUS WITH PLACENTAL INSUFFICIENCY OF PREGNANT WOMEN

Kolesnikova N. V., Okhremenko O.S, Kolesnikova E. V., Pavlyuchenko I. I., Kokov E. A.

Kuban state medical University, Krasnodar, Russia

Cytokines, involved in the regulation of pathological processes universal with the development of immunological imbalance, as well as violations of the General antioxidant protection, chronic fetoplacental insufficiency (CFI) in late pregnancy exposed significant changes: if for physiological pregnancy characterized by a twofold increase of the antioxidant-cytokine relationship, a diagnostically important marker CFI can be considered reliable decreases in 2.5 times. The account status of the total antioxidant activity and the balance of Pro – and anti-inflammatory cytokines of the blood can significantly optimize the monitoring of the pregnancy, to diagnose the presence of complications during gestation and, consequently, to ensure their adequate correction and reduction of risk of perinatal pathology.

Keywords: pregnancy, fetoplacental insufficiency, antioxidants, cytokines.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ ПРЕЭКЛАМПСИИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Панова И. А., Рокотянская Е. А., Хлипунова Д. А., Сытова Л. А.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

Изучены особенности экспрессии молекул клеточной адгезии (CD11b, CD11c, CD31, CD49b, CD56, CD62L, CD99) нейтрофилами и моноцитами крови у беременных женщин с хронической артериальной гипертензией и с преэклампсией на фоне артериальной гипертензии. Выявлено, что дополнительными критериями для диагностики преэклампсии у беременных женщин с артериальной гипертензией могут служить уровень экспрессии моноцитами молекул $CD11b^+$ и показатель экспрессии нейтрофилами молекул $CD49b^+$.

Ключевые слова: беременность, артериальная гипертензия, преэклампсия, молекулы адгезии.

Актуальность проблемы поиска новых критериев диагностики присоединения преэклампсии (ПЭ) у женщин с хронической артериальной гипертензией (ХАГ) связана с тем, что артериальная гипертензия (АГ) у беременных является очень распространенным и опасным состоянием среди осложнений гестационного процесса. В последнее время отмечено увеличение распространенности АГ во время беременности за счет ее хронических форм [1]. По данным зарубежных авторов у 78 % женщин с тяжелой ХАГ и у 20-25 % беременных

с АГ 1 степени возникает ПЭ [2]. Затруднения в диагностике присоединившейся ПЭ у беременных с ХАГ могут возникнуть в связи с волнообразными изменениями артериального давления в течение беременности, его выраженным подъемом в конце гестационного срока [3]. Ни обострение гипертензии, ни отеки не являются надежными показателями развивающейся ПЭ. Нами ранее было показано, что развитие гипертензивных нарушений у беременных сопровождается изменением экспрессии молекул адгезии нейтрофилами, что может применяться для дифференциальной диагностики АГ различного генеза[4].

Цель настоящего исследования – разработать диагностические критерии присоединения ПЭ у беременных женщин с ХАГ на основании изучения экспрессии молекул клеточной адгезии (CD11b, CD11c, CD31, CD49b, CD56, CD62L, CD99) нейтрофилами и моноцитами венозной крови.

Материал и методы исследования. На базе ФГБУ «ИвНИИМиД им. В. Н. Городкова» Минздрава России было обследовано 114 беременных женщин в сроке 20-37 недель. Первую группу составили 36 женщин с ХАГ (шифр по МКБ-Х – О10), вторую – 33 пациентки с ХАГ с присоединившейся ПЭ (шифр по МКБ-Х – О11). В контрольную группу вошли 45 женщин с неосложненным течением беременности без гипертензивных расстройств.

Материалом для исследования являлась периферическая венозная кровь. Определение содержания моноцитов и нейтрофилов, экспрессирующих молекулы адгезии проводилось методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSCantoII (BectonDickinson, США). В нейтрофильном ($CD14^-CD45^+$) и моноцитарном ($CD14^+CD45^+$) гейтах определяли относительное содержание $CD62L^+$, $CD11b^+$, $CD11c^+$, $CD49b^+$, $CD31^+$, $CD56^+$, $CD99^+$ клеток. Статистический анализ полученных результатов осуществлялся в пакете прикладных лицензионных программ “MicrosoftOffice 2010”, “StatisticaforWindows 6.0” и “MedCalc v7.4.4.1”. Проверка рядов данных на нормальность распределения осуществлялась с помощью критериев Колмогорова и Шапиро-Уилка. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивалась по непараметрическому критерию U (Манна-Уитни) и t-критерию Стьюдента (уровень значимости $p<0,05$ считался достоверным).

Результаты. По результатам исследования экспрессии молекул клеточной адгезии нейтрофилами выявлено, что в группе женщин с ХАГ в периферической крови отмечался более высокий уровень $CD11c^+$, $CD99^+$ и $CD31^+$ нейтрофилов ($p<0,05$ во всех случаях по сравнению с контрольной группой). При ПЭ на фоне ХАГ, уровень $CD62L^+$ нейтрофилов был снижен, а относительное содержание $CD49b^+$, $CD99^+$ и $CD31^+$ клеток повышено по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$, $p<0,001$, $p<0,001$ и $p<0,001$ соответственно). Уровни $CD49b^+$ и $CD99^+$ нейтрофилов у женщин с ПЭ на фоне ХАГ были достоверно выше, а значение $CD11c^+$ достоверно ниже, чем в группе с ХАГ ($p<0,001$, $p<0,001$ и $p<0,05$соответственно).

Содержание клеток, экспрессирующих молекулы CD62L, CD11b, CD99, CD49b, CD31 в популяции моноцитов в обеих группах по сравнению с неосложненной беременностью не изменялось ($p>0,05$ во всех случаях). Уровень $CD11c^+$ моноцитов в группе с ХАГ снижался по сравнению с контрольной группой ($p<0,02$). У женщин с ПЭ и ХАГ в крови определялся сниженный уровень клеток $CD11c^+$ и повышенное содержание $CD56^+$ в популяции моноцитов по сравнению с контрольной группой ($p<0,02$ в обоих случаях). Уровень $CD11b^+$ клеток в популяции моноцитов у женщин с ПЭ на фоне ХАГ был достоверно повышен по сравнению с пациентками, имеющими ХАГ без ПЭ ($p<0,05$). Выявленные нами разнонаправленные изменения экспрессии молекул адгезии периферическими фагоцитами обусловлены различными патогенетическими механизмами формирования гипертензии при ПЭ и при ХАГ [5].

С целью выявления наиболее чувствительных и специфичных критериев диагностики присоединения ПЭ к ХАГ был проведен ROC-анализ. Выявлено, что наиболее информативными показателями в качестве диагностических критериев данной патологии являются: пограничное значение показателя экспрессии моноцитами молекул $CD11b^+$ – 80,5 %(площадь под ROC-кривой AUC=0,801, чувствительность 68,2 %, специфичность 76,2 %) и пограничное значение уровня экспрессии нейтрофилами молекул $CD49b^+$ –73,0 % (AUC=0,893, чувствительность 88,5 %, специфичность 91,7 %).

Таким образом, дополнительными критериями для диагностики ПЭ у беременных женщин с ХАГ могут служить определяемые

в периферической венозной крови уровень экспрессии моноцитами молекул $CD11b^+$ и показатель экспрессии нейтрофилами молекул $CD49b^+$, что позволит своевременно выявить развитие такого грозного осложнения гестационного процесса, как ПЭ и выбрать необходимую тактику ведения пациентки с ХАГ.

Работа поддержана Грантом Президента РФ № МК-6885.2015.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лечение артериальной гипертензии у беременных / О. В. Макаров, Е. В. Волкова, И. Н. Винокурова и др. // Проблемы репродукции.– 2011.– № 6.– С. 87-92.
2. Audibert, F., Benchimol, Y., Benattar, C. Prediction of preeclampsia or intrauterine growth restriction by second trimester serum screening and uterine Doppler velocimetry / F. Audibert, Y. Benchimol, C. Benattar // FetalDiagnTher.– 2005.– № 20.– P. 48.
3. Шехтман, М. М. Рук-во по экстрагенитальной патологии у беременных / М. М. Шехтман.– Москва: Триада-Х, 2005.– 816 с.
4. Характеристика зрелости и адгезионной способности нейтрофилов при преэклампсии / И. А. Панова, А. В. Кудряшова, Д. А. Хлипунова и др.// Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8(17), № 3(1).– С. 360-364.
5. Lindheimer, M.D., Taler, S.J., Cunningham, F. G. Hypertension in pregnancy / M. D. Lindheimer, S. J. Taler, F. G. Cunningham // Journal of the American Society of Hypertension.– 2010.– № 4(2).– P. 68-78.

IMMUNOLOGICAL CRITERIA FOR DIAGNOSIS OF PREECLAMPSIA IN PREGNANT WOMEN WITH CHRONIC ARTERIAL HYPERTENSION

Panova I. A., Rokotyanskaya E. A., Khlipunova D. A., Sytova L. A.

Federal State Institution «Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood named V. N. Gorodkova» the Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovo, Russia

The peculiarities of expression of cell adhesion molecules (CD11b, CD11c, CD31, CD49b, CD56, CD62L, CD99) neutrophils and monocytes venous blood in pregnant women with chronic arterial hypertension and preeclampsia on the background of chronic arterial hypertension. It is revealed that supplementary criteria for the diagnosis of preeclampsia in pregnant women with chronic arterial hypertension can be a level of expression of molecules by monocytes $CD11b^+$, and the rate of expression by neutrophils of molecules $CD49b^+$.

Keywords: pregnancy, arterial hypertension, preeclampsia, adhesion molecules.

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *HLA-G* (rs66554220) С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН

Гордеева Л. А.[1], Оскорбина О. С.[1], Воронина Е. Н.[2], Шаталина И. В.[1], Оленникова Р. В.[3], Нерсесян С. Л.[3], Филипенко М. Л.[2], Глушков А.Н.[1]

[1]ФГБУН ФИЦ УУХ СО РАН, Институт экологии человека СО РАН, Кемерово; [2]ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; [3]ГАУЗ Кемеровская областная клиническая больница. Медико-генетическая консультация, Кемерово, Россия

Изучали ассоциации полиморфизма гена *HLA-G*(rs66554220) с риском невынашивания беременности у женщин. Исследование показало, что генотип +14bp/+14bp гена *HLA-G* ассоциирован с риском НБ у женщин (OR=2,78, 95 %CI:1,34-5,78), которое сопровождается ≥3 самопроизвольными выкидышами на ранних сроках беременности.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, *HLA-G*, невынашивание беременности.

Невынашивание беременности (НБ) до сих пор остается актуальной проблемой репродуктивной медицины. Иммунологические факторы рассматриваются как одна из ключевых причин НБ ранних сроков. Уникальная экспрессия антигенов G Главного комплекса гистосовместимости человека (HLA-G) в зоне распределения материнского и плодового кровотока позволила предположить, что эти неклассические HLA играют особую роль в регуляции материнского иммунного ответа. Возможно, именно HLA-G служат ключом к иммунологической загадке выживания плода [1].

Ранее установлено, что полиморфизм в 3'нетранслируемой области гена *HLA-G* – делеция/инсерция 14 п.н. (–14bp/+14bp) в положении 3741 экзона 8(rs66554220) оказывает влияние на уровень экспрессии гена и стабильность мРНК. У людей аллель ins14bp (генотип +14bp/+14bp) ассоциирован с пониженным количеством мРНК HLA-G и с низкими плазматическими уровнями растворимых изоформ HLA-G по сравнению с аллелем –14bp (генотипами –14bp/+14bp и –14bp/–14bp) [2]. Два недавно проведенных мета-анализа показали прямо противоположные результаты связи полиморфизма гена *HLA-G* (–14bp/+14bp) с НБ у женщин [3; 4].

Поэтому **целью** настоящей работы стало изучение ассоциации полиморфизма гена *HLA-G*(rs66554220) с риском НБ у женщин в ранние сроки.

Материалы и методы. Исследуемую группу (НБ) составили 112 образцов ДНК женщин с невынашиванием беременности в ранние сроки (до 12 недель). На момент обследования женщины не были беременными и находились на реабилитации после очередного выкидыша. Критериями включения в исследование для женщин были: а) отсутствие в анамнезе женщин медицинских абортов, родов и внематочных беременностей; б) наличие 2 и более выкидышей; в) отсутствие врожденных аномалий развития матки; г) нормальная спермограмма супруга; д) отсутствие аномалий в кариотипе обоих супругов. Группу сравнения (контроль) составили образцы ДНК 343 женщин, у которых во время настоящей и предыдущих беременностей отсутствовали спонтанные выкидыши и врожденные аномалии развития у плода (ребенка). Все обследуемые женщины дали письменное информированное согласие на участие в исследовании и принадлежали к русской этнической группе.

Генотипирование: полиморфизм гена *HLA-G* (rs66554220) определяли с помощью электрофоретического разделения продуктов амплификации. Каждый образец ДНК амплифицировался с использованием пары специфических праймеров: 5'-taaagtgtcacccctcactgt-3' (прямой) и 5'-gagtcagggttcttgaagtca-3' (обратный). Реакцию амплификации проводили на термоциклере «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», Россия).

Статистическая обработка данных: соответствие частот генотипов гена HLA-G равновесию Харди-Вайнберга в изучаемых группах, а также их сравнение между группами оценивали с помощью критерия χ^2. Нулевую гипотезу отвергали при $P \leq 0{,}05$. Силу ассоциации анализируемых признаков определяли с помощью величины отношения шансов (OR). Для OR рассчитывали доверительный интервал (CI) при 95 % уровне значимости.

Основные результаты. Анализ распределения частот генотипов гена *HLA-G* у женщин изучаемых групп показал их соответствие ожидаемым частотам при равновесии Харди-Вайнберга (P>0,05). Есть предположение, что полиморфизм гена *HLA-G*(–14bp/+14bp) у женщин влияет только на риск трех и более спонтанных выкидышей [4]. Поэтому мы изучали распределение частот встречаемости генотипов гена *HLA-G* в зависимости от количества самопроизвольных выкидышей у женщин. В связи с этим женщины с НБ были поделены на две подгруппы: 2 (n=76) и ≥3 (n=34) самопроизвольных выкидыша. Наше исследование показало, что наблюдается высокая частота встречаемости генотипа +14bp/+14bp гена *HLA-G*(41,2 %) в подгруппе женщин с ≥3 самопроизвольными выкидышами по сравнению с контролем (20,1 %, χ^2=8,44, d(f)=2, P=0,009), но не с подгруппой женщин с 2 выкидышами (26,7 %, χ^2=3,62, d(f)=2, P=0,16). Риск возникновения ≥3 самопроизвольных выкидышей у женщин с генотипом +14bp/+14bp гена *HLA-G* может увеличиваться почти в три раза (OR=2,78, 95 % CI: 1,34-5,78). Распределение частот генотипов гена *HLA-G* у женщин с 2 самопроизвольными выкидышами и в контрольной группе было равновероятным (χ^2=1,58, d(f)=2, P=0,45).

Таким образом, наше исследование показало, что генотип +14bp/+14bp гена *HLA-G* ас-

социирован с риском НБ у женщин, которое сопровождается 3-мя и более самопроизвольными выкидышами на ранних сроках беременности. Наши результаты согласуются с результатами мета-анализа, проведенного Fan W. с соавторами [4], но расходятся с результатами другого мета-анализа [3]. Возможно, что у беременных женщин 2 выкидыша могут иметь случайные причины, иногда даже не связанные друг с другом. По-видимому, реализация 3-х и более выкидышей на ранних этапах беременности может носить системный характер, сопровождаемый иммунными нарушениями в системе мать-плод. Поскольку аллель +14bp (генотип +14bp/+14bp) гена HLA-G ассоциирован с низкой продукцией белка HLA-G, то, вероятно, во время беременности у его носительниц с 3-мя и более самопроизвольными выкидышами может возникать отмена иммунологической толерантности матери по отношению к антигенам плода отцовского происхождения за счет активации цитотоксического аллоиммунного ответа [1, 2]. Ограничением нашего исследования является небольшое количество женщин с 3-мя и более самопроизвольными выкидышами, поэтому для того чтобы подтвердить наше предположение требуется продолжить исследование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сотникова Н. Ю. Иммунологическая загадка беременности / Н. Ю. Сотникова, Ю. С. Анциферова, А. В. Кудряшова, и др.// Иваново: Издательство МИК, 2005. – 276 с.
2. Lynge Nilsson L., Djurisic S., Hviid T. V. Controlling the immunological crosstalk during conception and pregnancy: HLA-G in reproduction / L. Lynge Nilsson, S. Djurisic, T. V. Hviid // Front Immunol. – 2014. – V.5. – P. 198. doi: 10.3389/fimmu.2014.00198. eCollection 2014.
3. Wang X., Jiang W., Zhang D. Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis / X. Wang, W. Jiang, D. Zhang // Tissue Antigens. – 2013. – V.81, № 2. – P. 108-115.
4. Relationship between HLA-G polymorphism and susceptibility to recurrent miscarriage: a meta-analysis of non-family-based study / W. Fan, S. Li, Z. Huang et al. // J. Assist. Reprod. Genet. – 2014. – V.31, № 2. – P. 173-184.

ASSOCIATION OF *HLA-G*(rs66554220) GENE POLYMORPHISM WITH RECURRENT MISCARRIAGE IN WOMEN

Gordeeva L. A.[1], Oskorbina O. S.[1], Voronina E. N.[2], Shatalina I. V.[1], Olennikova R. V.[3], Nersesyan S. L.[3], Filipenko M. L.[2], Glushkov A. N.[1]

[1]Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo; [2]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk; [3]Kemerovo Regional Clinical Hospital, Genetic Consultation, Kemerovo, Russia

The associations of *HLA-G*(rs66554220) gene polymorphism with risk of recurrent miscarriage (RM) in women were investigated. It is found that genotype +14bp/+14bp gene *HLA-G* is associated with risk of RM in women (OR = 2,78, 95 %CI: 1,34-5,78) with ≥3 early pregnancy loss.

Keywords: genetic polymorphism, *HLA-G*, recurrent miscarriage.

ОБСЛЕДОВАНИЕ БЕРЕМЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ НЕИНВАЗИВНЫХ СКРИНИНГОВЫХ ПРОГРАММ

Цигулева О. А., Обухова Л. Е., Барсукова Н. И.

Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

Обследовано 209 беременных в I и II триместрах. Методы обследования включали УЗИ матки и придатков, определение уровня маркеров беременности при помощи иммуноферментного анализа (ИФА). В I триместре в группу риска отобраны 37 беременных. Патология кариотипа выявлена в 7 случаях, в том числе синдром Дауна. Во II триместре беременности группу высокого риска составили 69 беременных, но хромосомная патология не была выявлена ни у одной пациентки. Мы пришли к выводу, что хромосомные аберрации у эмбриона возможно с высокой достоверностью выявить в I триместре, не дожидаясь результатов инвазивных методов, применяемых во II триместре.

Ключевые слова: беременность, скрининг, хромосомные аберрации, кариотип, иммуноферментный анализ.

Генетический контроль иммунного ответа происходит при зарождении эмбриона в матке. Клетки трофобласта экспрессируют необычную комбинацию антигенов I класса главного комплекса гистосовместимости. Их особенностью является выраженная связь с натуральными киллерами (NK), гораздо более интенсивная, нежели с Т-лимфоцитами. Децидуальную ткань матки инфильтрирует большое количество NK клеток, накопление которых совпадает с периодом имплантации. В этот период Т- и В-клетки в децидуальной ткани встречаются крайне редко. Так формируется иммунологическая толерантность периода беременности, которая служит гарантией вынашивания плода, но не снимает риск развития хромосомных патологий зародыша.

Неинвазивный скрининг позволяет выявить беременных с высоким риском рождения ребенка с хромосомной патологией. Неинвазивный скрининг возможен только в I триместре. Во II триместре для получения искомой информации осуществляется инвазивное вмешательство: биопсия хориона, плаценто-амнеоцентез или кордоцентез [1,3].

Целью нашей работы являлось изучение эффективности неинвазивного скрининга с помощью маркеров, определяемых с помощью иммуноферментного анализа, ультразвукового исследования, компьютерного анализа.

Нами обследовано 209 беременных в I и II триместрах, в динамике. Методы обследования включали УЗИ матки и придатков, определение уровня маркеров беременности при помощи иммуноферментного анализа (ИФА): свободной β-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β-ХГЧ), белка плазмы крови, ассоциированного с беременностью (PAPP-A), α-фетопротеина (AFP), эстриола (E3). Компьютерный анализ осуществлялся с применением программ LifeCycle в I триместре и PRISCA – во II.

По результатам неинвазивной диагностики все беременные, без учета возрастного фактора, разделены на две группы: с низким и высоким риском рождения ребенка с хромосомной патологией. В I триместре беременности по данным компьютерного анализа в группу низкого риска вошли 162 женщины, в группу высокого – 37. Высокий риск хромосомной патологии был связан с подъемом β-ХГЧ и PAPP-A. По данным эхографии увеличение размеров воротниковой области плода зафиксировано у 12 беременных и составляло от 2 до 8 мм. Таким образом, отобранной в группу риска, оказалась каждая 5 беременная. Патология кариотипа выявлена в 4 случаях – это трисомия 21 хромосомы (синдром Дауна), который является одной из форм олигофрении. Данная патология встречается в среднем

с частотой 1:500 новорожденных. Следует отметить, что риск рождения ребенка с синдромом Дауна возрастает с увеличением возраста матери. В 2 случаях была выявлена трисомия 18 хромосомы – синдром Эдвардса – болезнь характеризующаяся множественными пороками органов, встречающаяся с частотой 1:6000 новорожденных. У одной пациентки выявлена трисомия 13 хромосомы – синдром Патау, при котором наблюдаются тяжелые врождённые пороки. Дети с синдромом Патау рождаются с частотой 1:7000. У них выявляются умеренная микроцефалия, нарушение развития различных отделов ЦНС, микрофтальмия, помутнение роговицы, пороки развития сердца, фиброкистозные изменения поджелудочной железы. Большинство детей с синдромом Патау умирают в течение первых нескольких недель после рождения. Женщинам с хромосомными аберрациями плода (подтвержденными исследованием кариотипа) беременность была прервана на сроке 9-10 недель. Остальная группа риска продолжала наблюдение. Показания скринига ухудшались только у 2 из них, что объяснялось возрастным фактором этих беременных – одной из них было 44 года, второй – 45 лет. При изучении анамнеза женщин из группы высокого риска установлено, что у 17 было первичное или вторичное бесплодие, у 8 – невынашивание беременности с повторными выкидышами. Во II триместре беременности группу высокого риска составили 69 беременных, из которых ранее (в I триместре) 39 имели низкий риск. Высокий риск подтверждался ростом AFP, снижением E и повышением ХГЧ. По эхографии возможной хромосомной патологии не отмечалось. В анамнезе женщины, попавшие в группу риска во II триместре, имели первичное или вторичное бесплодие, фетоплацентарную недостаточность, внутриутробную задержку развития плода. Хромосомная патология во II триместре не выявлена ни у одной пациентки.

Ложноположительные результаты во II триместре лишь свидетельствовали в пользу большей достоверности неинвазивного скрининга в I триместре. По данным ряда авторов суммарный риск должен быть основан на показателях I и II триместра [4]. В то же время, большинство исследователей считают, что синдром Дауна вполне можно выявить уже в I триместре [5].

В нашей работе использование скрининга с помощью ультразвукового и иммуноферментного анализа позволило определить беременных группы риска, у которых уже в I триместре у плодов были диагностированы синдром Дауна, Эдвардса и Патау.

Частота ложноположительных результатов была довольно высока, но изменения иммунных маркеров беременности не носили закономерного характера и, в большинстве случаев, были связаны с акушерской патологией или возрастом беременных. Ложноположительные результаты во II триместре беременности значительно превышали частоту таковых в I триместре, что обусловлено значительным изменением уровня ХГЧ и Е.

Поскольку данные маркеры являются предикторами фетоплацентарной недостаточности, их связь с рождением ребенка с хромосомной аберрацией была сомнительной, они указывали скорее на наличие акушерской патологии.

Выводы. Учитывая данные исследования, мы пришли к выводу, что хромосомные аберрации у эмбриона при наличии высокой степени риска возможно с высокой достоверностью выявить в I триместре, не дожидаясь результатов инвазивных методов, применяемых во II триместре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барашнев Ю. И., Бахарев В. А. Эмбриофетопатопатии / Ю. И. Барашнев, В. А. Бахарев.– М.: Триада-Х, 2, 2010.– С. 343-396.
2. Алгоритм пренатального мониторинга / В. И. Кулаков, В. Н. Серов, В. Н. Демидов и др. // Акуш. И гин.– 2000.– № 5.– С. 56-59.
3. Prospective first – trimester screening for trisomy 21 in 30, 564 pregnancies et al. / K. Avigdou, A. Papageorghiou, R. Bindra et al. // Am J. Obstet. Gynecol.– 2005.– V. 192.– P. 1761-1767.
4. Been P. A., Donnenfeld A. F. Sequential down syndrome screening: The impotalance of first and second trimester test correlations when calculating risk / P. A. Been, A. F. Donnenfeld // Cenet. Conseling.– 2005.– V. 10.– P. 6390-6397.
5. First-trimester screening of second – trimester screening, or both, for Down's syndrome / F. D. Malone, J. A. Canick, R. H. Ball et al. // N. Engl. J. Med.– 2005.– V. 353.– P. 2001-2011.

MEDICAL EXAMENATION OF PRENNANT WOMEN BY NONIVASIVE SCREENING

Tsiguleva O. A., Obuhova L. E., Barsukova N. I.

Altai State Medical University, Barnaul, Russia

A total of 209 pregnant women in I and II trimesters. Survey methods include ultrasound of the uterus and appendages, pregnancy determination of the level markers using enzyme immunoassay (EIA). In the I trimester the risk group selected 37 pregnant women. Pathology karyotype detected in 7 cases, including Down's syndrome. In the II trimester of pregnancy is high-risk group consisted of 69 pregnant women, but the chromosomal abnormality was not detected any one patient. We came to the conclusion that the chromosome aberrations in the embryo might identify with high confidence in the I trimester, without waiting for the results of the invasive methods used in the II trimester.

Keywords: pregnancy, screening, chromosomal aberrations, karyotype, enzyme immunoassay.

ПОЛИМОРФНЫЕ МАРКЕРЫ ГЕНА *CSF1R* rs386693509, rs3216780 (3`UTR ОБЛАСТИ ГЕНА) И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОЦЕДУРЫ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ (ЭКО) У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ

Лапштаева А. В.[1], Радаева О. А.[1], Новикова Л. В.[1], Ефремов И. А.[2]

[1]ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н. П. Огарева», Саранск; [2]ФГБУН «ИБХФ им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия

Целью исследования стал анализ прогностического значения полиморфных маркеров гена *CSF1R* в rs386693509, rs3216780 в 3'UTR гена в отношении наступления беременности у женщин с бесплодием в результате цикла ЭКО. При анализе комбинаций полиморфных вариантов маркеров гена *CSF1R* выделены прогностически благоприятные сочетания полиморфных вариантов TC/CA в rs386693509 и DEL/G в rs3216780 в 3'UTR области гена для эффективной процедуры ЭКО.

Ключевые слова: M-CSF, *CSF1R*, ЭКО, цитокины.

Актуальность. Несмотря на внедрение в практику современных методов лечения бесплодия с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, и прежде всего ЭКО, частота наступления беременности все еще остается низкой [1]. По данным специалистов, в 70 % случаев причиной неэффективности программы ЭКО является отсутствие имплантации. [2]. Инвазия трофобласта и начальные этапы плацентации контролируются M-CSF[3]. Свои биологические эффекты он реализует через рецептор CSF1R[4].

Цель работы – проанализировать связь полиморфных маркеров гена *CSF1R* rs386693509, rs3216780 в 3'UTR области гена у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием с успешностью процедуры ЭКО.

Материалы и методы. В исследование были включены 60 женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия в возрасте 26-45 лет, с протоколом ЭКО, завершившимся переносом эмбрионов. Использовали короткий протокол стимуляции суперовуляции. Контрольную группу составили 50 практически здоровых женщин с доказанной фертильностью, имеющих от 1 до 3 здоровых детей. Первичным результатом считали наступление беременности по результатам УЗИ, проведенного че-

рез 14 дней после получения положительного результата ХГЧ. Материалом для генетического исследования служили образцы ДНК, выделенные из венозной крови на автоматической станции QIAcube с использованием набора реагентов QIAamp DNA MiniKit (оборудование и реактивы производства QIAGEN, Германия). В гене *CSF1R* методом ПЦР с последующим секвенированием на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 с использованием наборов для циклического сиквенса BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencingKit и соответствующего программного обеспечения к прибору, согласно инструкции производителя (AppliedBiosystems, США), исследовали следующие полиморфные маркеры: rs3216780 и динуклеотидный полиморфизм rs386693509 в 3'UTR области гена. Анализ нуклеотидных последовательностей для исследуемых образцов выполняли с помощью программ PeakTrace, SequenceScannerv.1.0, ChromasLite 2.1.1, VectorNTIAdvance 10. В качестве референтной использовали нуклеотидную последовательность NG_012303.1. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Достоверность различий в распределении частот генотипов между группами выявляли путем сравнения выборки с использованием критерия χ^2 с поправкой Иейтса и точного критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$. Вероятность наступления беременности по конкретному признаку вычисляли как отношение шансов с расчетом для него 95 % доверительного интервала (ДИ).

Результаты. Достоверных различий распределения полиморфных вариантов в rs386693509 в 3'UTR области гена *CSF1R* между женщинами с бесплодием (TC/TC – 58,3 % (35 чел.), CA/CA – 6,7 % (4 чел.), TC/CA – 35 % (21 чел.)) и здоровыми женщинами выявлено не было (TC/TC – 60 % (30 чел.), CA/CA – 10 % (5чел.), TC/CA – 30 % (15 чел.)), $\chi^2=0,32$, $p>0,05$. При анализе динуклеотидного полиморфизма в rs386693509 в 3'UTR области гена *CSF1R* определено, что у женщин с неэффективностью цикла ЭКО частота генотипов TC/TC и CA/CA достоверно выше (TC/TC – 71,4 % (30 чел.), CA/CA – 7,2 % (3 чел.)), а частота генотипа TC/CA достоверно ниже (TC/CA – 21,4 % (9 чел.)), по сравнению с группой женщин с наступившей беременностью (TC/TC – 27,8 % (5 чел.), CA/CA – 5,5 % (1 чел.), TC/CA – 66,7 % (12 чел.)), $\chi^2=11,5$, $p<0,01$. Генотип TC/CA (OR=7,33, 95 % ДИ =[2,15-25], $p<0,01$) выступает как условно прогностически благоприятный для наступления беременности. При изучении распределения полиморфных вариантов rs3216780 в 3'UTR области гена *CSF1R* у женщин с бесплодием (G/G – 40 % (24 чел.), DEL/G – 55 % (33 чел.), DEL/DEL – 5 % (3 чел.)), и у женщин контрольной группы не было выявлено достоверных различий (G/G – 32 % (16 чел.), DEL/G – 60 % (30 чел.), DEL/DEL – 8 % (4 чел.)), $\chi^2=0,65$, $p>0,05$. При анализе полиморфного маркера rs3216780 в 3'UTR области гена CSF1R обнаружено, что у женщин с не наступившей беременностью после цикла ЭКО частота генотипов G/G и DEL/DEL была достоверно выше (G/G – 50 % (21 чел.), DEL/DEL – 7,1 % (3 чел.)), а DEL/G (DEL/G – 42,9 % (18 чел.) ниже, по сравнению с группой женщин с успешной процедурой (G/G – 16,1 % (2 чел.), DEL/DEL – 5,6 % (1 чел.), DEL/G – 83,3 % (15 чел.)), $\chi^2=8,77$, $p<0,05$. Можно полагать, что генотип DEL/G (OR=6,67, 95 % ДИ [1,67-26,5], $p<0,01$) выступает как условно прогностически благоприятный для наступления беременности в процессе ЭКО. Сравнивая сочетание полиморфных вариантов TC/CA в rs386693509 и DEL/G в rs3216780 в 3'UTR области гена *CSF1R* у женщин с бесплодием, было обнаружено, что у женщин с успешной процедурой ЭКО сочетание TC/CA в rs386693509 и DEL/G в rs3216780 в 3'UTR области гена выше (TC/CA и DEL/G – 66,7 % (12 чел.)), по сравнению с группой женщин с отрицательной процедурой (TC/CA и DEL/G – 21,4 % (9 чел.)). Таким образом, у женщин сочетание полиморфных вариантов TC/CA в rs386693509 и DEL/G в rs3216780 в 3'UTR области гена *CSF1R* (OR=12,0, 95 % ДИ =[3,25-44,3], $p<0,01$) выступает как прогностически благоприятный для наступления беременности. Следует также отметить, что у женщин с генотипом TC/TA в rs386693509 во время беременности уровень артериального давления, как значимого фактора, осложняющего развитие беременности и повышающий риск осложнений был выше, чем при варианте TC/TC. Однако, анализ достоверности ограничен числом наблюдений и требует дальнейшего изучения, так как по некоторым данным [5] именно полиморфный вариант *CSF1R* TC/TA в rs386693509 соотносится с повышенным риском эссенциальной артериальной гипертензии в старшем возрасте. Полученные данные обосновывают актуальность дальнейшего

изучения генетических особенностей *CSF1R* у женщин с бесплодием, участвующих в программе ЭКО.

Работа выполнена в рамках программы «У.М.Н.И.К.» при поддержке «Фонда содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере» по договору № 684ГУ/2015 от 30.07.2015 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Есина Е. В., Логина Н. Ю., Аляутдна О. С. Роль иммунных взаимодействий в развитии бесплодия: обзор литературы / Е. В. Есина, Н. Ю. Логина, О. С. Аляутдна // Русский медицинский журнал.– 2013.– № 1.– С. 44-48.
2. Боярский, К.Ю., Гайдуков, С.Н., Пальченко, Н. А. Современный взгляд на проблему рецептивности и тонкого эндометрия в программах ВРТ (обзор литературы) / К. Ю. Боярский, С. Н. Гайдуков, Н. А. Пальченко // Проблемы репродукции.– 2013.– № 4.– С. 51-60.
3. Expression of colony-stimulating factor-1 in the human uterus and placenta / E. Daiter, S. Pampfer, Y. G. Yeung et al. // J Clin Endocrinol Metab.– 1992.– № 74 (4).– P. 850-858.
4. Bourette R. P., Rohrschneider L. R. Early events in M-CSF receptor signaling / R. P. Bourette, L. R. Rohrschneider // Growth Factors.– 2000.– № 17.– P. 155-166.
5. Радаева О. А., Симбирцев А. С. Взаимосвязь изменений уровней цитокинов с риском развития метаболического синдрома (МС) у больных с эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ) / О. А. Радаева, А. С. Симбирцев // Медицинская иммунология.– 2015.– Т. 17, № 6.– С. 300.

POLYMORPHIC MARKERS OF THE GENE *CSF1R* rs386693509, rs3216780 (3′UTR OF AREA OF THE GENE) AND POTENCY OF PROCEDURE OF IN VITRO FERTILIZATION (IVF) FOR WOMEN WITH INFERTILITY

Lapshtaeva A. V.[1], Radaeva O. A.[1], Efremov I. A.[2]

[1]Ogarev Mordovia State University, Saransk; [2]Institute of biochemical physics of N. M. Emanuel Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The analysis of predictive value of polymorphic markers of a gene *CSF1R* rs386693509, rs3216780 in 3'UTR of area of the gene for women with infertility concerning approach of pregnancy as a result of cycle IVF became a research objective. In the analysis of combinations of variations of markers a gene of *CSF1R* for women with infertility favorable combinations of polymorphic variations of the TC/CA in rs386693509 and DEL/G in rs3216780 in 3'UTR of area of a gene for efficiency of the IVF are allocated predictively.

Keywords: M-CSF, *CSF1R*, IVF, cytokines.

СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА М В ЭЯКУЛЯТЕ ПРИ БЕССИМПТОМНОЙ БАКТЕРИОСПЕРМИИ

Годовалов А. П., Карпунина Т. И., Даниелян Т. Ю.

ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера, Пермь, Россия

В ходе проведенных исследований установлено, что при бессимптомной бактериоспермии микроорганизмы, нарушая проницаемость гемато-тестикулярного барьера, повышают содержание иммуноглобулинов в эякуляте. Присутствие энтеробактерий сочетается с максимально высоким уровнем IgM.

Ключевые слова: бессимптомная бактериоспермия, иммуноглобулины класса М, условно патогенные микроорганизмы.

В проведенных ранее исследованиях показано, что в нарушении фертильности значительную роль играют микроорганизмы, адгезирующиеся к сперматозоидам. К тому же массивное обсеменение эякулята условно патогенными бактериями (УПБ) является одной из возможных причин образования значительного количества антител, присутствие которых коррелирует с изменением качественных и количественных характеристик мужских половых клеток [1]. Микроорганизмы могут играть роль в изменении проницаемости гемато-тестикулярного барьера, который ограничивает прохождение многих веществ из крови. Показано, что концентрация "крупных" молекул в семенной жидкости составляет менее 2% от их содержания в крови [2]. В связи с этим, обнаружение в эякуляте иммуноглобулинов (Ig), особенно класса М (970 кДа), обычно считается признаком патологического состояния.

Цель исследования – определить содержание IgM в эякуляте мужчин с бессимптомной бактериоспермией.

Материалы и методы. Проведено микробиологическое исследование эякулята 48 субфертильных мужчин, не предъявлявших жалоб, указывающих на неблагополучие в урогенитальном тракте. Стрепто- и энтерококки изолировали на кровяном агаре, стафилококки выделяли на желточно-солевом агаре (ЖСА), грибы рода *Candida* – на среде Сабуро, энтеробактерии определяли при высеве на агар Эндо, анаэробы – на обогащенной среде для контроля стерильности, разлитой «высоким столбиком» по пробиркам. Количество выделенных микроорганизмов выражали в виде значения десятичного логарифма числа КОЕ/мл биологического материала.

Концентрацию суммарных IgM в эякуляте определяли с помощью иммуноферментной тест-системы (Вектор-Бест, Новосибирск) согласно инструкции производителя. Уровень общего белка в спермальной жидкости регистрировали с помощью биуретовой реакции, а альбумина – в реакции с бромкрезоловым зеленым с использованием соответствующих наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Концентрацию IgM пересчитывали на 1 г белка. Статистический анализ данных проводили с использованием непарного варианта **t**-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. По результатам проведенных исследований образцы эякулята всех мужчин разделили на две группы. В образцах 1-й группы (n=32) обнаружены грамположительные кокки, которые в 84% случаев были представлены бактериями рода *Staphylococcus*. Коагулазоотрицательные виды выявлены в каждом втором, коагулазопозитивные – в 6% образцов. Стрептококки, присутствовавшие в 44% случаев, выделены, в основном, в ассоциации со стафилококками (71,4%). Половина представителей *Streptococcus* относилась к *S. viridans*, а 29% – к *S. agalactiae*. Общее микробное число в 1-й группе – 4,5±0,3 lg КОЕ/мл. В 56% образцов 2-й группы (n=16) обнаружены *Escherichia coli*, в 12% – *Klebsiella pneumoniae*, в 12% – *Citrobacter diversus*, а также другие энтеробактерии в единичных случаях. В эякуляте 7 пациентов отмечено присутствие только энтеробактерий, а в остальных – их ассоциации с грамположительными кокками. Так, в 44% случаев энтеробактерии обнаружены в ассоциации с коагулазоотрицательными, а в 13% – с коагулазоположительными стафилококками. Общее микробное число во 2-й группе – 5,4±0,3 lg КОЕ/мл (достоверно выше, чем в 1-й группе, $p<0,05$).

Известно, что локальное изменение концентрации альбумина характеризует состояние и степень проницаемости гисто-гематических барьеров, так как этот белок сыворотки крови не продуцируется местно, а попадает в очаги воспаления только за счет диффузии [3]. Концентрация альбумина в спермоплазме мужчин 1-й группы составила 34,2±0,9 г на 1 г общего белка, а у пациентов 2-й группы – 39,2±2,2 г/г белка ($p<0,05$). Во всех случаях содержание альбумина в семенной жидкости обследованных мужчин было выше, чем у мужчин с подтвержденной фертильностью [4], что указывает на изменение проницаемости гемато-тестикулярного барьера при бактериоспермии. При этом доминирующего влияния какого-то вида микроорганизмов на концентрацию альбумина в спермоплазме не выявлено. Концентрация IgM в эякуляте мужчин 1-й группы составила 3,4±0,4, а во 2-й – 5,3±0,8 мг/г белка ($p<0,05$). Прослеживается тенденция зависимости уровня IgM от грампринадлежности и таксономии изолируемых УПМ, что может быть обусловлено особенностями их взаимодействия с эффекторами иммунной системы [5]. Так, в семенной жидкости, инфицированной *S. aureus*, концентрация IgM составила 2,0±0,9 мг/г белка. Присутствие в эякуляте

E. coli сопровождалось увеличением содержания IgM до 6,7±1,3 мг/г белка, а *K. pneumoniae* – до 11,4±0,3 мг/г белка. В случаях смешанных ассоциаций, состоящих из грамположительных кокков и энтеробактерий, наблюдалось колебание концентрации IgM в широком диапазоне от 1 до 12 мг/г белка.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что при бессимптомной бактериоспермии в семенной жидкости регистрируются разнообразные таксоны, с преобладанием грамположительных видов. При отсутствии субъективных жалоб, происходит нарушение целостности/проницаемости гемато-тестикулярного барьера, а инфицирующие гениталии УПБ, очевидно, способны стимулировать развитие локального иммунного ответа. В подобной ситуации в эякуляте увеличивается концентрация IgM, оказывающих неблагоприятное действие на репродуктивный потенциал, вызывая агглютинацию сперматозоидов и активацию системы комплемента. Присутствие грамотрицательных энтеробактерий сочетается со значительным повышением уровня IgM, что может быть связано с более высокой степенью обсемененности семенной жидкости этими бактериями и особенностями иммуномодулирующих факторов представителей семейства *Enterobacteriaceae* [5].

В целом, при бессимптомной бактериоспермии, обусловленной УПБ, на фоне нарушения проницаемости гемато-тестикулярного барьера наблюдается активация иммунного ответа, в частности, локальное повышение содержания IgM, коррелирующее с грампринадлежностью и таксономией, а также численностью изолируемых бактерий. Для уточнения происхождения и роли детектируемых IgM целесообразна оценка их специфичности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта «р_а 16-44-590429».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Годовалов А. П., Карпунина Т. И. Опыт изучения образцов эякулята инфертильных мужчин с бессимптомной бактериоспермией / А. П. Годовалов, Т. И. Карпунина // Здоровье и образование в XXI веке. – 2015. – Т. 17, № 11. – С. 19-24.
2. Assessment of fetal exposure risk following seminal excretion of a therapeutic IgG4 (TIgG4) monoclonal antibody using a rabbit model / W. J. Breslin, K. G. Hilbish, T. J. Page et al. // Reprod. Toxicol. – 2014. – V. 48. – P. 124-131.
3. Плужников М. С., Лавренова Г. В., Катинас Е. Б. Основные принципы иммунокорригирующей терапии в оториноларингологии / М. С. Плужников, Г. В. Лавренова, Е. Б. Катинас // Вестник оториноларингологии. – 2008. – № 4. – С. 38-44.
4. Луцкая А. М. Биохимическое исследование преальбумина спермоплазмы при заболеваниях репродуктивной системы мужчин: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук (03.01.04) / А. М. Луцкая. – Москва, 2012. – 28 с.
5. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection / D. D. Bannerman, M. J. Paape, J. W. Lee et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2004. – V. 11(3). – P. 463-472.

IMMUNOGLOBULIN M CONTENTS IN THE EJACULATE UNDER ASYMPTOMATIC BACTERIOSPERMIA

Godovalov A. P., Karpunina T. I., Danielyan T. Yu.

Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

It was established that under asymptomatic bacteriospermia microorganisms disrupt the permeability of blood-testis barrier and increase the IgM ejaculate content. The presence of enterobacteria in the ejaculate is accompanied by a more pronounced IgM level.

Keywords: asymptomatic bacteriospermia, immunoglobulin M, conditionally pathogenic microorganisms.

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ И РЕЦЕПЦИИ BAFF ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ЗАДЕРЖКОЙ РОСТА ПЛОДА

Фролова М. В.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

У женщин, беременность которых осложнилась ЗРП, в периферической крови выявлено снижение содержания BAFF и апоптоза В-лимфоцитов, сопровождающееся повышением уровня периферических $CD19^+BAFFR^+$ и $CD95L^+$ В-лимфоцитов. Выявленные изменения коррелировали со степенью тяжести ЗРП.

Ключевые слова: беременность, задержка роста плода, В-лимфоциты, BAFF, апоптоз.

Исследования последних лет доказали, что беременность характеризуется особым состоянием иммунной системы матери, которое определяет развитие толерантности к семиаллогенному плоду, несущему чужеродные для материнского организма отцовские антигены. При развитии осложнений беременности нарушается иммунологическое равновесие в системе мать-плод, что может вести к досрочному прерыванию беременности или развитию патологии плода, одним из проявлений которой является задержка роста плода (ЗРП). Предполагают, что активация В-лимфоцитов играет важную роль в патогенезе данного осложнения беременности [1, 2]. Есть данные о том, что при ЗРП в периферической крови матери происходит усиление дифференцировки В-лимфоцитов до конченых этапов с образованием высоко эффекторных плазматических клеток и клеток памяти [3]. Известно, что важным фактором, участвующим в созревании и активации В-лимфоцитов является BAFF или фактор В-клеточной активации из семейства TNF. BAFF продуцируется различными типами клеток, включая макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, Т-лимфоциты и активированные В-клетки [4]. BAFF участвует в процессе выживания В-лимфоцитов на стадии незрелых, транзиторных клеток и является основным фактором, поддерживающим жизнеспособность В-лимфоцитов. Взаимодействие BAFF с его рецептором BAFF-R приводит к активации NF-κB сигналинга в клетке и транскрипции анитиапоптотического фактора Bcl-2, что способствует выживанию В-лимфоцитов [5]. Особенности продукции и рецепции BAFF при беременности и ее осложнениях в настоящее время изучены недостаточно.

В связи с этим, **целью** нашего исследования было выявить закономерности изменения сывороточного уровня BAFF и экспрессии его рецептора В-лимфоцитами, а также параметров апоптоза В-лимфоцитов в периферической крови беременных женщин с ЗРП.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила периферическая кровь 44 женщин в 32-36 недель беременности с диагнозом задержка роста плода (ЗРП), поставленным по данным бимануального исследования, УЗи и Допплерометрии. В контрольную группу вошли 20 беременных женщин соответствующих сроков гестации без акушерской патологии. Методом многоцветной проточной цитофлюориметрии в популяции $CD19^+$ В-лимфоцитов оценивали относительное содержание $CD95^+$, $CD95L^+$, $BAFFR^+$ ($CD268^+$) клеток и среднюю интенсивность флюоресценции CD268 (MFI), а также уровень Annexin V^+ В-лимфоцитов. Кроме того, определяли сывороточный уровень BAFF методом ИФА. Анализ данных показал, что в группе женщин, родивших детей с ЗРП, сывороточное содержание BAFF было существенно ниже по сравнению с таковым в группе контроля ($p=0,049$). При оценке рецепции BAFF было установлено, что содержание CD268-позитивных $CD19^+$ В-лим-

фоцитов было достоверно повышено в группе женщин, беременность которых осложнилась ЗРП в сравнении с контрольными параметрами (p=0,000). MFI CD 268 в популяции периферических $CD19^+$ В-лимфоцитов был существенно выше в группе женщин, беременность которых осложнилась ЗРП в сравнении с контрольными параметрами (p=0,019). Ретроспективный анализ полученных данных в зависимости от тяжести ЗРП при рождении показал, что сывороточный уровень BAFF достоверно снижался только в группе женщин, имевших умеренную/тяжелую ЗРП у новорожденных, по сравнению с таковым группы контроля (p=0,021). В группе женщин, родивших детей с легкой степенью ЗРП, отмечалась лишь тенденция к снижению уровня BAFF в крови (p>0,05). Содержание периферических $BAFFR^+CD19^+$ В-лимфоцитов было достоверно выше показателей контрольной группы как у женщин, имевших легкую ЗРП, так и у пациенток с умеренной/тяжелой ЗРП у новорожденных (p=0,024, p=0,000 соответственно) При этом существенных различий по данному параметру между группами женщин легкой ЗРП и умеренной/тяжелой ЗРП выявлено не было (p>0,05). MFI BAFF-рецептора периферических $CD19^+$ В-лимфоцитов повышался только при умеренной/тяжелой ЗРП и не менялся у женщин с легкой степени патологии. Оценка параметров апоптоза В-лимфоцитов показала, что группа женщин с ЗРП характеризовалась сниженным уровнем периферических $CD95^+$ и $AnnexinV^+$ В-лимфоцитов и повышенным количеством В-клеток, экспрессирующих CD95L молекулы. Увеличение уровня $CD95L^+$ В-лимфоцитов положительно коррелировало со степенью тяжести патологии плода и максимально проявлялось в группе пациенток с умеренной/тяжелой ЗРП. Таким образом, женщины, беременность которых осложнилась ЗРП, характеризовались одновременным снижением сывороточного содержанием BAFF и апоптоза В-лимфоцитов, при повышении уровня периферических $CD19^+BAFFR^+$ В-лимфоцитов с одновременным усилением экспрессии этого рецептора клетками. Выявленные изменения коррелировали со степенью тяжести ЗРП и в максимальной степени проявлялись при умеренной/тяжелой степени данной патологии. Вероятно, усиленная рецепция BAFF приводит к снижению сывороточного уровня самого BAFF и повышенной выживаемости В-лимфоцитов, что может определять несбалансированное накопление зрелых В-лимфоцитов и усиление активности гуморальных реакций при беременности, осложненной ЗРП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Роль иммунной системы в формировании задержки внутриутробного развития плода / А. В. Кудряшова, Н. Ю. Сотникова, Л. В. Посисеева и др.– Иваново: ОАО «Издательство «Иваново», 2009.– 240 с.
2. Nguyen T. G., Ward C. M., Morris J. M. To B or not to B cells-mediate a healthy start to life / T. G. Nguyen, C. M. Ward, J. M. Morris // Clin. Exp. Immunol.– 2013.– V. 171 (2).– P. 124-134.
3. Фролова М. В., Кудряшова А. В., Сотникова Н. Ю. Дифференцировка В-клеток памяти у женщин с задержкой роста плода / М. В. Фролова, А. В. Кудряшова, Н. Ю. Сотникова // Российский Иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9(18), № 2(1).– С. 433-434.
4. Ichii M., Oritani K., Kanakura Y. Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse / M. Ichii, K. Oritani, Y. Kanakura // World J Stem Cells.– 2014.– V. 6 (4).– P. 421-431.
5. Context-specific BAFF-R signaling by the NF-κB and PI3K pathways / J. Jellusova, A. V. Miletic, M. H. Cato et al. // Cell Rep.– 2013.– V. 5 (4).– P. 1022-1035.

THE CHARACTER OF BAFF PRODUCTION AND RECEPTION DURING PREGNANCY COMPLICATED INTRAUTERINE GROWTH RETARDATION

Frolova M. V.

Federal State Budget Establishment Ivanovo's Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V. N. Gorodkov of Ministry of Health Care of Russian Federation, Ivanovo, Russia

In the peripheral blood of pregnant women with intrauterine growth retardation the diminishment of the BAFF content and B-lymphocytes apoptosis associated with the elevation of the $CD19^+BAFFR^+$ and $CD95L^+$ B-lymphocytes were seen. These changes correlated with the pathology degree.

Keywords: pregnancy, intrauterine growth retardation, B-lymphocytes, BAFF, apoptosis.

СЫВОРОТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ФРАКТАЛКИНА И ЭКСПРЕССИЯ CX3CR1 ЛЕЙКОЦИТАМИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ГИПЕРТЕНЗИВНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

Кудряшова А. В., Панова И. А., Смирнова Е. В., Рокотянская Е. А., Сытова Л. А.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

В периферической крови женщин с хронической артериальной гипертензией и с преэклампсией в 22-36 недель гестации возрастал сывороточный уровень CX3CL1 и снижалось содержание CX3CR1$^+$ нейтрофилов. В группе женщин с хронической артериальной гипертензией снижалось относительное содержание CX3CR1$^+$ лимфоцитов и моноцитов.

Ключевые слова: CX3CR1, CX3CL1, беременность, гипертензия.

Гипертензивные расстройства у беременных ассоциируются с развитием воспалительной реакции и усилением трансмиграционной активности лейкоцитов [1]. Каскад сигнальных и транскрипционных событий, стимулирует экспрессию молекул адгезии и хемокинов, необходимых для трафика лейкоцитов [1,2]. В последнее время при изучении этого процесса большое внимание уделяется взаимодействию фракталкина (CX3CL1) с его рецептором (CX3CR1) на лейкоцитах периферической крови, так как этот хемокин проявляет не только свойства хемоаттрактанта, но и адгезионной молекулы [2].

Целью исследования было определить сывороточный уровень фракталкина в периферической крови беременных с различными формами гипертензивных расстройств при беременности и выявить особенности экспрессии CX3CR1 лимфоцитами, моноцитами и нейтрофилами до и после лечения акушерской патологии.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь. Все обследованные женщины были разделены на группы: 11 женщин без акушерской патологии и без гипертензивных расстройств (контрольная группа), 16 женщин с хронической эссенциальной гипертензией (ХАГ), 29 женщин с умеренной (ПЭ), 13 женщин с ПЭ, присоединившейся к ХАГ (ХАГ+ПЭ). В периферической венозной крови методом ИФА определяли сывороточный уровень фракталкина (RayBiotech, США). Методом проточной цитофлюориметрии исследовали содержание CX3CR1$^+$ клеток в лимфоцитарном, моноцитарном и нейтрофильном гейтах (R&DSystems, США), а также оценивали средний индекс флюоресценции CX3CR1 (MFI). Первичное обследование женщин проводилось в 22-36 недель гестации при поступлении в стационар до начала терапии осложнений беременности. Повторное обследование проводилось через 4-5 дней, после начала стандартной антигипертензивной терапии. Достоверность различий сравниваемых показателей оценивали с использованием критериев Стьюдента. При первичном обследовании во всех группах женщин с гипертензивными расстройствами при беременности по сравнению с контрольной группой отмечалось достоверное повышение сывороточного уровня фракталкина ($p<0,01$ во всех случаях). Кроме того, во всех группах с гипертензивными расстройствами при беременности в популяции нейтрофилов достоверно снижалось содержание CX3CR1$^+$ клеток ($p<0,01$ во всех случаях). Только в группе женщин с ХАГ в периферической крови отмечалось достоверное снижение относительного содержания CX3CR1-позитивных лимфоцитов и моноцитов, а также снижались показатели средней интенсивности флюоресценции MFI CX3CR1 моноцитов и нейтрофилов по сравнению с показателями в контрольной группе ($p<0,05$ во всех случаях). Проведение антигипертензивной терапии в течение 4-5 дней не вызывало достоверных изменений в показателях содержания CX3CR1$^+$ клеток во всех фракциях лейкоцитов ($p>0,05$ во всех по-

пуляциях между показателями до и после лечения). Однако в группе с ПЭ через 4-5 дней после лечения отмечалась тенденция к росту уровня CX3CR1$^+$ лимфоцитов, а в группах женщин с ХАГ и ХАГ+ПЭ – тенденция к росту уровня CX3CR1$^+$ моноцитов и нейтрофилов. Известно, что фракталкин экспрессируется на воспаленном эндотелии, при воздействии TNFα, IFNγ и IL-1 [3], уровень которых значительно повышается при различных гипертензивных состояниях. Аналогичное повышение синтеза фракталкина в тканях отмечается при гипоксии в большинстве случаев сопровождающей гипертензивные расстройства [4]. Отмеченное нами повышение сывороточного уровня фракталкина у женщин с гипертензивными расстройствами при беременности могло быть обусловлено усилением экспрессии его мембранной формы и последующего шеддинга молекул под действием металлопротеиназ ADAM 10 и ADAM 17 [3]. Растворимый фракталкин является мощным хемоаттрактантом для естественных киллеров, Tγδ-клеток, цитотоксических эффекторных лимфоцитов и терминально дифференцированных CD8$^+$ Т-клеток памяти. Все эти популяции экспрессируют большое количество перфорина и гранзима, независимо от механизмов распознавания клеток-мишеней, что может приводить к повреждению эндотелия и более глубоких структур сосудов [3]. Вероятно, снижение содержания CX3CR1$^+$ лейкоцитов у беременных с гипертензивными расстройствами определялось усиленным рекрутированием клеток из кровотока в результате взаимодействия с мембранными молекулами CX3CL1. Причем только при хронической артериальной гипертензии эти процессы затрагивали популяции лимфоцитов и моноцитов. Мембранная форма CX3CL1 способствует сильной селектин- и интегрин-независимой адгезии лейкоцитов [2]. Взаимодействие CX3CL1-CX3CR 1 заметно увеличивает сродство клеток с молекулами интегринов ICAM-1 и VCAM-1 обеспечивая более плотную адгезию и последующую экстравазацию клеток [3]. Вероятно, данный механизм сосудистой трансмиграции клеток наиболее значим для хронической эссенциальной гипертензии. Наряду с этим гиперэкспрессия фракталкина стимулирует рост слоя гладкомышечных клеток, способствуя разрастанию неоинтимы, сужению просвета сосуда и гипоперфузии [5]. Полученные данные свидетельствуют о том, что проведение антигипертензивной терапии в течение 4-5 дней недостаточно для купирования неблагоприятных эффектов воспаления.

Работа поддержана грантом Президента РФ № МК-6885.2015.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Экспрессия молекул клеточной адгезии фагоцитами как критерий дифференциальной диагностики гипертензивных расстройств беременных / И. А. Панова, А. В. Кудряшова, А. И. Малышкина и др. // Акушерство и гинекология.– 2015.– № 7.– С. 33-37.
2. International union of basic and clinical pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors / F. Bachelerie, A. Ben-Baruch, A. M. Burkhardt et al. // Pharmacol. Rev.– 2014.– V.66(1).– P. 1-79.
3. Jones B. A., Beamer M., Ahmed S. Fractalkine/ CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases / B. A. Jones, M. Beamer, S. Ahmed // Mol. Interv.– 2010.– V.10(5).– P. 263-270.
4. Effect of breviscapine on fractalkine expression in chronic hypoxic rats / C. Xiao-ju, C. De-yun, Y. Li et al. // Chinese Medical. Journal.– 2006.– V.119(17).– P. 1465-1468.
5. Schober A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling / A. Schober // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2008.– V.28(11).– P. 1950-1959.

SERUM FRACTALKINE CONTENT AND LEUKOCYTE'S CX3CR 1 EXPRESSION IN GROUP OF PREGNANT WOMEN WITH HYPERTENSIVE DISORDERS BEFORE AND AFTER TREATMENT

Kuryashova A. V., Panova I. A., Smirnova E. V., Rokotyanskaya E. A., Sytova L. A.

FSBE «Ivanovo`s Research Institute of Maternity and Childhood behalf V. N. Gorodkova» Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovo, Russia

In the peripheral blood of women with chronic arterial hypertension and with preeclampsia during 22-36 weeks of gestation the serum level of CX3CL1 increased and the content of CX3CR1$^+$ lymphocytes and monocytes declined. In the group of women with chronic hypertension the diminishment of the amount of CX3CR1$^+$ lymphocytes and monocytes was seen.

Keywords: CX3CR1, CX3CL1, pregnancy, hypertension.

ЭКСПРЕССИЯ CD178 В ПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ ПРИ УГРОЗЕ НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Крошкина Н. В., Батрак Н. В.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова Минздрава России», Иваново, Россия

При развитии угрозы прерывания на ранних сроках беременности в периферической крови снижался уровень CD178 позитивных моноцитов. В группе женщин с угрозой невынашивания беременности и с развившимся поздним угрожающим выкидышем наблюдалось более значительное угнетение экспрессии CD178 молекул моноцитами, что может служить критерием прогнозирования данного осложнения беременности.

Ключевые слова: беременность, моноциты, апоптоз.

В последние годы особое внимание уделяется иммунным аспектам самопроизвольного прерывания беременности, которые в 40-50 % случаев проявляются в виде патологических изменений на различных уровнях иммунной системы, а также неадекватной реакцией организма матери на отцовские антигены. Моноциты и макрофаги как представители врожденной иммунной системы играют существенную роль не только в защите матери от инфекций, но и во взаимодействиях на уровне мать-плод [1]. Известно, что во время беременности макрофаги представляют собой главный клеточный компонент на участке имплантации и их число остается высоким на протяжении всей беременности [2]. Для объяснения причин привычных спонтанных абортов на клеточно-тканевом уровне предложен ряд механизмов, в том числе повышенная активность иммунокомпетентных клеток, выражающаяся в атаке на инвазивный трофобласт, непосредственное повреждающее действие цитокинов на клетки трофобласта, а также сосудистые эффекты цитокинов, приводящие к тромбозу сосудов плаценты и снижению кровотока [2, 3]. Исследованиями последних лет доказано, что в патогенезе осложнений гестации важную роль играют процессы апоптоза клеток трофобласта. Показано, что молекула FasL напрямую участвует в защите клеток плодовой части плаценты от атаки материнской иммунной системы [3]. Однако, несмотря на большое количество экспериментальных данных, в литературе практически отсутствуют сведения о механизмах регуляции апоптоза по FasL-зависимому пути на системном уровне у женщин с угрозой прерывания беременности на ранних сроках и привычным невынашиванием.

Целью нашей работы было установить особенности экспрессии FasL (CD178) моноцитами при угрозе невынашивания на ранних сроках гестационного периода у женщин с привычным невынашиванием беременности.

Материалы и методы. Было обследовано 50 беременных женщин I триместра с привычным невынашиванием и клиническими признаками угрозы прерывания беременности. Контрольную группу составили 20 беременных женщин в те же сроки гестации с неосложненным течением беременности. Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь. Уровень моноцитов, экспрессирующих на своей поверхности молекулы CD178, определяли методом проточной цитофлюориметрии на цитометре FACSCantoII (BectonDickinson, USA). Нами было установлено, что при развитии клинических признаков угрозы прерывания беременности уровень моноцитов, несущих на своей поверхности молекулы FasL (CD178), достоверно снижался по сравнению с таковым при неосложненной беременности. Литературные данные о характере экспрессии FasL молекул при невынашивании беременности противоречивы. Ряд авторов отмечают повышение экспрессии FasL децидуальными макрофагами при невынашивании беременности [3], тогда как согласно результатам других исследований экспрессия молекулы CD95L

в плаценте снижалась при самопроизвольных выкидышах [4]. Таким образом, приведенные в литературе данные не позволяют однозначно судить о характере системных FasL-зависимых реакций при невынашивании беременности. В целом большинство результатов свидетельствует о снижении активности индукции апоптоза, опосредованной факторами из семейства TNF. В ходе исследования нами также проводился анализ экспрессии молекул CD178 в популяции моноцитов у женщин I триместра с угрозой невынашивания в зависимости от характера дальнейшего течения беременности. Нами было установлено, что более значительное угнетение экспрессии молекул FasL наблюдалось у женщин с развившимся поздним угрожающим выкидышем по сравнению с таковым у женщин без него. Данный показатель может быть использован как прогностический критерий развития позднего угрожающего выкидыша у женщин с угрозой прерывания на ранних сроках и привычным невынашиванием беременности. Известно, что реакции, обусловленные взаимодействием CD95-CD95L молекул, играют важную роль в регуляции апоптоза в ранней плаценте. Показано, что макрофаги, экспрессирующие на своей мембране FasL молекулы, индуцируют апоптоз эндотелиальных и гладкомышечных клеток спиральных артерий матки, экспрессирующих CD95 [5]. Таким образом, можно предположить, что выявленная нами сниженная экспрессия FasL молекул на поверхности моноцитов у женщин с угрозой прерывания беременности, вероятно, в дальнейшем будет определять низкий уровень экспрессии этих молекул децидуальными макрофагами. Все это в конечном итоге может привести к нарушению процесса трансформации спиральных артерий, нарушению становления маточно-плацентарного кровотока и, как следствие, досрочному прерыванию беременности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крошкина Н. В., Малышкина А. И., Можаева Т. А. Особенности функционального состояния клеток макрофагального ряда у женщин с невынашиванием беременности ранних сроков / Н. В. Крошкина, А. И. Малышкина, Т. А. Можаева // Вестн. Уральской медицинской академической науки.– 2010.– № 2 (1).– С. 154-155.
2. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy / S. Fest, P. B. Aldo, V. M. Abrahams et al. // Am. J. Reprod. Immunol.– 2007.– V. 57.– P. 55-66.
3. Decidual macrophages are significantly increased in spontaneous miscarriages and over-express FasL: A potential role for macrophages in trophoblast apoptosis / S. Guenther, T. Vrekoussis, S. Heublein et al. // Int. J. Mol. Sci.– 2012.– V. 13 (7).– P. 9069-9080.
4. Guvendag Guven E. S., Okur H., Beksac M. S. Placental Fas/Fas ligand expression in early pregnancy losses / E. S. Guvendag Guven, H. Okur, M. S. Beksac // Am. J. Reprod. Immunol.– 2008.– V.60 (1).– P. 1-7.
5. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions / S. V. Ashton, G. S. Whitley, P. R. Dash et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2005.– V. 25.– P. 102-108.

EXPRESSION OF CD178 IN MONOCYTES POPULATION IN PREGNANT WOMEN WITH THREATENED ABORTION

Kroshkina N. V., Batrak N. V.

Federal State Budget Establishment Ivanovo's Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V. N. Gorodkov of Ministry of Health Care of Russian Federation, Ivanovo, Russia

It was established that in women with threatened abortion at early stage of pregnancy the level of $CD178^+$ peripheral blood monocytes decreased comparing to that in healthy pregnant women. In women with threatened abortion which was developed both at early and late stages of pregnancy the more pronounced inhibition of CD178 molecules expression was seen. These results might be used as the prognostic criterion this complication of pregnancy.

Keywords: pregnancy, monocytes, apoptosis.

МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ В ФАРИНГЕАЛЬНОМ АСПИРАТЕ ГЛУБОКО НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Кудряшова А. В., Турова А. В., Чаша Т. В.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

Усиление функции распознавания антигена является прогностическим критерием благоприятного течения раннего неонатального периода у глубоко недоношенных новорожденных. Низкая патоген-распознающая и эффекторная способность фагоцитов ассоциируется в этой группе новорожденных с развитием тяжелого течения ИВП.

Ключевые слова: фарингеальный аспират, цитокины, Толл-рецепторы, недоношенные новорожденные.

Проблема выхаживания глубоко недоношенных новорожденных с низкой и экстремально-низкой массой тела при рождении требует разработки мало инвазивных и доступных для практического здравоохранения критериев оценки состояния иммунной системы ребенка. Известно, что недоношенные дети, и особенно новорожденные с экстремально низкой массой тела, рождаются с незрелой системой врожденного иммунитета. Это приводит к глубоким дефектам процессов распознавания патогена, опсонизированного фагоцитоза, цитокиновой регуляции реакций врожденного и адаптивного иммунитета [1, 2, 3], что определяет высокий риск инфекционно-воспалительной патологии (ИВП) в этой группе новорожденных. Ранее нами было показано, что развитие ИВП у глубоко недоношенных новорожденных сочетается с угнетением функции распознавания АГ клетками врожденного иммунитета периферической крови и усилением продукции ими провоспалительных цитокинов [4]. Причем при летальном исходе ИВП в крови отмечалось снижение относительного содержания $TLR2^+$, $TLR4^+$, $CD16^+$ моноцитов и $TLR2^+$ нейтрофилов, на фоне повышения уровня $IL\text{-}6^+$ и $Granzyme\ B^+$ нейтрофилов, а при развитии бронхо-легочной дисплазии (БЛД) – снижение относительного содержания $TLR9^+$ и $IL\text{-}1\beta^+$ нейтрофилов [5]. Однако использование данных критериев в практической работе затруднено, так как связано с инвазивными методами взятия материала для исследования.

Целью работы было выявить информативные маркеры, характеризующие течение и исход инфекционно-воспалительной патологии у глубоко недоношенных новорожденных 22-32 недель гестации.

Материалы и методы. Материалом для исследования служил фарингеальный аспират новорожденных в 1-2 сутки жизни. Фарингеальный аспират забирали катетером через полость рта ребенка. Катетер, заполненный фарингеальным содержимым, промывали 1 мл физиологического раствора. Полученный материал центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут. В надосадочной жидкости определяли общее содержание белка методом спектрофотометрии, а также абсолютный и нормализованный относительно общего содержания белка уровень IL-6, IL-8, IL-10 и сурфактантного белка D методом ИФА. В осадке исследовали содержание $TLR\text{-}2^+$, $TLR\text{-}4^+$, $IL\text{-}6^+$, $IL\text{-}8^+$ клеток в моноцитарно/макрофагальном гейте ($CD14^+CD45^+$) методом проточной цитофлюориметрии. Группа сравнения была представлена 18 здоровыми доношенными новорожденными. Все недоношенные новорожденные на основании клинических и лабораторных исследований были разделены на 2 группы: 20 детей без ИВП (средний гестационный возраст 31,5±0,3 недель, масса тела при рождении 1402±34 г) и 55 детей с ИВП (средний гестаци-

онный возраст 29,6±0,3 недель, масса тела при рождении 1116±57 г). Дети с ИВП были разделены на подгруппы в зависимости от тяжести течения заболевания: 21 ребенок с легким и среднем течением заболевания, 34 – с тяжелым. Ретроспективно группа детей с ИВП в зависимости от исхода ИВП были подразделены на подгруппы: с благоприятным исходом (36 детей, средний гестационный возраст 30,5±0,3 недель, масса тела при рождении 1273±48г), с неблагоприятным исходом (11 умерших детей, средний гестационный возраст 27,7±0,6 недель, масса тела при рождении 785±131г), с развившейся бронхо-легочной дисплазией (БЛД) (8 детей, средний гестационный возраст 28,1±0,8 недель, масса тела при рождении 911±164г).

Результаты исследования показали, что в 1-2 сутки жизни недоношенные дети без ИВП отличались от здоровых доношенных новорожденных низким абсолютным и нормализованным относительно общего белка уровнем IL-10 ($p<0,001$ ир$<0,05$, соответственно), но повышенным содержанием $TLR2^+$ и тенденцией к росту уровня $TLR4^+$ моноцитов/макрофагов в фарингеальном аспирате. В отличие от недоношенных новорожденных без ИВП для недоношенных новорожденных группы ИВП было характерно достоверное повышение абсолютного и нормализованного уровня IL-6 ($p<0,001$ и $p<0,01$) и IL-8 ($p<0,05$ в обоих случаях) и снижение уровня $TLR2^+$ и $TLR4^+$ моноцитов/макрофагов ($p<0,01$ в обоих случаях) в фарингеальном аспирате. Аналогичные изменения были отмечены нами в периферической крови [4, 5]. Наибольшие отличия между сравниваемыми показателями были отмечены между подгруппами с различной степенью тяжести ИВП. При тяжелом течении ИВП в фарингеальном аспирате недоношенных новорожденных по сравнению с показателями подгруппы с легким и средним течением ИВП достоверно повышался абсолютный уровень IL-6, IL-8 ($p<0,01$ и $p<0,05$, соответственно), и снижалось абсолютное содержание IL-10 ($p<0,05$), а также относительное содержание $TLR2^+$ моноцитов/макрофагов ($p<0,01$), $TLR4^+$, $IL\text{-}6^+$, $IL\text{-}8^+$ ($p<0,05$ во всех случаях) моноцитов/макрофагов. В фарингеальном аспирате подгрупп недоношенных с неблагоприятным исходом ИВП (умерших и детей с БЛД) в 1-2 сутки жизни отмечалось достоверное снижение абсолютного уровня IL-10 ($p<0,05$ в обоих случаях) и выраженная тенденция к повышению абсолютного содержания IL-6 ($p>0,05$). Однако только в подгруппе глубоко недоношенных новорожденных с БЛД в фарингеальном аспирате достоверно снижался уровень $IL\text{-}8^+$ моноцитов/макрофагов по сравнению с показателями детей с благоприятным исходом ИВП ($p<0,01$). Уровень сурфактантного белка D во всех сравниваемых группах и подгруппах в нашем исследовании не имел достоверных различий ($p>0,05$ во всех случаях).

Таким образом, усиление функции распознавания антигена является прогностическим критерием благоприятного течения раннего неонатального периода у глубоко недоношенных новорожденных. Низкая патоген-распознающая и цитокин-продуцирующая способность фагоцитов фарингеального аспирата ассоциируется в этой группе новорожденных с развитием тяжелого течения ИВП. Выявленные критерии дифференциальной диагностики тяжести течения ИВП и ее исхода у глубоко недоношенных новорожденных позволят разработать новые подходы к тактике ведения больных и тем самым улучшить исходы заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon-γ / P. Tissières, A. Ochoda, I. Dunn-Siegrist et al. // PLoS ONE.– 2012.– V.7(3).– e.32863.
2. T cell cytokines and the risk of blood stream infection in extremely low birth weight infants / R. L. Schelonka, A. Maheshwari, W. A. Carlo et al. // Cytokine.–2011.– V.53(2).– P. 249-255.
3. Кудряшова А. В., Турова А. В. Экспрессия TLR2, TLR4 и TLR9 фагоцитами новорожденных с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении / А. В. Кудряшова, А. В. Турова // Ж. Российский иммунологический журнал.– 2013.– Т. 7(16).– № 2-3.– С. 277-278.
4. Кудряшова А. В., Чаша Т. В., Турова А. В. Состояние врожденного иммунитета у глубоко недоношенных новорожденных с различным исходом инфекционно воспалительной патологии / А. В. Кудряшова, Т. В. Чаша, А. В. Турова // Российский Иммунологический Журнал.– 2015.– Т. 9(18).– № 1(1).– С. 119-120.
5. Особенности состояния иммунной системы и характер микробной колонизации детей с экстремально низкой массой тела при рождении / Г. Н. Чистякова, Б.Т., Чарипова, М.Н., Тарасова и др. // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского.– 2013.– Т. 92, № 2.– С. 42-48.

THE MARKERS OF INFLAMMATION IN PHARYNGEAL ASPIRATE OF SEVERELY PRETERM CHILDREN

Kudryashova A. V., Turova A. V., Chasha T. V.

FSBE Ivanovo's Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V. N. Gorodkov of Ministry of Health Care of Russian Federation, Ivanovo, Russia

The enhancement of antigen recognition function is the prognostic criterion of the successful outcome of early neonatal period in severely preterm infants. The low pathogen recognizing and effector ability of phagocytes is associated with severe course of infectious-inflammatory diseases.

Keywords: pharyngeal aspirate, cytokines, Toll-receptors, preterm infants.

РОЛЬ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Сотникова Н. Ю., Борзова Н. Ю., Иваненкова Н. В., Мишарина Л. В.

ФГБУ «Ивановский НИИ Материнства и Детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

Невынашивание беременности сопровождается изменением дифференцировки Т клеток памяти. При спорадическом невынашивании эти изменения затрагивают лишь популяцию Т-хелперов, при привычном невынашивании – Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, что может свидетельствовать о различном патогенезе спорадического и привычного невынашивания. Особенности дифференцировки Т-клеток могут использоваться в практике для прогноза исхода беременности.

Ключевые слова: клетки памяти, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, беременность, невынашивание, прогноз.

Несмотря на огромное количество работ, частота невынашивания беременности остается высокой [1]. Известно, что при беременности происходит изменение состояния иммунной системы матери, включая процесс формирования клеток памяти [2, 3]. Акушерская патология сопровождается усилением проницаемости плаценты и нарушением ее барьерной функции. Избыток антигенного материала, поступающий в кровоток матери, может привести к изменению характера дифференцировки Т-клеток памяти [4]. В литературе же практически отсутствуют сведения о дифференцировке Т-клеток при беременности, осложненной привычным или спорадическим невынашиванием.

В связи с этим **целью** нашей работы было выявить характер нарушений дифференцировки Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов при спорадическом и привычном невынашивании на ранних сроках беременности и оценить возможность их практического использования.

Всего под наблюдением находилось 152 беременные женщины в сроке гестации 5-10 недель. Под наблюдением находились 34 женщины без угрозы прерывания в течение всей беременности, 82 женщины с угрожающим и привычным выкидышем на момент обследования и 36 пациенток со спорадической угрозой прерывания беременности. Все женщины были обследованы методом ИФА на наличие маркеров заболеваний, передающихся половым путем: HSV1,2, CMV, EBV, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*. Поверхностный фенотип лимфоцитов и содержание клеток, внутриклеточно продуцирующих Perforin и Granzyme B в популяции $CD8^+$ лимфоцитов, определяли с помощью

моноклональных антител (мАТ) методом проточной цитофлюориметрии на цитометре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) стандартным способом. В работе использовали моноклональные антитела фирмы eBioscience, США, меченные PerCP-Cy5.5, APC, FITC или PE. Содержание клеток, внутриклеточно продуцирующих Granzyme B или Perforin, в популяции $CD8^+$ лимфоцитов, оценивали, используя процедуру внутриклеточного окрашивания клеток с применением коммерческого набора FIX & PERM cell permeabilization reagents (Invitrogen, США). Нами не выявлено достоверных различий в группах по частоте встречаемости острого вирусного, острого бактериального, хронического бактериального, хронического и острого бактериального инфицирования, вирусно-бактериальной инфекции ($p>0,05$ во всех случаях). Установлено, что у женщин со спорадическим ранним выкидышем изменения затрагивали в основном популяцию Т-хелперов, в которой отмечалось достоверно более высокое содержание претерминально-дифференцированных клеток памяти по сравнению с показателями группы контроля ($p<0,05$). У пациенток с привычным невынашиванием угроза выкидыша сопровождалась снижением количества $CD4^+$ центральных клеток памяти ($p<0,01$), на фоне повышения уровня $CD4^+$ терминально-дифференцированных клеток памяти ($p<0,01$) по сравнению с таковым в группе контроля. При этом в группе женщин с привычным выкидышем уровень Temra и Tn был достоверно выше ($p<0,01$, $p<0,05$ соответственно), а содержание Tem в популяции $CD4^+$ клеток достоверно ниже ($p<0,05$), чем в группе без привычного невынашивания. Следует отметить, что при спорадическом невынашивании не происходило существенных изменений в дифференцировке цитотоксических Т-лимфоцитов, тогда как при привычном невынашивании в популяции $CD8^+$ лимфоцитов было выявлено высокое содержание Temra ($p<0,01$) и низкое – центральных клеток памяти и Tem клеток памяти ($p<0,05$ в обоих случаях). Одновременно усиливалась продукция цитолитических молекул. Полученные данные позволяют предположить, что при привычном невынашивании могут формироваться специфические клоны Т-клеток, возможно, за счет усиления проницаемости плацентарных барьеров для антигенов плодового происхождения [4], Это может приводить к образованию пулов клеток иммунологической памяти, способных быстро реагировать на повторную антигенную стимуляцию при последующей беременности. Кроме того, при привычном невынашивании усиливалась дифференцировка цитотоксических Т-клеток, приводя к накоплению пула высокоэффекторных терминально дифференцированных ЦТЛ, способных к быстрому и эффективному иммунному ответу за счет продукции цитокинов и цитотоксического действия [4]. Подобные механизмы, вероятно, могут играть патогенетическую роль. Более того, можно предположить разный патогенез спорадического и привычного выкидыша. Значимость иммунологических процессов и особенностей дифференцировки Т-лимфоцитов подтверждается и возможностью их использования для прогнозирования течения беременности. Так, было установлено, что иммунологические показатели можно использовать в качестве прогностических критериев раннего самопроизвольного выкидыша, преждевременных родов, рецидива угрозы выкидыша во 2 триместре после проведенного лечения. У пациенток, чья беременность завершилась ранним самопроизвольным выкидышем, было отмечено достоверное снижение уровня $CD4^+$ наивных клеток на фоне роста претерминально-дифференцированных клеток памяти по сравнению с аналогичными параметрами у пациенток, беременность которых завершилась своевременными родами ($p<0,05$ в обоих случаях). При завершении беременности преждевременными родами, в отличие от пациенток, чья беременность завершилась своевременными родами, снижался уровень $CD8^+$ Tn, но возрастало содержание $CD8^+$ претерминально-дифференцированных клеток ($p<0,05$ в обоих случаях). При рецидиве угрозе выкидыша во 2 триместре после проведенной сохраняющей терапии у женщин с привычным невынашиванием количество $CD8^+$ Tem клеток в крови пациенток было существенно выше, чем у беременных, чья беременность протекала без повторного развития угрожающего выкидыша ($p<0,001$) (приоритетная справка № 2015102235 от 26.01.2015).

Таким образом, изменения дифференцировки клеток памяти играют патогенетическую роль при невынашивании беременности и могут использоваться в клинической практике для прогноза исхода беременности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Цитокиновый профиль женщин с угрозой невынашивания беременности и его модуляция препаратом Дюфастон / Н. Ю. Сотникова, Л. В. Посисеева, Ю. С. Анциферова и др. // Ж. акушерства и женских болезней.– 2006.– Т.LV, № 2.– С. 42-46.
2. Сотникова Н. Ю. Формирование феномена иммунологической памяти в динамике гестационного процесса / Н. Ю. Сотникова // Российский иммунологический журн.– 2010.– Т. 4 (13), № 4.– С. 321-326.
3. Tilburgs T., Strominger J. L. CD8+ Effector T Cells at the Fetal–Maternal Interface, Balancing Fetal Tolerance and Antiviral Immunity / T. Tilburgs, J. L. Strominger // Am J Reprod Immunol.– 2013.– V. 69, № 4.– P. 395-407.
4. Stem cell-like plasticity of naпve and distinct memory CD8+ T cell subsets. Review / C. Stemberger, M. Neuenhahn, F. E. Gebhardt et al. // Seminars in Immunology.– 2009.– V.21.– P. 62-68.

THE ROLE OF MEMORY T CELLS IN THREATENED ABORTION

Sotnikova N. Yu., Borzova N. Yu., Ivanenkova N. V., Misharina L. V.

Federal State Budget Establishment Ivanovo's Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V. N. Gorodkov of Ministry of Health Care of Russian Federation, Ivanovo, Russia

Threatened abortion is accompanied by changes in memory T cell differentiation. In sporadic threatened abortion these changes involve only population of T-helpers and in the recurrent abortion – both T-helpers and cytotoxic T cells, which can evidence about different pathogenesis of sporadic and recurrent threatened abortion. The peculiarities of T cell differentiation can be used in practice for prognosis of pregnancy outcome.

Keywords: memory cells, pregnancy, threatened abortion, prognosis.

ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗВИТИИ ЗРП

Мишарина Л. В., Иваненкова Н. И.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава РФ, Иваново, Россия

Развитие ЗРП ассоциировано со снижением уровня Tcm и увеличением содержания Temra клеток в популяции ЦТЛ, начиная уже с 1 триместра беременности и сохранявшиеся на всем протяжении гестационного процесса. Таким образом, при ЗРП отмечается усиление дифференцировки CD8+ лимфоцитов до конечных ее этапов.

Ключевые слова: беременность, задержка роста плода, клетки памяти.

Изучение механизмов «толерантности» материнской иммунной системы к фетальным антигенам является наиболее интересным аспектом иммунологии репродукции. Формирование фето-плацентарного комплекса представляет собой уникальную ситуацию, при которой материнская иммунная система сталкивается с тканеспецифическими антигенами плода. Предполагается, что стимуляция иммунной системы матери АГ плода является необходимым фактором нормального развития беременности, а чрезмерное поступление АГ при нарушении барьерной функции плаценты приводит к формированию акушерской патологии, в том числе к развитию задержки роста плода (ЗРП) [1]. ЗРП является одним из часто встречающихся патологических состояний во время беременности. По данным ряда исследований, проведенных в различных странах, частота ЗРП варьирует от 3 до 23 %

и не имеет тенденции к снижению, несмотря на успехи в разработке новых методов диагностики и профилактики заболевания [2]. Однако параметры, характеризующие состояние иммунной системы женщин, родивших детей с ЗРП, в динамике беременности остаются до конца неизученными.

Целью проведенного исследования было установить особенности содержания наивных (Tn), центральных (Tcm), претерминально-дифференцированных (Tem) и терминально-дифференцированных (Temra) клеток в популяциях периферических Т-хелперов ($CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$) у беременных женщин с ЗРП в динамике гестации.

Материалом для исследований служила периферическая венозная кровь из локтевой вены 80 женщин. Из них 20 соматически здоровых небеременных женщин с реализованной репродуктивной функцией (доноры) и 50 беременных женщин с неосложненным течением беременности на всем протяжении гестации, обследованных лонгитудинально троекратно: в 1 триместре (6-10 недель), во 2 триместре (16-20 недель) и в 3 триместре гестации (30-34 недели). Все обследованные беременные женщины ретроспективно были разделены на 2 группы. В первую вошли 45 женщин, беременность которых закончилась срочными родами и рождением детей с нормальными массо-ростовыми показателями (контрольная группа). Во вторую группу вошли 15 женщин, беременность которых закончилась рождением детей с признаками ЗРП (основная группа). Выделение из периферической крови общей фракции мононуклеарных клеток осуществляли традиционным методом скоростного центрифугирования при 1500 об/мин в градиенте плотности фиколл-урографина (d-1,078).

Исследование осуществляли методом многоцветной цитофлюориметрии на проточном цитофлюориметре FACSCantoII (Becton Dickinson, США). Статистическая обработка данных проводилась с расчетом среднего арифметического, ошибки среднего арифметического с использованием программы Microsoft Excel из комплекта Microsoft Office 2000.

Ранее нами было показано, что наступление неосложненной беременности сопровождалось достоверным увеличением пула Tn, которое сохранялось на всем протяжении гестационного процесса в популяции Т-хелперов и в 1 и 2 триместрах гестации в популяции ЦТЛ относительно показателей небеременных женщин. Также, в периферической крови женщин с неосложненным течением беременности в популяциях $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов во 2 и 3 триместрах гестации снижался уровень Tcm клеток по сравнению с показателями доноров. Кроме того, проведенные нами исследования выявили снижение уровня Tem клеток в популяции $CD8^+$ лимфоцитов в 1 и 2 триместрах беременности относительно такового у небеременных женщин [3, 4].

Исследуя динамику содержания различных пулов клеток памяти в популяции $CD4^+$ лимфоцитов при развитии ЗРП, мы не выявили значительных изменений в содержании Tn, Tcm, Tem и Temra клеток в динамике беременности. Все изменения носили аналогичный характер, что и в группе женщин с неосложненным течением гестационного процесса. Наиболее выраженные изменения при ЗРП отмечались нами в популяции ЦТЛ. Так, анализ данных показал, что в группе женщин с ЗРП отмечалось достоверное снижение уровня центральных клеток памяти в пуле $CD8^+$ лимфоцитов относительно показателей контроля на всем протяжении беременности. Кроме того, развитие ЗРП сопровождалось достоверным повышением уровня Temra клеток в популяции ЦТЛ, начиная с 1 триместра беременности по сравнению с таковым в группе контроля, которое также сохранялось на всем протяжении гестационного процесса. В настоящее время известно, что иммунные механизмы играют крайне важную роль в развитии беременности, определяя формирование маточно-плацентарного комплекса и обеспечивая сосуществование двух семиаллогенных организмов. Нарушение тех или иных звеньев в сложной цепочке иммунорегуляции ведет к возникновению патологических процессов в системе мать-плацента-плод. Наши исследования показали, что при неосложненной беременности контакт материнской иммунной системы с плодом практически не оказывает влияния на формирование «иммунологической памяти» и приводит к угнетению функции лимфоцитов, способных патологически воздействовать на плаценту и плод. Осложнения беременности возникали у тех женщин, у которых формировались высокоэффекторные терминально-дифференцированные клетки памяти, обладающие повреждающим действи-

ем. Как известно, при акушерской патологии проницаемость плацентарного барьера усиливается, что приводит к большему поступлению фетальных АГ в кровоток матери [5]. Возможно, именно это обусловило выявленный нами при развитии ЗРП рост высокоактивных Temra клеток, способных к осуществлению антиген-специфических цитотоксических реакций адаптивного иммунитета в отношении антигенов плодового происхождения. Можно предположить, что при неосложненной беременности имеются механизмы, препятствующие проявлению «иммунологической памяти» материнских клеток в отношении плода, а при ЗРП – эта защита нарушена.

Таким образом, нарушение дифференцировки лимфоцитов может вести к изменению иммунорегуляции, определяя неадекватный иммунный ответ матери на фетальные антигены, приводя тем самым к формированию патологии беременности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and pre-eclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles / S. J. Germain, G. P. Sacks, S. R. Sooranna et al. // J. Immunol.– 2007.– V. 178.– P. 5949-5956.
2. Бычкова А. Б., Радзинский В. Е. Интранатальное состояние плода с задержкой внутриутробного развития / А. Б. Бычкова, В. Е. Радзинский // Трудный пациент.– 2006.– № 2.– С. 1-5.
3. Кадырова Л. В., Сотникова Н. Ю., Кудряшова А. В. Динамика содержания наивных Т-клеток при неосложненной беременности / Л. В. Кадырова, Н. Ю. Сотникова, А. В. Кудряшова // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8 (17), № 1.– С. 54-60.
4. Кудряшова А. В., Кадырова Л. В. Дифференцировка $CD8^+$ клеток памяти при беременности / А. В. Кудряшова, Л. В. Кадырова // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8 (17), № 1.– С. 79-82.
5. Rusterholz C. Placental microparticles, DNA and RNA in preeclampsia / C. Rusterholz // Hypertens. Pregnany.– 2011.– V. 30, № 3.– P. 364-375.

THE CHARACTER OF PERIPHERAL T-CELLS DIFFERENTIATION DURING IUGR DEVELOPMENT

Misharina L. V., Ivanenkova N. I.

Federal State Budget Establishment Ivanovo's Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V. N. Gorodkov of Ministry of Health Care of Russian Federation, Ivanovo, Russia

The development of IUGR is associated with the diminishment of Tcm level and increase of Temra amount in the population of cytotoxic T lymphocytes, beginning from the 1 trimester of pregnancy, persisting throughout all gestational period. Thus, in IUGR pregnancy an enhancement of $CD8^+$ lymphocytes differentiation to its final stages is noted.

Keywords: pregnancy, intrauterine growth retardation, memory cells.

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ОЖИДАНИЯ НАСТУПЛЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ ПОСЛЕ ПРЕДГЕСТАЦИОННОЙ АЛЛОИММУНИЗАЦИИ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

Степанова Е. О., Николаева М. А., Голубева Е. Л., Вторушина В. В., Сарибегова В. А., Тетруашвили Н. К., Ванько Л. В., Кречетова Л. В.

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Оценивали продукцию цитокинов клетками периферической крови после предгестационной иммуноцитотерапии (ИЦТ) у женщин с привычным выкидышем и длительность ожидания наступления планируемой беременности. При ретроспективном анализе было установлено, что баланс Th1/Th2 цитокинов, сформированный в результате предгестационной ИЦТ, может являться фактором, определяющим вероятность наступления беременности у женщин с привычным выкидышем.

Ключевые слова: Th1/Th2 цитокины, беременность, аллоиммунизация, привычный выкидыш.

В период предгестационной подготовки супружеских пар с привычным выкидышем в анамнезе используется иммуноцитотерапия (ИЦТ) – аллоиммунизация женщин лимфоцитами их полового партнера, направленная на формирование иммунных реакций, необходимых для успешного течения беременности. Ранее было установлено, что физиологическая беременность протекает на фоне противовоспалительных реакций [1]. Иммуномодулирующий эффект ИЦТ также связывают с Th2-поляризацией иммунного ответа. Однако появляется все больше данных о том, что имплантация и плацентация развиваются на фоне провоспалительных Th1-реакций [2]. Нельзя исключить, что формирование противовоспалительных реакций при предгестационной ИЦТ может быть неблагоприятным фактором для наступления беременности.

Поэтому **целью** настоящего исследования явилась оценка взаимосвязи между цитокиновым статусом клеток периферической крови женщин, сформированным в результате предгестационной ИЦТ, и длительностью ожидания наступления беременности после ИЦТ (time to pregnancy, TTP).

В исследование было включено 37 супружеских пар с диагнозом привычный выкидыш (N96 по МКБ-10) Всем женщинам перед планируемой беременностью проводилась ИЦТ в качестве монотерапии. Иммунизацию женщин лейкоцитами полового партнера проводили в середине фолликулярной фазы двух последовательных менструальных циклов, в течение которых была рекомендована негормональная контрацепция. С третьего менструального цикла контрацепция была отменена. Наступление беременности регистрировали в течение 12 последовательных менструальных циклов. Способность клеток к продукции провоспалительных (IFNγ, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNFα, IL-1β) и противовоспалительных (IL-4, IL-5, IL-10) цитокинов исследовалась с помощью культивирования и митогенной активации клеток цельной крови с использованием наборов «Цитокин-Стимул-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест») и последующего мультиплексного анализа с использованием стандартных наборов FlowCytomix™ (eBioscience) и проточной цитофлуорометрии. TTP определяли как количество менструальных циклов, прошедших с момента отмены

негормональной контрацепции до наступления беременности.

Из 37 женщин у 27 (73 %) было зарегистрировано наступление беременности. Только у одной (3,7 %) из 27 женщин беременность закончилась выкидышем в первом триместре. У остальных 26 (97,3 %) беременность завершилась своевременным рождением живых детей. У 10 (27 %) женщин после ИЦТ беременность не наступила. Из 27 женщин у 23 (84,2 %) беременность наступила в течение 6 циклов после проведения ИЦТ (TTP≤6), у 9 (33,3 %) женщин TTP=1, у 4 (14,8 %) женщин TTP=10-12.

По данным литературы одной из характеристик фертильности женщин является наступление желаемой беременности в течение 6 менструальных циклов (TTP≤6), отсутствие наступления беременности в течение 12 менструальных циклов рассматривается в качестве критерия бесплодия [3].

По данным ретроспективного анализа показатели цитокинового профиля в группах женщин с наступившей беременностью (TTP≤6) и женщин, у которых беременность не наступила в течение 12 менструальных циклов после предгестационной ИЦТ, не различались (данные не представлены). В группе беременных женщин проведение ИЦТ привело к увеличению соотношений IFNγ/IL-4 в 2,1 раза ($p<0,05$) и TNFα/IL-4 в 2,4 раза ($p<0,05$). В группе женщин, у которых беременность не наступила, баланс Th1/Th2 цитокинов при проведении ИЦТ не менялся.

После проведения ИЦТ отношение IFNγ/IL-4 в группе женщин с TTP≤6 было значимо выше, чем в группе женщин с ненаступившей беременностью (223,4 и 106,2, соответственно, $p=0,006$). Соотношение TNFα/IL-4 было также выше у пациенток с наступившей беременностью (585,6 и 189,7, соответственно, $p=0,007$).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что баланс Th1/Th2 цитокинов, сформированный в результате предгестационной ИЦТ, может являться фактором, определяющим вероятность наступления беременности у женщин с привычным выкидышем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? / T. G. Wegmann, H. Lin, L. Guilbert et al. // Immunol. Today.– 1993.– V. 14, № 7.– P. 353-356.
2. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site / G. Mor, I. Cardenas, V. Abrahams et al. // Ann N Y Acad Sci.– 2011.– V. 1221.– P. 80-87.
3. Definition and prevalence of subfertility and infertility / C. Gnoth, E. Godehardt, P. Frank-Hermann et al. // Hum Reprod.– 2005.– V. 20, № 5.– P. 1144-1147.

CYTOKINES PRODUCTION BY WHOLE BLOOD CELLS AND TIME TO PREGNANCY AFTER PRE-PREGNANCY LEUKOCYTE IMMUNIZATION AT RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION

Stepanova E. O., Nikolaeva M. A., Golubeva E. L., Vtorushina V. V., Saribegova V. A., Tetruashvili N. K., Vanko L. V., Krechetova L. V.

Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology» Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

Aim of the study was the determination of relationships between the time to wanted pregnancy (TTP) in relation to cytokine production by female whole blood cells after pre-pregnancy leukocyte immunotherapy (LIT) at recurrent spontaneous abortion treatment. It was shown that the prolongation of TTP after LIT may considered as a marker of the transitory disturbance of implantation owing to Th1/Th2 imbalance which may be triggered by pre-pregnancy immunization.

Keywords: Th1/Th2 cytokines, time to pregnancy, leukocyte immunotherapy, recurrent spontaneous abortion.

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ TGF-β1И ИЛ-18 В СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЕ ПОЛОВОГО ПАРТНЕРА КАК ПРЕДИКТОР ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММЫ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Николаева М.А., Бабаян А.А., Степанова Е.О., Смольникова В.Ю., Ванько Л.В., Калинина Е.А., Кречетова Л.В.

ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Целью исследования явилась оценка влияния цитокинового состава семенной плазмы (СП), используемой для интравагинальной аппликации, на эффективность программы ЭКО/ИКСИ. Установлено, что вероятность наступления беременности в программе ЭКО с применением аппликации СП зависит от индивидуальных иммуномодулирующих свойств СП полового партнера и определяется концентрацией IL-18, содержанием TGF-β1 и IL-18 во всем объеме семенной плазмы, полученной при эякуляции и соотношением TGF-β1/IL-18.

Ключевые слова: семенная плазма, TGF-β1, IL-18, экстракорпоральное оплодотворение.

На сегодняшний день экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) является одним из основных и самых эффективных методов лечения бесплодия, однако эффективность ЭКО остается недостаточно высокой [1]. Особенностью программы ЭКО в отличие от естественного цикла зачатия является отсутствие контакта с семенной плазмой (СП). В многочисленных экспериментальных исследованиях было установлено, что СП оказывает иммуномодулирующее действие на функции эндометрия, в связи с чем были предприняты попытки использовать введение СП в репродуктивный тракт женщин для повышения эффективности программы ЭКО [2]. Однако, до сих пор не удалось подтвердить позитивное влияние введения СП партнера при проведении программы ЭКО. Мы предположили, что эффекты введения СП могут определяться ее иммуномодулирующим потенциалом, который, в свою очередь, может зависеть от баланса содержания трансформирующего фактора роста бета 1 (Transforming Growth Factor – beta 1, TGF-β1), ключевого цитокина СП, обеспечивающего формирование толерантности матери к антигенам плода [3,4], и провоспалительного интерлейкина 18 (IL-18), возможно, препятствующего имплантации [5].

Поэтому **целью** настоящего исследования явилось определение зависимости эффективности лечения бесплодия методом ЭКО/ИКСИ, дополненного аппликацией СП в день проведения трансвагинальной пункции от содержания TGF-β1 и IL-18 в СП полового партнера.

Всем пациентам, включенным в исследование (n=71), проводилась процедура ЭКО/ИКСИ согласно стандартному протоколу, дополненному аппликацией 0,5 мл СП в день проведения ТВП. Перед проведением ТВП яичников мужчинам рекомендовалось воздержание от половой жизни в течение 3-5 дней. Уровень цитокинов определяли в образцах СП партнера, которую вводили в задний свод влагалища пациентки в день ТВП. Содержание TGF-β1 и ИЛ-18 оценивали с помощью проточной цитофлуорометрии и флуоресцентных микросфер с использованием специальных наборов – Human TGF- β1 и IL-18 Flow Cytomix Simplex Kits (Bender Med Systems) и проточного цитофлуориметра FACS Calibur (Becton Dickinson).

В зависимости от результатов лечения были выделены две группы: 1 группу составили пациентки с успешным исходом программы ЭКО/ИКСИ (n=32), 2 группу – женщины с отрицательным результатом лечения (n=39).

В результате ретроспективного анализа была выявлена зависимость эффективности лечения бесплодия методом ЭКО/ИКСИ, дополненного аппликацией СП в день проведения ТВП от содержания TGF-β1 и IL-18 в СП полового партнера.

С помощью ROC анализа было установлено, что содержание IL-18 в эякуляте половых партнеров пациенток является наиболее значимым предиктором успеха ЭКО/ИКСИ. Площадь под кривой составила 0,75, чувствительность и специфичность теста 0.94 и 0.51; положительная и отрицательная прогностическая значимость составили 0.61 и 0.91, соответственно. При содержании IL-18 в СП, не превышающем 1432,4 пг, вероятность наступления беременности составляла 61,2 %. При уровне IL-18 более данного значения вероятность положительного исхода уменьшалась в 6,7 раза и составляла 9,1 % (p=0.005). С помощью алгоритма CART (Classification and Regression Tree) было продемонстрировано, что содержание IL-18 в эякуляте, соотношение TGF-β1/IL-18, а также концентрация и содержание TGF-β1 позволяют прогнозировать исходы программы ЭКО/ИКСИ, включающей контакты с семенной плазмой. Чувствительность и специфичность теста составили 0.88 и 0.82; положительная и отрицательная прогностическая значимость составили 0.61 и 0.91, соответственно, и площадь под кривой составила 0.93.

В представленной работе впервые установлено, что контакт со спермой, в плазме которой выявляется дисбаланс содержания TGF-β1 и IL-18цитокинов, может негативно влиять на репродуктивную функцию женщин, приводя к нарушениям имплантации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. European IVF-Monitoring Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology. Assisted reproductive technology in Europe 2010: results generated from European registers by ESHRE / M. S. Kupka, A. P. Ferraretti, J. de Mouzon et al. // Hum Reprod.– 2014.– V. 29.– P. 2099-2113.
2. The role of seminal plasma for improved outcomes during in vitro fertilization treatment: review of the literature and meta-analysis / G. Crawford, A. Ray, A. Gudi et al. // Hum Reprod Update.– 2015.– V. 21.– P. 275-284.
3. Tremellen K. P., Seamark R. F., Robertson S. A. Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus / K. P. Tremellen, R. F. Seamark, S. A. Robertson // Biol. Reprod.– 1998.– V. 58.– P. 1217-1225.
4. Transforming growth factor beta-a mediator of immune deviation in seminal plasma / S. A. Robertson, W. V. Ingman, S. O'Leary et al. // J. Reprod. Immunol.– 2002 – V.57.– P. 109-128.
5. Lédée-Bataille N., Olivennes F., Kadochetal J. Detectable levels of interleukin-18 in uterine luminal secretions at oocyte retrieval predict failure of the embryo transfer / N. Lédée-Bataille, F. Olivennes, J. Kadochetal // Hum. Reprod.– V. 19.– P. 968-973.

SEMEN TGF-β1 AND IL-18 AS PREDICTORS OF IVF/ICSI OUTCOME AFTER THE INTRAVAGINAL APPLICATION OF SEMINAL PLASMA DURING OVUM PICK-UP

Nikolaeva M. A., Babayan A. A., Stepanova E. O., Smolnikova V. Y., Vanko L. V., Kalinina E. A., Krechetova L. V.

The Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

This study aimed to determine the prognostic significance of seminal plasma (SP) transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1) and interleukin-18 (IL-18) levels for IVF/ICSI outcome at intravaginal application of SP at the time of follicle aspiration. Retrospective analysis was shown that the concentrations of IL-18, content per ejaculate of IL-18 and TGF-β1 and TGF-β1/IL-18 ratio in SP obtained on the day of ovum pick-up are strong predictors of IVF/ICSI success.

Keywords: seminal plasma, IVF/ICSI outcome, TGF-β1, IL-18.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ОЦЕНКЕ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ TLRs ПРИ ПАТОЛОГИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Свитич О. А., Кукина П. И., Ганковская Л. В.

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова; ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России; Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

МикроРНК – короткие одноцепочечные молекулы, способные участвовать в регуляции различных биологических процессов, включая реакции иммунной системы. Они способны изменять экспрессию молекул сигнальных путей TLR (Toll-like receptor), что приводит к изменению иммунного ответа. В частности, миРНК регулируют работу врождённого иммунитета во время беременности. Показано, что у беременных с преждевременными родами экспрессия генов TLR1, TLR2, TLR4 клетками цервикального канала возрастала в среднем в 52,5, в 40,7 и в 2,4 раза, соответственно, по сравнению с группой женщин с физиологически протекающей беременностью. Полученные данные можно объяснить регуляторной функцией миРНК в этих клетках.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, миРНК, патология беременности, TLR, экспрессия.

В последние годы большое количество исследований связано с изучением регуляции иммунных реакций посредством регуляторных молекул микроРНК (миРНК). МиРНК представляют собой одноцепочечные РНК длиной 20-24 нуклеотида. Они участвуют в посттранскрипционной регуляции работы различных генов, в том числе генов врождённого и приобретённого иммунитета. МиРНК могут изменять экспрессию молекул сигнальных путей, которые запускаются при активации рецепторов врожденного иммунитета. В последние годы возрос интерес к изучению распознающих структур врождённого иммунитета, таких как TLR (Toll-like receptor) [3, 5]. Активация TLR и последующий каскад реакций приводит к выработке воспалительных цитокинов (фактор некроза опухолей альфа, интерлейкины 1, 6, 12) и к активации иммунитета. Изменение экспрессии миРНК и сигнальных молекул может приводить к изменению иммунного ответа, к примеру, через экспрессию миРНК-146а/б и миРНК-155. МиР-146 изменяет экспрессию адапторных протеинов молекулы MyD 88 (tumor necrosis factor receptor associated factod 6, IL-1 receptor-associated kinase 1), а миР-155 – сигнальных белков (supressor of cytokine signalling 1, TAK-binding protein 2). Клетки используют миР-146 для достижения иммунной толерантности при уровне ЛПС ниже воспалительного, а при провоспалительных дозах ЛПС активируется миР-155, чтобы уменьшить воспаление. Экспрессия миР-146 динамична. В начальной фазе воспалительного ответа в макрофагах на короткий период времени происходит изменение в работе миРНК содержащих комплексов: за счёт фосфорилирования AGO2 (белок, образующий комплекс с миРНК) меняется характер миРНК-вызванной репрессии воспалительных цитокинов. Стимуляция рецептора TLR 4 липополисахаридом (ЛПС) активирует регуляторный цикл PI-3K/Akt (фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназа AKT), который состоит из let-7e, миР-155, мишеней TLR 4 и супрессора сигнала цитокина 1 (supressor cytokine signalling 1). В макрофагах с недостатком Akt супрессируется let-7e и синтезируется в избытке миР-155, что обуславливает появление гиперчувствительного фенотипа клеток к ЛПС. Участие миРНК во врождённом иммунитете является клеточно- и видоспецифичным. В человеческих моноцитах и нейтрофилах при активации TLR 4 с участием NFkB вызывает выработку миР-9, в то время как в мышиных макрофагах обратная связь NFkB обеспечивается миР-210 [4, 5]. Известно, что регуляторные РНК могут принимать активное участие в регуляции экспрессии факторов врожденного иммунитета во время беременности. Но каким образом изменяются факторы врожденного иммунитета при бере-

менности, осложненной урогенитальной инфекцией, до конца не исследовано[1,2].

Целью данной работы являлось изучение экспрессии генов TLR в эпителиальных клетках цервикального канала и, в перспективе, исследование регуляции данных процессов.

Нами были изучены уровни экспрессии генов TLRs клетками слизистой цервикального канала – TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 в группах здоровых беременных и беременных с преждевременными родами. У здоровых беременных женщин наиболее выражена экспрессия гена TLR2, распознающего широкий спектр патогенов. У беременных с преждевременными родами и урогенитальной инфекцией (УГИ) экспрессия генов TLR1, TLR2, TLR4 клетками цервикального канала возрастала в среднем в 52,5, в 40,7 и в 2,4 раза соответственно по сравнению с группой женщин с физиологически протекающей беременностью. Еще более выраженное увеличение экспрессии TLR1 и TLR2 наблюдалось в группе женщин с реализацией внутриутробной инфекции. Гиперэкспрессия генов TLRs в слизистой у женщин с преждевременными родами инфекционного генеза сопровождалась увеличением выработки провоспалительных цитокинов ИЛ-8 и ИФНg. У 70% женщин с прервавшейся беременностью концентрация ИЛ-8 в цервикальной слизи была выше 3000 пг/мл, в группе здоровых беременных этот показатель составил 2106±170пг/мл. Средние значения ИФНg в слизи цервикального канала у женщин с прервавшейся беременностью были достоверно выше, чем в группе женщин с УГИ, родившими в срок и составили 114±53,4 пг/мл и 3,8±1,9 пг/мл соответственно ($p < 0,05$).

В нашей работе было показано, что показатели экспрессии распознающих структур врожденного иммунитета и продукции цитокинов сильно разнятся в зависимости от пациента и от наличия урогенитальной патологии. Разброс в показателях экспрессии рецепторов может быть связан с профилем экспрессии регуляторных РНК молекул. Гипотеза о том, что миРНК могут влиять на показатели экспрессии индивидуально у каждого пациента, требует дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Herpes simplex virus type 2 infection during pregnancy is cirrelated with elevated TLR9 and TNFα expression in cervical cells / O. A. Svitich, L. V. Gankovskaya, V. F. Lavrov et al.// International Trendsin Immunity.– 2014.– V. 2. № 1.– P. 62-66.
2. Ганковская О. А. Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов TLR2 и TLR9 с преждевременными родами и внутриутробным инфицированием / О. А. Ганковская // Медицинская иммунология.– 2010.– Т. 12. № 1-2.– С. 87-94.
3. Ганковская О. А., Зверев В. В. Взаимодействие вирусов и Toll-подобных рецепторов / О. А. Ганковская, В. В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.– 2010.– № 2.– С. 101-105.
4. Лавров В. Ф., Ганковская О. А., Кривцов Г. Г. Перспективная модель для тестирования функции Toll-подобных рецепторов IN VITRO / В. Ф. Лавров, О. А. Ганковская, Г. Г. Кривцов // Физиология и патология иммунной системы.– 2009.– Т. 13. № 12.– С. 3-6.
5. Xiaobing H., Zhizhong J., Guofeng C. MicroRNAs: New Regulators of Toll-Like Receptor Signalling Pathways / H. Xiaobing, J. Zhizhong, C. Guofeng // Bio Med Research International.– 2014.– 14 p.

NEW METHODS OF TLRs GENES EXPRESSIONDETECTION DURING PREGNANCY PATHOLOGY

Svitich O. A., Kukina P. I., Gankovskaya L. V.

I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences; N. I. Pirogov Russian National Research Medical University; I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

MicroRNAs are small non-coding molecules which can act as regulators of different biological processes including the immune reactions. They can change the expression of the molecules that take part in TLR (Toll-like receptor) pathways. MiRNAs regulate innate immune response during pregnancy. It is shown that in group of pregnant women with premature birth the expression of genes TLR1, TLR2, TLR4 in cervix has increased on average at 52.5, at 40.7 and 2.4 times, respectively, compared with the control group. The obtained data can be explained by the regulatory function of miRNAs in these cells.

Keywords: innate immunity, miRNAs, pregnancy, TLR, expression.

СОСТОЯНИЕ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У НОВОРОЖДЕННЫХ С ПЕРИНАТАЛЬНЫМ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ЦНС ОТ МАТЕРЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ, ОСЛОЖНЕННОЙ СИНДРОМОМ ЗАДЕРЖКИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА

Левкович М. А., Крукиер И. И., Кравченко Л. В., Авилова О. В., Левкович А. Ю.

ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии "МЗ РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Проведено исследование содержания про- и противовоспалительных цитокинов в пуповинной крови новорожденных с ранней манифестацией перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС от матерей с ХПН и СЗРП. Показано что, развитие перинатального поражения ЦНС сопряжено с нарушением цитокинового баланса с тенденцией направленности по Th1-типу, нарушении эффекторной функции иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: перинатальное поражение ЦНС, цитокины, плацентарная недостаточность.

Хроническая плацентарная недостаточность (ХПН) – одна из актуальных проблем в современном акушерстве-гинекологии и перинатологии, поскольку приводит к тяжёлым осложнениям беременности, течения родов и влияет на здоровье новорожденных [1, 2]. При наличии у матери ХПН развитие плода сопровождается внутриутробной гипоксией, которая является основным этиологическим фактором перинатальной патологии нервной системы, причиной изменений церебральной гемодинамики [3]. Возникающая при этом трофическая недостаточность протекает с нарушением всасываемости и усвоения питательных веществ через плаценту, дефицитом транспорта кислорода. Эти метаболические изменения приводят к появлению синдрома задержки развития плода (СЗРП), внутриутробной гипотрофии. Непосредственной реакцией на гипоксию у плода и новорожденного является повышение работы сердца, мозгового кровотока и обеспечение кислородом мозговой ткани. Таким образом, длительное воздействие неблагоприятных внутриутробных диктует необходимость наблюдения за данной группой новорожденных в связи с риском формирования поражения ЦНС, что позволит избежать тяжелых последствий перинатальной гипоксии для дальнейшего развития ребенка.

Иммунная система новорожденного, как и нервная система, является интегрирующей, ответственной за сохранение постоянства его внутренней среды, особенно в условиях постнатальной адаптации. Состояние иммунной системы, определяет выживание ребенка, эффективность лечебных и реабилитационных мероприятий. На основании современных и высоко информативных методов доказана взаимосвязь иммунной системы и центральной нервной системы [4, 5].

Целью исследования явилось определение цитокинового статуса у новорожденных с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС от матерей с ХПН, осложненной СЗРП.

В исследование были включены 35 новорожденных от матерей с ХПН и СЗРП во время беременности, перинатальное поражение ЦНС у которых клинически выявлялось с рождения (I группа) и 20 новорожденных от матерей

с физиологическим течением беременности и родов (контрольная группа). Определение цитокинов в пуповинной крови новорожденных проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Реакцию проводили согласно рекомендациям производителя. IL-1β, IL-6, TNF-α, с использованием тест-систем фирмы Цитокин (С.-Петербург, Россия), IL-4, IFN-γ – с использованием тест-систем Bender Medsistems (Австрия). При определении статистической обоснованности различия исследуемых групп применялся критерий Манна-Уитни для независимых групп и критерий Вилкоксона для зависимых групп.

У новорожденных в группе I содержания IL-1β в пуповинной крови превысило показатели контрольной группы в 2,1 раз (62,5± 14,8 пг/мл против 30±11,1 пг/мл, p<0,05). Повышение уровня IL-1β может являться пусковым фактором воспалительных деструктивных реакций, приводящих к нарушению проницаемости гематоэнцефалического барьера и появлению ранней неврологической симптоматики.

Цитокинопосредованная воспалительная реакция играет важную роль в каскаде процессов, приводящих к гипоксически-ишемическому поражению мозга. Анализируя результаты исследования содержания IL-6, нам удалось установить следующие факты: в пуповинной крови у новорожденных в группе I по сравнению с контрольной группой выявлено достоверное повышение перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС 6(104,6±32,9 пг/мл против 9,4±2,6 пг/мл, p<0,05).

Известно, что TNF-α усиливает постишемическое повреждение мозга, оказывая провоспалительное и прокоагулянтное действие на эндотелий, что ведет к нарушению микроциркуляции. Биологический эффект данного цитокина выражается в прогрессировании гипоксии, стимулировании синтеза других цитокинов и проникновении лейкоцитов в очаг ишемии. В нашей работе уровень TNF-α в пуповинной крови в I группе достоверно превышал показатели контрольной группы (105,3±36,2 пг/мл против 36,6±7,8 пг/мл, p<0,05).

IFN-γ – основной цитокин, связанный с развитием демиелинизирующих процессов. Было обнаружено достоверное повышение его содержания в пуповинной крови новорожденных при ХПН и СЗРП (62,8±15 пг/мл), что превышало показатели контроля в 3,3 раза, (p<0,05). При изучении содержания противовоспалительного цитокина IL-4 статистически значимых различий между группами не обнаружено.

Таким образом, развитие перинатального поражения ЦНС у новорожденных от матерей с ХПН, осложненной СЗРП сопряжено с нарушением цитокинового баланса с тенденцией направленности по Th1-типу, нарушении эффекторной функции иммунокомпетентных клеток и способствует формированию воспалительного режима иммунорегуляции.

Выявленные особенности цитокинового статуса дают основание для разработки схем ранней доклинической диагностики перинатального поражения ЦНС у данного контингента детей, что будет способствовать улучшению состояния их здоровья и снижению риска инвалидизации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Манухин И. Б., Маркова Е. В., Стрюк Р. И. Оптимизация комплексного лечения беременных с гестозом и фетоплацентарной недостаточностью / И. Б. Манухин, Е. В. Маркова, Р. И. Стрюк // Российский вестник акушера-гинеколога.– 2012.– № 2.– С. 26-29.
2. Кузьмин В. Н. Фетоплацентарная недостаточность: проблема современного акушерства / В. Н. Кузьмин // Лечащий врач.– 2011.– № 3.– С. 19-21.
3 Стрижаков А. Н., Липатов И. С., Тазиков Ю. В. Комплексная оценка степени тяжести хронической плацентарной недостаточности / А. Н. Стрижаков, И. С. Липатов, Ю. В. Тазиков // Акушерство и гинекология.– 2012.– № 3.– С. 20-25.
4. Роль цитокинов в развитии церебральных поражений у новорожденных от матерей с гестозами / Т. Е. Рогалева, П. П. Терешков, Т. А. Федосеева и др. // Забайкальский медицинский вестник.– 2007.– № 2.– С. 21-25.
5. Левкович М. А., Линде В. А., Плахотя Т. Г. Иммунологические факторы риска развития церебральных нарушений у новорожденных от матерей с плацентарной недостаточностью / М. А. Левкович, В. А. Линде, Т. Г. Плахотя // Российский иммунологический журнал.– 2013.– Т. 7, (16), № 2-3.– С. 314.

THE STATE OF CYTOKINE STATUS IN NEWBORNS WITH PERINATAL HYPOXIC-ISCHEMIC CNS DAMAGE FROM MOTHERS WITH CHRONIC PLACENTAL INSUFFICIENCY, COMPLICATED BY THE SYNDROME OF DELAYED FETAL DEVELOPMENT

Levkovich M. A., Krukier I. I., Kravchenko L. V., Avilova O. V., Levkovich A. Yu.

Rostov research Institute of obstetrics and pediatrics, Rostov-on-Don, Russia

The study of Pro – and anti-inflammatory cytokines in umbilical cord blood of newborns with early manifestation of perinatal hypoxic-ischemic CNS lesions from mothers with chronic renal failure and szrp. It is shown that the development of the CNS involves a breach of cytokine balance with a tendency for orientation of Th1-type, violating the effector function of immune cells.

Keywords: perinatal CNS damage, cytokines, placental insufficiency.

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН: ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ

Заморина С. А.[1,3], Тимганова В. П.[1], Бочкова М. С.[1], Храмцов П. В.[3], Раев М. Б.[1,3], Черешнев В. А.[1,2,3]

[1]Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь; [2]Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург; [3]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Баланс между субпопуляциями Т-регуляторных (Treg) и ИЛ-17-продуцирующих лимфоцитов (Th17) является одним из механизмов формирования периферической толерантности при беременности. Однако роль альфа-фетопротеина (АФП) в регуляции молекулярно-генетических и иммуноморфологических процессов дифференцировки этих субпопуляций не изучена. Направленная модуляция Th17 имеет огромный терапевтический потенциал, поскольку эти клетки участвуют в развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Treg, в свою очередь, контролируют иммунный ответ, предупреждая созревание аутоиммунных и аллергических реакций и поддерживая трансплацентарную толерантность. Понимание механизма действия АФП на дифференцировку Treg и Th17 позволит объяснить его вклад в формирование толерантности в период беременности и оценить его терапевтический потенциал.

Ключевые слова: альфа-фетопротеин (АФП), иммунная толерантность, ИЛ-17-продуцирующие лимфоциты (Th17), Т-регуляторные лимфоциты (Treg), рецептор для АФП (RECAF).

Альфа-фетопротеин (АФП) – один из наиболее известных эмбриоспецифических белков, характерных для внутриутробного периода развития млекопитающих. Изменение уровня АФП в материнской сыворотке используется как диагностический тест для обнаружения некоторых аномалий развития плода. АФП является также опухолевым маркером, ассоциированным с первичным раком печени и тератокациномой. АФП принадлежит к семейству белков альбуминоидных генов, и структурно представляет собой гликопротеин (3-5% углеводов) с молекулярной массой 68-75 kDa. На данный момент известно о существовании до десяти изоформ АФП, различающихся значениями pI и способностью связывать лектины [1]. В силу этого факта, важно иметь адекватные способы получе-

ния АФП, учитывающие эти особенности [2]. Первичная структура АФП человека полностью расшифрована и обнаружение в ней множества последовательностей, сходных по структуре с полипептидными участками различных белков (EGF, TGF-β1, PSG), привело к предположению о многофункциональности этого белка. Исследования, связанные со структурно-функциональным картированием АФП, подтверждают эту гипотезу[1].

Высокие концентрации АФП в сыворотке развивающегося плода свидетельствуют о том, что этот белок играет важную роль в эмбриогенезе. Так, АФП, являясь эволюционным аналогом сывороточного альбумина, выполняет функцию основного транспортного белка вовремя эмбрионального развития. Кроме этого, АФП обладает способностью регулировать пролиферацию и дифференцировку эмбриональных клеток [1]. АФП также подавляет иммунитет, предохраняя плод от иммунного отторжения организмом матери. Иммуносупрессивные свойства АФП послужили основой для создания лекарственного препарата [3]. Показана эффективность применения АФП при ряде заболеваний, однако не существует четкой концепции, объясняющей механизм его действия на уровне иммунной системы. С момента регистрации АФП как лекарственного средства (2002 г.), были идентифицированы новые субпопуляции Т-лимфоцитов (Т-регуляторные (Treg) и ИЛ-17-продуцирующие лимфоциты (Th17)). В последнее время стало очевидно, что баланс между этими субпопуляциями играет важную роль в формировании периферической толерантности, однако роль АФП в регуляции молекулярно-генетических и иммуноморфологических процессов дифференцировки Treg и Th17 не изучена. Очевидно, что направленная модуляция Th17 имеет терапевтический потенциал, так как эти клетки активно участвуют в развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Помимо этого, в настоящее время ведется активный поиск способов воздействия на Treg с целью их использования в иммунотерапии.

В последние годы существенно расширены представления о рецепторном аппарате для АФП. Так, на поверхности клеток выявлены разные типы рецепторов для АФП (RECAF), отличающиеся аффинностью, связывающей емкостью и, по-видимому, имеющие разное функциональное значение. Известны несколько фракций RECAF с молекулярной массой в пределах 62-65 kDa [4]. Однако первичная и пространственная структуры рецептора для АФП, а также строение гена и этапы внутриклеточной передачи сигнала остаются неизвестными. Недавно с помощью программного обеспечения Serometrix, специализирующемся на выявлении «стыковочных» участков между протеинами, определены предполагаемые рецепторы для С-концевого участка АФП. Предполагается, что С-концевой домен АФП связывается coscavenger-рецепторами (SR) CD36, CD163, Stabilin, SSC 5D, SRB1, SREC и scavenger-ассоциированными рецепторами (SAR) [4]. SR обнаружены на клетках моноцитарно-макрофагального и лимфоцитарного происхождения и в меньшей степени, на эпителиальных и эндотелиальных клетках. Множество биологических функций, опосредованных SR и SAR соответствуют уже известным эффектам АФП. Возможно, именно связыванием АФП с вышеупомянутыми рецепторами и обусловлено разнообразие его биологических эффектов. Важно, что именно активированные Т-лимфоциты и моноциты периферической крови человека связывают и интернализируют АФП, в то время как интактные клетки не обладают такой способностью [1].

Известно, что беременность сопровождается повышением уровня Treg с одновременным снижением Th17 на периферии. В 2008 г. методами протеомики продемонстрировано, что лишь несколько молекул регулируют иммунную толерантность матери, среди них – АФП [5]. Таким образом, можно с высокой степенью вероятности предположить, что АФП может направленно модулировать дифференцировку как Treg, так и Th17. Изучение и расшифровка механизмов действия АФП на дифференцировку и функциональную активность Treg и Th17 позволит объяснить вклад АФП в формирование толерантности в период беременности, а также механизмы его действия как фармакологического препарата.

Работа выполняется при финансовой поддержке РФФИ № 16-44-590971.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terentiev A. A., Moldogazieva N. T. Alfa-fetoprotein: a renaissance / A. A. Terentiev, N. T. Moldogazieva // Tumor Biol. – 2013. – V.34. – P. 2075-2091.

2. Способ выделения и очистки альфа-фетопротеина / М.Б. Раев.– Патент на изобретение RUS 2302424 от 10.07.2007.
3. Альфа-фетопротеин / В.А. Черешнев, С.Ю. Родионов, В.А. Черкасов и др.– Екатеринбург: УрО РАН, 2004.– 376 с.
4. Mizejewski G.J. The alpha-fetoprotein third domain receptor binding fragment: in search of scavenger and associated receptor targets / G.J. Mizejewski // Journal of Drug Targeting .– 2015.– V. 23(6).– P. 538-551.
5. The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules-a proteomicanalysis / M. Dong, G. Ding, J. Zhou et al. // Cellular Physiology and Biochemistry.– 2008.– V.21 (№ 5-6).– P. 463-472.

ALPHA-FETOPROTEIN: PROSPECTS FOR RESEARCH OF IMMUNOMODULATORY PROPERTIES

Zamorina S.A.[2,3], Timganova V.P.[2], Bochkova M.S.[2], Khramtsov P.V.[3], Rayev M.B.[1,3], Chereshnev V.A.[1,2,3]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm; [2]Institute of Immunology and Physiology, UB RAS, Ekaterinburg; [3]Perm State National Research University, Perm, Russia

The balance between subpopulations of T-regulatory (Treg) and IL-17-producing lymphocytes (Th17) is one of the peripheral tolerance mechanisms in pregnancy. However, the role of AFP in the regulation of molecular-genetic and immunomorphological differentiation processes of these subpopulations has not been studied. Directional Th17 modulation has great therapeutic potential, as these cells are involved in the development of autoimmune and inflammatory diseases. Treg control the immune response, preventing the maturation of autoimmune and allergic reactions and supporting transplacental tolerance. Understanding AFP modulation mechanism of Treg and Th17 differentiation will allow to explain its contribution to the development of tolerance during pregnancy and to assess its therapeutic potential.

Keywords: alpha-fetoprotein (AFP), immune tolerance, IL-17-producing lymphocytes (Th17) T-regulatory lymphocytes (Treg), receptor for AFP (RECAF).

Раздел 4
ИММУНОПАТОЛОГИЯ: ПАТОГЕНЕЗ И ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКИХ, АУТОИММУННЫХ, АУТОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК $CD4^+CD25^+FOXP3^+$-Т-КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ

Баранова Н. И., Коженкова С. В., Осипова М. В.

ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Минздрава России, Пенза, Россия

В работе изучено функциональные показатели естественных регуляторных Т-клеток по экспрессии мРНК $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ методом ПЦР в реальном времени у 50 больных хронической аутоиммунной крапивницей (ХАК) и 45 больных хронической идиопатической крапивницей (ХИК) по сравнению с показателями 30 здоровых лиц. Не выявлено достоверных различий изучаемых показателей ни в одной из изучаемых групп по сравнению со здоровыми людьми, что может свидетельствовать об участии в патогенезе хронической крапивницы других популяций регуляторных Т-клеток.

Ключевые слова: хроническая крапивница, экспрессия мРНК, $C4^+CD25^+FOXP3^+$.

В настоящее время патогенетические механизмы хронической крапивницы (ХК) несмотря на тщательное обследование пациентов так и не удалось до конца выяснить, хотя постоянно велись исследования в этом направлении. Именно у больных с хроническим течением заболевания многими исследователями был выявлен аутоиммунный механизм развития дерматоза. В 1983 г. были опубликованы первые сведения о связи ХИК и аутоиммунного тиреоидита, а в 1989 г. предложен термин «синдром аутоиммунного тиреоидита, хронической крапивницы и ангиоотека». В последствии, были получены данные о частом выявлении у больных с ХК эутиреоидных антител [3]. Но даже на сегодняшний день остается неясным, существуют ли причинно следственные связи между аутоиммунным тиреоидитом и ХК, или же, они являются параллельными аутоиммунными расстройствами. Патогенная роль аутоантител против щитовидной железы при ХК также остается неясной, как и до конца не ясна роль положительной пробы с аутосывороткой, которая до сих пор является критерием хронической аутоиммунной крапивницы (ХАК). Согласно современным исследованиям, одной из основных причин возникновения и развития аутоиммунного процесса может являться срыв естественной толерантности в иммунной системе. Известно, что поддержание иммунологической толерантности в организме осуществляет популяция естественных регуляторных Т-клеток (Treg) с фенотипом ($CD4^+25^+FOXP3^+$) и популяции адаптивных, индуцируемые антигеном на периферии, к которым относятся Tr1 и Th3 Т-клетки. Считается, что все Treg клетки, обладая супрессорной активностью, ингибируют функцию клеток-эффекторов, участвующих в развитии аутоиммунного процесса, тем самым провоцируя развитие аутоиммунных заболеваний [1]. Однако совершенно не ясна роль каждой из популяций регуляторных Т-клеток в патогенезе ХК. Из полученных в предыдущих исследованиях о ведущей роли аутоиммунного механизма в патогенезе как ХАК, так и ХИК, нас прежде всего интересовал вопрос участия Treg в каждой из изучаемых форм ХК.

Целью работы явилось изучение экспрессии мРНК $CD4^+25^+FOXP3^+$ у больных двух форм ХК – хронической аутоиммунной крапивницы (ХАК) и хронической идиопатической крапивницы (ХИК).

Материалы и методы. Было обследовано 95 больных ХК в возрасте от 18 до 60 лет (средний возраст составил 41±12 лет), из них 50 пациентов с диагнозом ХАК и 45 пациентов – с ХИК. Диагноз ХАК и ХИК устанавливался на этапе предварительного обследования на основании данных анамнеза, клинических проявлений болезни, длительности заболевания, анализа данных сопутствующих забо-

леваний, а также положительных результатов пробы с аутосывороткой. Диаметр пробы 7 мм и более являлся диагностическим критерием ХАК [1]. Пациенты с ХИК имели отрицательную пробу с аутосывороткой. Также было обследовано 30 здоровых людей (контрольная группа) в возрасте от 23 до 56 лет (средний возраст составил 34±9 лет), сопоставимых по полу и возрасту с группами ХАК и ХИК.

Оценка экспрессии мРНК FOXP3. Материалом для исследования служила периферическая кровь, которую забирали в пробирки с ЭДТА в конечной концентрации 2 мг/мл. Из полученных лимфоцитов наборами РНК-Экстран («ООО Синтол») выделяли РНК. Экспрессию мРНК FOXP3 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с предварительной обратной транскипцией (ОТ-ПЦР). Амплификацию проводили на приборе «ДТ-Лайт» в режиме реального времени. Уровень экспрессии мРНК FOXP3 определяли относительно экспрессии мРНК гена «домашнего хозяйства» HPRT1. В качестве контрольного образца гена «домашнего хозяйства» HPRT1 использовали β2 микроглобулин. Параллельно ставили 2 варианта опыта: с определением FOXP3 и определением β2 микроглобулина. Определение уровня экспрессии мРНК FOXP3 относительно мРНК HPRT1 проводили по формуле: [FOXP3]/[HPRT1]=E HPRT1 Cp1/E FOXP3 Cp 2, где E – эффективность амплификации, Cp1 – значение порогового цикла в образце для HPRT1, Cp2 – значение порогового цикла в образце для FOXP3 [2].

Из немногочисленных данных литературы известно, что аллергическому процессу свойственно повышение процентного содержания $CD4^+25^+FOXP3^+$ независимо от нозологии заболевания, его тяжести, особенностей сенсибилизации. В работах было доказано, что повышение проявляется особенно четко при ремиссии заболевания, однако данное повышение, как правило, сопровождается ослаблением функции этих клеток [4]. При этом экспрессия FOXP3 в клетках мононуклеарной фракции крови не изменяется. Аналогичные результаты без изменения экспрессия FOXP3 у больных ХАК и ХИК были получены и в наших исследованиях. Уровень естественных регуляторных Т-клеток по экспрессии мРНК FOXP3 достоверно не отличался от показателей контрольной группы и составил 0,299 у.е. [0,001-7,464] как в группе ХАК – 0,005 у.е. [0,000-0,13], так и в группе ХИК – 0,007 у.е. [0,001-0,18]. Полученные данные не согласуются с результатами Sun R. S., et all., [5]. В приведенной работе было получено снижение как количественных показателей $CD4^+25^+FOXP3^+$, так и функциональных показателей изучаемых клеток. Авторами делается вывод о возможном участии В-клеток в перестройке и дифференцировке Treg. По всей видимости, расхождение результатов по изучаемым результатам было получено из-за различия форм. Однако есть данные о возможном снижении супрессорной функции Treg при аутоиммунных заболеваниях. Было проведено исследование методом проточной цитометрии экспрессии $CD4^+25^+FOXP3^+$ на мононуклеарах периферической крови у пациентов с ХАК, и выявлено значительное снижение процента CD 4, CD 25, FOXP3 регуляторных Т-клеток, что, по мнению авторов, может способствовать прогрессированию аутоиммунного процесса [5].

Таким образом, у больных ХК функция естественных регуляторных Т-клеток по экспрессии мРНК FOXP3 в клетках мононуклеарной фракции крови достоверно не отличается от аналогичных показателей здоровых лиц, что может свидетельствовать об участии в патогенезе ХК других популяций регуляторных Т-клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новые аспекты в диагностике и лечении аутоиммунной крапивницы. / Б. А. Молотилов, А. В. Караулов, Е. А. Орлова и др. // Иммунопатология, аллергология, инфектология.– 2011.– № 4.– С. 11-14.
2. Разработка тест-системы для определения уровня экспрессии мРНК FOXP3 на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени. / А.А Ярилин, Л. П. Алексеев, О. В. Бурменская и др. // Иммунология – 2008.– Т. 29.– № 3.– С. 182-187.
3. Leznoff A., Sussman G. L. Syndrome of idiopathic chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity: a study of 90 patients. / A. Leznoff, G. L. Sussman // Journal of investigational allergology & clinical immunology: official organ of the International Association of Asthmology (INTERASMA) and Sociedad Latinoamericana de Alergia e Inmunología.– 1989.– № 84.– P. 66-71.
4. Regulatory $CD4^+CD25^+$ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. / Shi H. Z., Li S., Xie Z. F. et al. // Clin. Immunol.– 2004,– V. 113,– P. 172-178.
5. Detection of $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic autoimmune urticarial / R. S. Sun, J. F. Sui, X. H. Chen, // Australas J. Dermatol.– 2011.– Vol. 52. № 3.– P. 15-18.

STUDY EXPRESSION OF MRNA CD4+C 25+FOXP3+-T-CELLS IN PATIENTS WITH CHRONIC URTICARIA

Baranova N. I., Kozhenkova S. V., Osipova M. V.

Penza Institute of Postgraduate Medical Education, Russian Federation, Penza, Russia

It was studied the functional indices of natural regulatory T cells by expression mRNA $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ by method PCR in real-time in 50 patients with chronic autoimmune urticaria (CAU) and 45 patients with chronic idiopathic urticaria (CIU) in comparison with 30 healthy individuals. No significant differences investigated parameters, none of the studied groups in comparison with to healthy individuals, these data demonstrate, that may be other populations of regulatory T cells play the role in pathogenesis chronic urticaria.

Keywords: chronic urticaria, mRNA expression, $CD4^+CD25^+FOXP3^+$.

ПОЛИМОРФИЗМ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 4, 9 У БОЛЬНЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Сташкевич Д. С., Бурмистрова А. Л., Евдокимов А. В.

ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Цель: определить частоты встречаемости аллелей, генотипов, комбинаций генотипов SNPs Thr399Ile, Asp299Gly TLR4, -1237 T/C TLR9 у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области. Основной метод исследования – аллель-специфическая ПЦР с электрофоретической детекцией. Установлено повышение носителей аллеля с заменой -1237*T TLR9 и его гомозиготного генотипа у больных неспецифическим язвенным колитом. Таким образом, полиморфизм -1237 T/C TLR9 (rs5743836) может являться биологическим маркером неспецифического язвенного колита у русских Челябинской области.

Ключевые слова: TLR, неспецифический язвенный колит, полиморфизм.

Введение. Воспалительные заболевания кишечника, к которым относятся язвенный колит и болезнь Крона, были и остаются одной из наиболее серьезных проблем в современной гастроэнтерологии [1]. Несмотря на многолетнюю историю изучения НЯК, этиология данного заболевания остается нераскрытой, а патогенез изучен недостаточно, однако большая роль в развитии предрасположенности отводится генетическим факторам. В настоящее время считается, что нарушения регуляции иммунного ответа, в том числе потеря толерантности к резидентной микрофлоре и пролонгированная гиперактивация TLR в значительной степени участвуют в патогенезе НЯК [3, 5]. В последние годы среди генетических факторов тесно связанных с воспалительными заболеваниями кишечника, TLR полиморфизмы привлекают все большее внимание [2, 5]. Согласно ряду исследований в слизистой кишечника больных НЯК повышена экспрессия TLR2, 4, 9 [4].

Ген TLR4 располагается на 9 хромосоме и несет большое количество полиморфизмов, среди которых наиболее изучаемыми являются 2: Asp299Gly (A/G, rs4986790) и Thr399Ile (C/T, rs4986791) [3].

Ген, кодирующий TLR9, располагается на третьей хромосоме. Среди полиморфизмов в гене TLR9 наиболее значимым является однонуклеотидный полиморфизм в позиции -1237 T/C (rs5743836). Согласно литературным дан-

ным, трансферсия нуклеотидов создает потенциальный сайт связывания для нуклеарного фактора NF-κB [5].

Цель. Определить частоты встречаемости аллелей, генотипов, комбинаций генотипов SNPs Thr399Ile, Asp299Gly TLR4, -1237 T/C TLR9 у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области.

Материалы и методы. Группа больных НЯК – 94 человека. Набор больных осуществлялся случайным образом в гастроэнтерологическом отделении Областной клинической больницы с 2011 по 2014 гг. В качестве группы сравнения использовались потенциальные доноры костного мозга русской популяции Челябинской области из регистра ГБУЗ «Челябинской областной станции переливания крови» (131 человек). Принадлежность к популяционной группе определялась по данным генеалогического анамнеза до третьего поколения (согласно рекомендациям 8-го Международного Симпозиума в 1980 г., Лос-Анджелес, США). В качестве биологического материала для исследования использовалась венозная кровь, взятая в пробирки с 0,5 % раствором калиевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Выделение ДНК проводили с использованием реагентов PROTRANS DNA Box 500. (Protrans, Germany). Генотипирование SNPs 299, 399 TLR4, -1237 TLR9 проводилось с помощью ПЦР (реактивы НПФ «Литех») с последующей визуализацией ампликонов в УФ свете. Статистическая обработка проводилась с помощью стандартных иммуногенетических критериев: критерий Пирсона (x^2), точный двухсторонний критерий Фишера, критерий отношения шансов (OR) с 95 % доверительным интервалом (CI). Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми при $p > 0,10$; для промежуточных значений p ($0,05 \leq p \leq 0,10$) обсуждали тенденцию к различиям.

Результаты. Установлено распределение аллелей, генотипов и комбинаций генотипов генов TLR4, TLR9 у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области.

В группе больных повышена частота с заменой -1237*T (18,1 % *vs* 11,5 %, p=0,05; OR=1,7, 95 % CI 1,01-2,9). Данное повышение обусловлено накоплением носителей гомозиготного генотипа по редкой аллели среди больных НЯК (7,5 % *vs* 0 %, p=0,0019).

Частоты аллелей и генотипов, образованных однонуклеотидным полиморфизмом в гене TLR4, соответствующим замене Asp299Gly в белке, не отличались между исследуемыми выборками. Частоты аллелей другого однонуклеотидного полиморфизма в гене TLR4S, кодирующего замену в белке Thr399Ile, также не отличались между исследуемыми выборками. В группе больных НЯК отсутствовали носители гомозиготного варианта по редкой аллели Thr399Ile, и была повышена частота встречаемости гетерозиготного генотипа Thr399Ile (19,1 % *vs* 11,9 %, p=0,1).

При последующем анализе распределения частот встречаемости комбинаций генотипов, образованных точковыми полиморфизмами в генах TLR4, TLR9 была выявлена комбинация генотипов Asp 299 Asp (A/A) TLR4 – -1237 T/T TLR9, встречающаяся только среди больных НЯК (7,7 % *vs* 0 % p=0,06, тенденция).

Заключение. В результате проведенного пилотного исследования показано, что полиморфизм -1237 T/C (rs5743836) может являться биологическим маркером неспецифического язвенного колита у русских Челябинской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клинические рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом / В. Т. Ивашкин, Ю. А. Шелыгин, Д. И. Абдулхаков и др. // 2013.– 22 С.
2. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort / S. Bank, P. S. Andersen, J. Burisch et al. // PLOS ONE.– 2014.– Vol. 9(6): e98815 doi:10.1371/journal.pone.0098815.t001.
3. Cheng. Y., Zhu. Y., HuangvX. Association between TLR2 and TLR4 gene polymorphisms and the susceptibility to inflammatory bowel disease: a meta-analysis/ Y. Cheng, Y. Zhu, X. Huang // PLOS ONE.– 2015.– Vol. 10(5): e0126803. doi:10.1371/journal.pone.0126803.
4. Fan. Y., Liu. B. Expression of Toll-like receptors in the mucosa of patients with ulcerative colitis / Y. Fan, B. Liu // Experimental and therapeutic medicine.– 2015.– V. 9.– P. 1455-1459.
5. Association between Toll-Like Receptor 9 -1237 T/C Polymorphism and the Susceptibility of Inflammatory Bowel Diseases: A Meta-Analysis / J. Shang, X. Wang, W. Wang et al. // Yonsei Medical Journal.– 2016.– Vol. 57(1).– P. 153-164.

POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTORS 4, 9 IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS RUSSIAN POPULATION OF CHELYABINSK REGION

Stashkevich D. S., Burmistrova A. L., Evdokimov A. V.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Objective: To determine the frequency of alleles, genotypes, combinations of genotypes SNPs Thr399Ile, Asp299Gly TLR 4,-1237 T / C TLR 9 in patients with ulcerative colitis in Russian population of the Chelyabinsk region. The main method of research was allele-specific PCR with electrophoretic detection. It was shown the increasing of rare allele -1237 * T TLR 9 carriers and its homozygous genotype in patients with ulcerative colitis. Thus, polymorphism -1237 T / C (rs5743836) may be a biological marker of ulcerative colitis in Russian Chelyabinsk region.

Keywords: TLR, ulcerative colitis, polymorphism.

ДИНАМИКА СУБСТАНЦИИ Р У ДЕТЕЙ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ ПРИ ПРЕРЫВИСТОЙ БАРОКАМЕРНОЙ ГИПОКСИИ

Алеманова Г. Д.

Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия

Определяли влияние прерывистой барокамерной гипоксии на уровень субстанции Р в сыворотке крови 39 детей, больных бронхиальной астмой (БА) разной степени тяжести в период ремиссии. Курс прерывистой барокамерной гипоксии проводили условиях многоместной гипобарической барокамеры «Урал-1». Хороший клинический эффект чаще отмечался при легкой степени тяжести БА. Положительная динамика продукции нейропептида у детей с БА после курса прерывистой барокамерной гипоксии проявлялась уменьшением концентрации субстанции Р в сыворотке крови.

Ключевые слова: бронхиальная астма, гипобарическая барокамера, субстанция Р.

Введение. Длительные цели терапии бронхиальной астмы (БА) заключаются в достижении контроля симптомов, минимизации риска обострений и побочных эффектов лекарственных препаратов. Отмечается распространенность различных фенотипов астмы с особенностями механизмов патогенеза [1]. Сложный патогенез БА включает нейрогенные механизмы воспаления, которые влияют на тяжесть и течение заболевания [2]. Изучение нейрогуморальных механизмов с учетом функционирования системы нейропептидов у детей, страдающих БА, важны для разработки патогенетически обоснованных методов терапии. В качестве основного медиатора нейрогенного воспаления рассматривают субстанцию Р (СР).

Доказана целесообразность использования немедикаментозных методов лечения БА у детей, одним из которых является прерывистая барокамерная гипоксия (ПБГ). Однако влияние ПБГ на механизмы нейрогенного воспаления при БА у детей изучено недостаточно.

Цель исследования: оценка участия субстанции Р (СР) в патогенезе БА у детей и влияния ПБГ на динамику данного показателя в зависимости от степени тяжести заболевания.

Материалы и методы. Обследовано 39 детей в возрасте 6-16 лет, страдающих атопической БА разной степени тяжести в периоде ремиссии (12 детей с легкой степенью тяжести и 27 пациентов – средней степенью тяжести), которые получили курс ПБГ. Группу контроля составили 30 условно здоровых детей того же

возраста. Диагноз БА устанавливали на основании данных анамнеза, общеклинического и аллергологического обследования. Средняя длительность болезни составила 4,1±0,4 года. У 48 % матерей обследованных детей выявлялась патология беременности. Патология периода новорожденности отмечалась у 28 % новорожденных. Искусственное вскармливание получали 51 % детей. Отягощенная наследственность была выявлена у 82 % детей. Непосредственной причиной первого бронхообструктивного синдрома были острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) – у 48 % детей. Патология со стороны ЛОР – органов были диагностированы 38 % детей.

Курс ПБГ в условиях многоместной гипобарической барокамеры «Урал-1» проводили по стандартной методике. Длительность лечения составила 24 сеанса продолжительностью 1 час [3]. Перед проведением курса ПБГ все пациенты были в состоянии ремиссии, которая была обусловлена базисной терапией (кромоны, ИГКС). Степень тяжести БА оценивали по ее клиническим проявлениям в период обострения. Основные клинические признаки заболевания оценивали согласно Национальной программе и ранжировали в период обострения БА в зависимости от их выраженности по пятибалльной системе [4]. Сумма баллов 4-8 соответствовала легкому течению БА, 9-13 – средней степени тяжести. Для оценки эффективности лечения в год, предшествующий и последующий курсу ПБГ сравнивались основные клинические признаки тяжести БА и длительность ремиссий. Эффект оценивали как хороший при разности баллов в 4 и более, как удовлетворительный – в 3 балла и неудовлетворительный – при меньшем количестве баллов. Содержание СР в сыворотке крови определяли до, после и через 3 месяца после ПБГ методом ИФА с использованием стандартных наборов. Полученные данные обработаны статистическими методами с использованием программы «Биостатистика». Выявление статистически значимых различий в сравниваемых группах осуществлялось на основе t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что результат лечения зависил от степени тяжести заболевания. Положительный клинический эффект через год после баролечения в зависимости от степени тяжести БА (легкой и средней степени) отмечался в 92,8 % и 77,3 % случаев соответственно. При этом хороший клинический эффект чаще отмечался при легкой астме (78,5 %), реже при среднетяжелой (50,7 %), а частота удовлетворительного эффекта наоборот увеличивалась при нарастании степени тяжести БА (14,3 % и 26,6 % соответственно). Неудовлетворительный клинический эффект чаще (у 22,7 % детей) отмечался при средней степени тяжести БА и только в 14,3 % случаев при легкой степени тяжести заболевания, что может быть связано с более частыми ОРВИ и патологией ЛОР – органов у детей при средней степени тяжести БА. Средняя концентрация СР в период ремиссии была значительно выше нормального значения (2,5± 0,91 пг/мл), причем у пациентов при средней степени тяжести БА показатель был достоверно выше, чем у больных при легкой степени тяжести БА (46,17±8,11пг/мл и 20,44±2,34пг/мл, соответственно). У больных с разной степенью тяжести БА отмечается неодинаковая динамика содержания нейропептида. Сразу после курса ПБГ отмечалось достоверное снижение показателя при легкой степени тяжести заболевания (от 20,44±2,34 до 9,41±1,12 пг/мл соответственно); при средней степени тяжести БА показатель снизился и стал достоверно меньше исходного только через 3 месяца после окончания ПБГ (от 46,17±8,11пг/мл до 20,36±4,41пг/мл соответственно). Такое значимое увеличение активности СР в период ремиссии БА обследуемых больных свидетельствует о наличии как аллергического, так и нейрогенного компонента воспаления в дыхательных путях. Накопление субстанции Р способно инициировать многие из патофизиологических реакций, свойственных БА (спазм гладкой мускулатуры бронхов, отек слизистой оболочки бронхов, гиперсекрецию слизи), и может углублять хронический воспалительный процесс в бронхах [5].

Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм лечебного эффекта ПБГ реализуется за счет модуляции механизмов нейроэндокринной регуляции, что проявляется ослаблением экспансии СР. Курс ПБГ оказывает положительное влияние на течение БА с достижением в большинстве случаев хорошего клинического эффекта как при легкой, так и при средней степени тяжести БА. ПБГ у наблюдаемых нами больных приводит к однонаправленным изменениям нейрогуморальной регуляции, которые проявляются снижением уровня СР, одного из механизмов нейрогенного воспаления.

Выявление корригирующего влияния ПБГ на механизмы нейрогенного воспаления открывает новые дополнительные возможности данного метода лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ненашева Н.М. Новые возможности лечения тяжелой бронхиальной астмы: от клинических исследований к портретам больных / Н.М. Ненашева // Российский аллергологический журнал.– № 3.– 2015.– С. 51-60.
2. Лев Н.С. Нейропептиды и другие нейрогуморальные регуляторы в патогенезе бронхиальной астмы у детей / Н.С. Лев // Российский вестник перинатологии и педиатрии.– 2000.– № 2.– С. 19-23.
3. Алеманова Г.Д. Способ повышения эффективности лечения бронхиальной астмы у детей и подростков с применением гипобарической гипоксической стимуляции: Новая медицинская технология ФС № 2010/045/ Г.Д. Алеманова.– Оренбург, 2010.– 30 с.
4. Чучалин А.Г. Национальная программа Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика / А.Г. Чучалин – М.: Атмосфера, 2008.– 106 с.
5. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases / D. Groneberg, D. Quarcoo, N. Frossard et al. // Allergy.– 2004.– V. 59.– P. 1139-1142.

DYNAMICS OF SUBSTANCE P IN CHILDREN WITH MODERATE BRONCHIAL ATOPIC ASTHMA IN INTERMITTENT HYPOXIA BAROKAMERNOY

Alemanova G.D.

Orenburg state medical University, Orenburg, Russia

Determine the effect of intermittent hypoxia barokamernoy at the level of substance P in the serum of 39 children patients with atopic bronchial asthma (BA) of varying degrees of severity in the period of remission. Intermittent hypoxia barokamernoy conducted conditions multi-user hypobaric pressure Chamber "Ural-1". Good clinical effect often observed when light gravity BA. The positive changes in the production of neuropeptides in asthmatic children after a course intermittent hypoxia barokamernoy appeared as lowered serum substance P concentrations.

Keywords: bronchial asthma, hypobaric chamber, substance P.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ МЕНСТРУАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ У ДЕВУШЕК-ПОДРОСТКОВ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ ОРЕНБУРГСКОЙ ОБЛАСТИ С РАЗЛИЧНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ

Комлева Н.В.[1], Комлева М.О.[2], Пушкарева Л.А.[2]

[1]ГБУЗ «Областная детская клиническая больница»; [2]ГБОУ ВПО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, Оренбург, Россия

Для изучения структуры гинекологической заболеваемости был проведен анализ ежегодных отчетов о гинекологической заболеваемости за 3 года, иммунного и гормонального статуса у 45 девушек с НМЦ и данных об антропогенной нагрузке. Показано, что 1-е место занимают НМЦ. Были выявлены изменения иммунной системы: снижение уровня лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ клеток), фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса и повышение уровня $CD19^+$ лимфоцитов, IgM и ЦИК. Гормональные изменения: повышение уровней ЛГ, ФСГ, соотношения ЛГ/ФСГ, дегидроэпиандростерон-сульфата, 17-ОН-прогестерона и снижение уровня эстрадиола.

Ключевые слова: девушки, нарушение менструального цикла, иммунный статус, антропогенная нагрузка.

В настоящее время большое внимание уделяется медико-социальным факторам формирования репродуктивного здоровья и потенциала девочек как будущих матерей. Установлено увеличение распространенности отдельных нозологических форм, в том числе, патологии эндокринной и мочеполовой систем, которые обусловлены загрязнением окружающей среды. Среди этиологических факторов, способствующих возникновению нарушений менструального цикла (НМЦ), ведущее место в последнее время отводится хроническим и острым инфекционным заболеваниям в детстве, хроническим соматическим заболеваниям, нарушениям функции эндокринных желез, а также агрессивным экологическим факторам [1]. В ранее проведенных работах было показано, что наибольшая антропогенная нагрузка характерна для Восточного Оренбуржья, а наименьший ее уровень отмечается в Западном регионе. Выявлено, что нарушения иммунного статуса наиболее выражены у детей, проживающих в Восточной зоне [2].

Цель исследования: изучить структуру первичной гинекологической заболеваемости и иммунный статус при НМЦ у девушек-подростков, проживающих на территориях Оренбургской области с различной антропогенной нагрузкой.

Материалы и методы. В работе был проведен анализ ежегодных отчетов о гинекологической заболеваемости девушек 15-17 полных лет за 2012-2014 годы по формам, утвержденным МЗ РФ, определение гормонального и иммунного статуса у 45 девушек с НМЦ. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного пакета Stadia 7,0.

Установлено, что особое место среди гинекологической патологии на территориях Центральной, Восточной и Западной зон области занимают НМЦ, средний показатель которых за 2012-2014 годы составил 53,2 %, то есть, проблема касается каждой второй девушки. На втором месте в структуре – воспалительные заболевания гениталий (38,5 %), 3-е место занимают нарушения полового созревания (8,3 %). Среди нарушений менструальной функции у девушек преобладали дисменореи – 41,6 %, олигоменореи – 38,4 %, меноррагии – 15,1 %.

При исследовании гормональных показателей установлено, что чаще всего НМЦ характеризовались повышением уровней ЛГ, ФСГ, соотношения ЛГ/ФСГ, дегидроэпиандростерон-сульфата, 17-ОН-прогестерона и снижением уровня эстрадиола.

При изучении иммунограмм у большинства пациенток с НМЦ были выявлены изменения, связанные со снижением уровня лимфоцитов, в том числе $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ клеток, уменьшением фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса, а также повышением содержания $CD19^+$ лимфоцитов, IgM и ЦИК. У девушек с диагнозом вторичная аменорея зарегистрировано максимальное снижение фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса, уровень ЦИК достоверно повышен.

Установлено, что олигоменореи и меноррагии чаще выявлялись у девушек Центрального и Восточного Оренбуржья, дисменореи – в Центральной и Западной зонах. Положительные корреляционные связи были выявлены между показателями антропогенной нагрузки во всех регионах Оренбургской области и частотой встречаемости гинекологической заболеваемости: воспалительные заболевания гениталий, задержка полового развития (ЗПР), олигоменорея, меноррагия, дисменорея, вторичная аменорея, синдром предменструального напряжения (ПМС) и кисты.

По Западному региону наибольшее количество положительных корреляционных связей было выявлено между показателями загрязнения воды, почвы и атмосферного воздуха, а также между суммарной антропогенной нагрузкой и частотой выявленных заболеваний: ЗПР, меноррагиями, дисменореями и кистами. Меньшее количество корреляционных связей наблюдалось с воспалительными заболеваниями и ПМС. В Восточном районе лидирующими по количеству положительных корреляционных связей с показателями загрязнения атмосферного воздуха, воды, почвы и суммарной антропогенной нагрузкой стали такие заболевания, как ЗПР, вторичная аменорея и кисты. Связи в меньшем количестве прослеживались с воспалительными заболеваниями, дисменореями и ПМС. По Центральному району ЗПР, олигоменореи, меноррагии и дисменореи имеют наибольшее количество положительных корреляционных связей с показателями загрязнения атмосферного воздуха, воды, почвы и суммарным загрязнением. Меньшее количество связей зарегистрировано с воспалительной патологией, вторичной аменореей и кистами.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии положительных корреляционных

связей во всех регионах между частотой встречаемости ЗПР и уровнем антропогенной нагрузки, а среди показателей загрязнения – с суммарным уровнем загрязнения и с загрязнением почвы.

Таким образом, прослеживается связь между уровнем антропогенного воздействия и развитием НМЦ у девушек, проживающих в трех зонах Оренбургской области, с формированием у них характерных гормональных и иммунологических показателей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуркин. Ю. А. Гинекология подростков / Ю. А. Гуркин // Руководство для врачей.– СПб: ИКФ «Фолиант», 2000.– 574 с.
2. Боев В. М. Здоровье населения и среда обитания Оренбургской области – 2-е издание, переработанное и дополненное / В. М. Боев // Оренбург: Печатный дом «Димур», 2013.– 328 с.
3. Добродеева Л. К., Щеголева Л. С., Сенькова. Л. Е. Взаимосвязи в системе иммунитета / Л. К. Добродеева, Л. С. Щеголева, Л. Е. Сенькова // Медицинская иммунология.– 2000.– Т. 2.– № 2.– С. 127.
4. Weller A., Weller L. Menstrual irregularity and menstrual symptoms / A. Weller, L. Weller // Behav Med.– 2002 Winter.– V. 27(4).– P. 173-178.
5. CD3+, CD8+, CTL – activity hithin the human female reproductine tract: influence of the menstrnal cycle and menopause / H. D. White, K. M. Crassi, A. L. Givan et al. // J. Immunolog.– 1997.– V. 158.– P. 3017-3027.

CLINICO-IMMUNOLOGICAL DISORDERS OF MENSTRUAL FUNCTION IN ADOLESCENT GIRLS HWO LIVE IN THE ORENBURG REGION WITH DIFFERENT ANTHROPOGENIC LOAD

Komleva N. V.[1], Komleva M. O.[2], Pushkareva L. A.[2]

[1]SB H I Regional children's clinical hospital; [2]SEI HPE Orenburg State Medical University, Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia

For the estimate of the structure of gynecological morbidity an analysis of the annual reports of gynaecological morbidity for 3 years, the immune and hormonal status of 45 girls with irregular menstrual cycle and data on anthropogenic load was held. The first place was taken by the irregular menstrual cycle. Changes in the immune system: decreased lymphocytes ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ cells), phagocytic index and phagocytic index and increased levels of lymphocytes CD19, IgM and CIC. Hormonal changes: increased levels of LH, FSH ratio LH/FSH, dehydroepiandrosterone sulphate, 17-Oh-progesterone and decreased estradiol.

Keywords: girls, menstrual disorders, immune status, anthropogenic stress.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С АСЕПТИЧЕСКИМ НЕКРОЗОМ ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Чекушкин А. В., Сафронов Ал. А., Сафронов А. А., Анисимова Т. М., Матияш А. М.

ГБОУ ВПО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, Оренбург, Россия

Иммунный статус исследован у 15 пациентов (33-57 лет) с асептическим некрозом головки бедренной кости до операции тотального эндопротезирования суставов. Установлено значительное повышение в крови по сравнению с нормой уровня В-лимфоцитов, IgA, IgM, IgG, циркулирующих иммунных комплексов, показателей фагоцитарной и метаболической активности нейтрофилов, что свидетельствует о развитии хронического стерильного воспаления, отягощающего течение данного заболевания.

Ключевые слова: асептический остеонекроз, головка бедренной кости, иммунный статус.

Введение. Асептический некроз головки бедренной кости (АНГБК) представляет значительную медико-социальную проблему, поражая молодых (от 20 до 50 лет) работоспособных людей [1]. До настоящего времени отсутствуют эффективные методы консервативной терапии и более чем у 50 % пациентов уже в первые годы заболевания выполняется эндопротезирование тазобедренного сустава [2, 3]. АНГБК относится к заболеваниям многофакторной природы [2], однако до настоящего времени механизмы развития данной патологии не ясны. Не вызывает сомнение участие реакций врожденного и адаптивного иммунитета в развитии асептического (стерильного) воспаления [3, 4], как одного из патогенетических механизмов развития асептического некроза головки бедренной кости. Характер иммунологических нарушений при АНГБК с учетом патогенетических особенностей заболевания изучен недостаточно.

Цель работы: оценка иммунологических показателей периферической крови у пациентов с асептическим некрозом головки тазобедренной кости до проведения тотального эндопротезирования.

Материалы и методы. Обследовано 15 пациентов в возрасте 33-57 лет (12 мужчин, 3 женщины) с двусторонним поражением тазобедренных суставов, поступивших в стационар для проведения тотального эндопротезирования тазобедренного сустава (1-я группа). Продолжительность заболевания составляла от 2 до 10 лет. У всех пациентов наблюдался вторичный коксартроз IV стадии, диагноз подтверждался рентгенологическим обследованием и данными МРТ. Из обследования были исключены пациенты с метаболическим синдромом, травмами, системными аутоиммунными заболеваниями, а также находящимися на гормонотерапии. Группу контроля (2-я группа) составили 19 здоровых добровольцев в возрасте 33-57 лет.

Для оценки иммунного статуса у пациентов контрольной группы и 1-й группы до операции в периферической венозной крови определяли: фенотип лимфоцитов с применением моноклональных антител к $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD20^+$, фагоцитарный показатель (ФП), фагоцитарный индекс (ФИ), спонтанный и стимулированный зимозаном НСТ-тест, а также в сыворотке крови исследовали уровень IgA, IgM, IgG, общего IgE и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), используя стандартные методы иммунологического обследования. Результаты выражали в виде медианы (Me), нижних (Q_{25}) и верхних (Q_{75}) квартилей. Значимость различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Установлено, что у пациентов с АНГБК выявлялось достоверное снижение ($p<0,05$) по сравнению со здоровыми обследуемыми относительного содержания количества зрелых Т-клеток (соответственно 49,0 [47,0; 54,0]% против 62,0 [59,5; 66,0]%) за счет $CD4^+$ лимфоцитов (35,0 [33,0; 36,0]% против 43,0 [38,5; 46,0]% в контроле) и $CD8^+$ (соответственно 21,0 [18,0; 25,0]% против 24,0 [22,0; 27,0]%) клеток. Напротив, в периферической крови увеличивалось абсолютное содержание В-лимфоцитов, уровень которых возрастал по отношению к норме почти в два раза (0,53 [0,33; 0,63] 10^9/л против 0,298[0,25; 0,37]10^9/л в контроле, $p < 0,05$). Выявленные изменения количественных параметров В-лимфоцитов у пациентов 1-й группы сопровождались значительным ростом уровня ЦИК, который составлял 255,0 [127,0; 310,0] ЕД.ОП., что в 4 раза превышало показатель у здоровых людей, $p < 0,001$). Наряду с этим у пациентов 1-й группы по сравнению со 2-й группой в сыворотке крови значительно возрастало содержание иммуноглобулинов основных классов: соответственно уровень IgA составлял 4,0 [3,4; 8,8] г/л и 1,9 [1,76;2,04] г/л ($p < 0,001$); IgM – 2,14 [1,07; 2,34] г/л и 1,37 [1,25;1,64] г/л ($p < 0,05$); IgG – 21,12 [16,6; 33,4] г/л и 12,6 [11,0;14,5] г/л ($p < 0,05$). Изменений в уровне общего Ig E у пациентов с АНГБК не выявлено. Анализ функциональной активности фагоцитов периферической крови у пациентов 1-й группы показал 3-х кратное возрастание по сравнению со здоровыми показателя стимулированного НСТ-теста до уровня 35,7 [33,0; 41,7]% ($p < 0,05$) и фагоцитарного индекса – до 4,2 [3,4; 4,7] усл.ед.

Обсуждение. Анализ данных иммунологического обследования больных с АНГБК показал, что у них выявлялись признаки усиления функциональной активности гуморальных иммунных механизмов, о чем свидетельствовало увеличение количества клеток, экспрессирующих молекулу CD20, участвующую в регуляции активации В-лимфоцитов, а также значительное возрастание содержа-

ния сывороточных иммуноглобулинов всех основных классов и уровня ЦИК. Выявленные изменения гуморальных показателей наряду с активацией метаболической и фагоцитарной активности нейтрофилов с учетом длительности заболевания пациентов 1-й группы (2-10 лет) можно рассматривать как ответную реакцию организма на повреждающее воздействие (когда отсутствует внешний инфекционный агент) и проявляющуюся развитием хронического «стерильного» воспаления, способствующего очищению организма от отмирающих тканей [3]. Ключевую роль при стерильном воспалении играют danger-associated molecular patterns (DAMPs), выступающие в качестве адьювантов иммунного/ воспалительного ответа с активацией секреции цитокинов, аутофагии, апоптоза или некроза [5]. В случае значительного и/или продолжительного патологического воздействия с образованием внутриклеточных DAMPs аутофагия не справляется с их утилизацией, что приводит к некротической гибели клеток и выбросу наружу множества внутриклеточных компонентов, выступающих в качестве DAMPs и аларминов. Патогенез стерильного хронического воспаления предполагает избыточное накопление внеклеточных DAMPs в результате их неэффективной утилизации путем аутофагии и стресс-редуцирующих клеточных систем [3,5]. Многократное увеличение у пациентов 1-й группы уровня ЦИК, иммуноглобулинов может являться свидетельством активного участия сывороточных факторов (иммуноглобулины, антитела, опсонины и др.) в формировании иммунных комплексов со множеством внеклеточных компонентов, выступающих в качестве некротоксинов. Нельзя исключить и участие аутоантител и аутоантигенов (производных DAMPs) в образовании иммунных комплексов при АНГБК. Проведение дальнейших исследований позволит разработать адекватные подходы к профилактике и терапии такой тяжелой патологии, как асептический некроз головки бедренной кости, приводящей к инвалидизации людей молодого и работоспособного возраста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petrigliano F. A., Lieberman J. R. Osteonecrosis of the hip: novel approaches to evaluation and treatment / F. A. Petrigliano, J. R. Lieberman // Clin. Orthop. Relat. Res.– 2007.– V. 465.– P. 53-62.
2. Which Factors Influence Preservation of the Osteonecrotic Femoral Head? / J. R. Lieberman, S. M. Engstrom, R. M. Meneghini et al. // Clin. Orthop. Relat. Res.– 2012.– V. 470, № 2.– P. 525-534.
3. Kono H., Onda A., Yanagida T. Molecular determinants of sterile inflammation / H. Kono, A. Onda, T. Yanagida // Curr. Opin. Immunol.– 2014.– V. 26.– P. 147-156.
4. Russell S. E., Walsh P. T. Sterile inflammation – do innate lymphoid cell subsets play a role? / S. E. Russell, P. T. Walsh // Front. Immunol.– 2012.– V.3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00246.
5. Chen G. Y., Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage / G. Y. Chen, G. Nunez // Nat. Rev. Immunol.– 2010.– V. 10, № 12.– P. 826-837.

FEATURES OF IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH ASEPTIC NECROSIS OF THE FEMORAL HEAD

Chekushkin A. V., Safronov A. A., Safronov Al.A., Anisimova T. M., Matiyash A. M.

SEI HPE Orenburg State Medical University, Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia

Immune status has investigated in 15 patients with aseptic necrosis of the femoral head of 33-37 years old before total joint replacement. A significant increase of B-lymphocytes, IgA, IgM, IgG, circulating immune complexes levels, phagocytic and metabolic activities of neutrophiles has determined. This fact testifies a rising of chronic sterile inflammation, which complicates the disease.

Keywords: aseptic osteonecrosis, femoral head, immune status.

КОМБИНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ЛИМФОИДНЫЕ ОРГАНЫ КРЫС ВИСТАР

Михайлова И. В.

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России», Оренбург, Россия

Комбинированное воздействие бензола и хрома на тимус и селезенку крыс Вистар приводило к: снижению массы лимфоидных органов и количества клеток в этих органах; уменьшению относительного и абсолютного числа $CD3^+$-, $CD4^+$-, $CD8^+$- лимфоцитов в селезенке и увеличению продукции ИЛ-4, снижению концентрации ИЛ-6. Необходимо также отметить, что установленные сдвиги изученных параметров, выявлялись чаще всего на 90-е и 135-е сутки экспериментального исследования.

Ключевые слова: комбинированное воздействие, лимфоидные органы, эксперимент.

Среди множества экологически неблагоприятных факторов привлекает внимание комбинированное загрязнение окружающей среды органическими и неорганическими соединениями, которые находясь в окружающей среде даже в концентрации, не вызывающей выраженных токсических эффектов, оказывают хроническое действие, приводящее к дезадаптации организма. Одними из таких веществ являются соединения хрома и бензола, которые представляют собой достаточно распространенные химические поллютанты, основными источниками загрязнения которых являются автотранспорт, предприятия газодобывающей, газо- и нефтеперерабатывающей промышленности, машиностроения. В связи с этим многоплановое исследование их влияния на организм, в частности на иммунологические, биохимические параметры представляется актуальным направлением экологической иммунологии.

Целью работы явилось исследование комбинированного влияния органических и неорганических веществ (на примере бензола и хрома) на лимфоидные органы крыс Вистар.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены на 308 здоровых половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 250-300 г. Доза токсиканта соответствовала одной ПДК [1]. Все животные, включенные в исследование, содержались на стандартном пищевом рационе и были разделены на 2 группы. Животные 1-й группы (контроль), содержались в том же виварии и получали воду. Животные 2-й группы вместе с питьевой водой, перорально получали смесь бихромата калия (из расчёта 20 мг/кг) («Полихим», Россия) и бензола (из расчёта 0,6 мл/кг) («Полихим», Россия). Через 45, 90 и 135 суток животные выводились из эксперимента летальной дозой эфирного наркоза. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1985). В крови, тимусе и селезенке определяли число клеток в соответствии с лабораторными методами исследования экспериментальных животных [2]. Иммунофенотипирование спленоцитов проводили с использованием моноклональных антител (“eBioscience”, США) к рецепторам CD3, CD4, CD8. Процентное содержание $CD3^+$-, $CD4^+$-, $CD8^+$- лимфоцитов селезенки определяли на проточном двухлазерном цитофлюориметре “FACS Canto II” (“Becton Dickinson”, США). Продукцию цитокинов в супернатантах нестимулированных и стимулированных конкавалином А (Кон А) культур спленоцитов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФНγ) оценивали с использованием метода ИФА (тест–системы «Bender MedSystems», Австрия). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия).

Результаты проведенных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета программ для ПК

"Microsoft Excel 7.0," "STATISTICA 10.0", включая методы параметрического (критерий Стьюдента-Фишера), непараметрического (критерий Манна-Уитни) анализов.

Исследование влияния комбинации бензола и бихромата калия на количество ядросодержащих клеток (ЯСК) в крови и лимфоидных органах крыс выявило снижение числа лейкоцитов, массы тимуса, селезенки и количества ЯСК в тимусе и селезенке. Так, максимальное уменьшение числа лейкоцитов в периферической крови установлено на 90-е сутки (6,87±0,48, контроль 10,59±0,34×10^9), массы тимуса – на 135-е сутки (178±10,01, контроль 247±8 мг), количества ЯСК тимуса (319±32, контроль 434±23×10^6/орган), массы селезенки (931±30, контроль 1042±20 мг) и числа спленокариоцитов (500±40, контроль 1031±30×10^6/орган) – на 90-е сутки экспозиции. Одновременно с этим обнаружено снижение величины тимического индекса (0,53±0,04, контроль 0,82±0,05 мг/г) и содержания ЯСК тимуса/массу тела с минимумом на 135-е сутки (1,00±0,09, контроль 1,45±0,10×10^6/г), уровня ЯСК селезенки/массу тела (1,68±0,15, контроль 3,40±0,18×10^6/г) и ЯСК селезенки/массу селезенки (0,54±0,03, контроль 1,01±0,03×10^6/мг с минимумом на 90-е сутки воздействия.

Изучение влияния комбинации бензола и бихромата калия на субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки крыс выявило снижение абсолютного числа $CD3^+$- лимфоцитов (256±17,06, контроль 452±36,53×10^6, 90-е сутки); относительного количества $CD4^+$- лимфоцитов (31,65±1,32, 33,78±1,87, контроль 37,50±0,8 %, 90-е и 135-е сутки) и абсолютного их уровня (170±11,55, контроль 339±27,42×10^6, 90-е сутки); а также абсолютного содержания $CD8^+$- лимфоцитов (75±7,49, контроль 139±18,01×10^6) на 90-е сутки воздействия. Вместе с тем, в опытной группе крыс обнаружено изменении выработки цитокинов спленоцитами, которое выражалось в уменьшении уровня ИЛ-6 с минимумом на 90-е сутки (73,06±19,65, контроль 129,24± 15,47 пг/мл) и, напротив, увеличение уровня ИЛ-4 (58,29±18,68, контроль 4,58±0,86 пг/мл) и ИФНγ (91,79±14,36, контроль 46,83±2,04 пг/мл) с максимумом на 135-е сутки экспозиции.

Таким образом, изучив динамику изменений количества ЯСК клеток в крови и лимфоидных органах крыс Вистар, можно говорить о выраженном влиянии комбинации бихромата калия и бензола, что проявилось в лейкопении, снижении массы лимфоидных органов (тимус и селезенка) и количества клеток в этих органах. Необходимо также отметить, что воздействие изученных веществ сопровождалось изменением субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в селезенке крыс опытной группы на фоне изменения индуцированной конканавалином А выработки цитокинов спленоцитами крыс (увеличение продукции ИЛ-4, снижение концентрации ИЛ-6). Установленные закономерности могут быть использованы как для дальнейшего изучения механизмов комбинированного воздействия неорганических и органических соединений на иммунную систему организма и могут являться экспериментальным обоснованием для разработки подходов к предупреждению отрицательных последствий воздействия данных ксенобиотиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГН 2.1.5.2280-07 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования».– М.: Роспотребнадзор. 2008.– 48 с.
2. Волчегорский И. А., Долгушин И. И., Колесников, О. Л. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / И. А. Волчегорский, И. И. Долгушин, О. Л. Колесников – Челябинск, 2000.– 167 с.

THE COMBINED EFFECTS OF ORGANIC AND INORGANIC SUBSTANCES ON LYMPHOID ORGANS WISTAR RATS

Mihaylova I. V.

SEI HPE "Orenburg State Medical University, Ministry of Health of Russia", Orenburg, Russia

The combined effects of benzene and chromium on the thymus and spleen of Wistar rats resulted in: reduction of the weight of lymphoid organs and the number of cells in these organs; decrease of the relative and absolute number of $CD3^+$-, $CD4^+$-, $CD8^+$- lymphocytes in the spleen and increased production of IL-4, decreased the concentration of IL-6. It should also be noted that the shifts of the studied parameters were detected most often on the 90 and 135-day experimental study.

Keywords: the combined effects, the lymphoid organs, experiment.

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ И РОЛЬ ИММУННЫХ И НЕИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ, ОСЛОЖНЕННОЙ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНУСИТОМ

Костина Е. М.

ГБОУ ДПО ПИУВ Минздрава России, Пенза, Россия

Обследовано 53 пациента с диагнозом бронхиальная астма, осложненная полипозным риносинуситом. В качестве группы сравнения обследовано 20 пациентов с диагнозом бронхиальная астма без полипоза носа. Контрольную группу составили 20 человек практически здоровых лиц. Выявлены различные нарушения в Т-клеточном, гуморальном звеньях иммунитета, нейтрофильного фагоцитоза и цитокиновой иммунорегуляции. Патогенез проявлялся участием Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4, -10) типов иммунного ответа, повышением IL-8, -18 и лейкотриенов С4D4E4, В4. Астма имела тяжелое, неконтролируемое течение с применением высоких доз стероидов.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полипоз носа, цитокины, лейкотриены, иммунные параметры.

Бронхиальная астма (БА) является хроническим воспалительным заболеванием с гетерогенн ыми клиническими проявлениями [1]. Коморбидные заболевания, в том числе полипозный риносинусит (ПРС) вносят свой вклад в формирование фенотипа, тяжесть течения и эффективность проводимой терапии [1, 2]. Изучение патогенетических механизмов позволит оптимизировать проводимую терапию и повысить контроль БА.

Цель работы: изучить особенности клинического течения, иммунные параметры, цитокиновую иммунорегуляцию и содержание лейкотриенов С4D 4E4, В4 у больных бронхиальной астмой, осложненной полипозным риносинуситом.

Материалы и методы. Обследовано 53 пациента с диагнозом БА, осложненной ПРС. В качестве группы сравнения обследовано 20 пациентов с диагнозом БА без ПН. Контрольную группу составили 20 человек практически здоровых лиц сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Средняя длительность течения заболевания составила 9,51±0,56 лет. Мужчин – 21 (28,7 %) человека, женщин – 52 (71,3 %). Возраст от 18 до 65 лет. Атопия к неинфекционным аллергенам являлась критерием исключения. Иммунофенотипирование субпопуляций Т-лимфоцитов проводили методом непрямой мембранной иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител производства ООО «Сорбент» (г. Москва). На поверхности лимфоцитов выявлялись дифференцировочные антигены: $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$. Кислородзависимый механизм килинга нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте (%). Уровень сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G определяли в сыворотке крови с помощью метода радиальной иммунодиффузии по Манчини с использованием моноспецифических антисывороток к соответствующим иммуноглобулинам («Микроген», г. Нижний Новгород). Содержание общего IgE, специфических IgE антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на анализаторе Stat Fax 3200 наборами «Алкор-Био» Ставропольского НПО «Аллерген». Методом ИФА изучали содержание в сыворотке крови следующих цитокинов: ИЛ-4, ИЛ-10, IFN-γ, ИЛ-18, ИЛ-8, ИЛ-17 (наборами фирмы ООО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург, «CYTIMMUNE», США и ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Лейкотриены суммарные С4D4E4 и В4 в плазме крови определяли методом ИФА реактивами фирмы «Neogen corporation» (США) после предвари-

тельной экстракции на колонках C18Sep. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 на персональном компьютере. Применяли методы параметрической и непараметрической статистики (для сравнения несвязанных выборок использовался Mann-Whitney тест). Результаты считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Сочетание БА, ПН и непереносимости салицилатов отмечено у 15 (28,3 %) больных. 2/3 пациентов имели в анамнезе неоднократную полипэктомию (Me – 10,0), что свидетельствовало о прогрессировании хронического воспалительного процесса и неэффективности проводимой терапии. У 1/3 пациентов выявлена крапивница и отек Квинке. БА имела персистирующее, неконтролируемое течение с частыми обострениями. У всех пациентов показатели ОФВ1 были достоверно ниже, а значения суточного разброса ПСВ достоверно больше в сравнении с значениями у больных группы сравнения ($p < 0,05$). Более половины пациентов БА с ПРС получали высокие дозы топических стероидов ($p < 0,05$). Анализируя иммунологические показатели при сравнении данных у пациентов БА с ПРС и без и здоровыми лицами, обнаружена следующая тенденция. Выявлено статистически значимое снижение числа $CD8^+$-лимфоцитов в абсолютных и относительных значениях, индуцированного НСТ-теста, иммуноглобулинов класса IgA и IgM ($p < 0,05$). Вместе с тем, наблюдалось статистически значимое повышение числа $CD4^+$-лимфоцитов как в абсолютных значениях, так и в относительных и иммунорегуляторного индекса $CD4^+/CD8^+$, уровня иммуноглобулина классам IgG, уровня общего IgE ($p < 0,05$). У 18 (24,6 %) больных с БА в сочетании с ПРС обнаружены специфические IgE антитела к *Staphylococcus aureus* высокого, среднего и низкого уровней. 90 % пациентов имели повышение количества эозинофилов (Me – 22,00) в цитологическом мазке со слизистой носовой полости ($p < 0,05$). Возможно, данный факт объясняется поликлональной активацией суперантигенами бактерий, в частности Staphylococcus aureus [3]. Нарушения в системе цитокиновой иммунорегуляции были более выраженными. Наряду с цитокинами, отражающими Th1 иммунный ответ (IFN-γ) были повышены и цитокины Th2 иммунного ответа (ИЛ-4, ИЛ-10). Значения ИЛ-4 составили 5,62±0,86 пг/мл (Me – 5,50), ИЛ-10 – 15,76± 7,93 пг/мл (Me – 5,45), IFN-γ – 219,81±107,29 пг/мл (Me – 93,85). Отмечено и повышение значений ИЛ-8 – 40,12±8,07пг/мл (Me – 30,30), ИЛ-18 – 112,25±11,81пг/мл (Me – 102,40). Выявленные изменения статистически значимы в сравнении с контрольной и группой сравнения ($p < 0,05$). Высокие значения ИЛ-8, 18 могут служить критерием для назначения антибактериальной терапии и иммунокорректоров больным с данной патологией. Уровни изучаемых нами ЛТ, существенно различались между больными БА с ПРС и без, и значениями у здоровых лиц ($p < 0,05$). Уровень смеси C4D4E4 (Me – 1,70 нг/мл) у больных БА с ПРС был повышен в 1,4 раза по сравнению с данными у больных БА без ПН и в 2,8 раз по сравнению со здоровыми лицами. Аналогичная тенденция наблюдалась в отношении ЛТ B4 (Me –15,85 нг/мл): повышение в 1,8 раз и в 11 раз, соответственно. Полученные результаты свидетельствовали о включении лейкотриенового механизма в патогенез БА, что приводило к утяжелению течения, формированию выраженного бронхоспазма и значимому снижению легочной функции. Повышение уровня ЛТ B4 отражает напряжение функционального состояния нейтрофилов, что свидетельствует о значимой инфекционной, антигенной нагрузке у больных БА.

Таким образом, БА в сочетании с ПН является особым фенотипом патологии. Сочетание атопических механизмов, смешанного типа иммунного ответа, инфекционного процесса, иммунодефицитного состояния и лейкотриенового механизма определяет тяжесть клинических проявлений БА и торпидность к проводимой терапии. Для достижения наилучшей эффективности терапии, наиболее целесообразно включение в программу лечения пациентов иммунокорректоров и антагонистов лейкотриеновых рецепторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пыцкий В. И. Механизмы возникновения и развития бронхиальной астмы и основные принципы их лечения / В. И. Пыцкий – М.: Фармус Принт Медиа, 2008.– 56 с.
2. Untangling asthma phenotypes and endotypes / I. Agache, C. Akdis, M. Jutel et al. // Clin Transl Allergy.– 2012.– № 67 – P. 835-846.
3. Role of staphylococcal superantigens in airway disease / C. Bachert, P. Gevaert, N. Zhang et al. // Chem Immunol Allergy.– 2007.– № 93.– P. 214-250.

FEATURES OF CLINICAL COURSE AND ROLE OF IMMUNE AND NON-IMMUNE MECHANISMS IN PATHOGENESIS OF BRONCHIAL ASTHMA COMPLICATED BY POLYPOUS RHINOSINUSITIS

Kostina E. M.

Government Budget Education Institution of Additional Professional Education "Penza medical refresher institute" of the Ministry of Public Health, Penza, Russia

17 patients with diagnosis of bronchial asthma complicated by polypous rhinosinusitis have been examined. 20 patients with diagnosis of bronchial asthma without nasal polyposis have been examined as a comparison group. Control group consisted of 20 practically healthy subjects. Different disturbances of T-cell and humoral immunity, neutrophil phagocytosis, cytokine immunoregulation have been showed. Pathogenesis is manifested with involving of Th1 (IFN-g) and Th2 (IL-4,10) type of immune response, increase of IL-8, IL-18, LTC 4D 4E 4, LTB 4 levels. Asthma had severe, uncontrollable course, been treated with high doses of steroids.

Keywords: bronchial asthma, nasal polyposis, cytokines, leukotrienes, immune parameters.

РОЛЬ ЭНДОГЕННОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА КАТЕЛИЦИДИНА LL-37 В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ПРИ ПСОРИАЗЕ

Бахлыкова Е. А., Филимонкова Н. Н., Матусевич С. Л., Спирина Ю. С.

ГБОУ ВПО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, Тюмень; ГБУЗ СО «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии», Екатеринбург, Россия

В статье представлены современные сведения о патогенезе псориаза, показана роль иммунологических изменений, роль триггерных факторов, участие антимикробного пептида кателицидина LL-37 в развитии воспалительного процесса при псориазе.

Ключевые слова: псориаз, антимикробный пептид, кателицидин LL-37.

Хронический дерматоз псориаз – медико-социальная проблема, значимая, как для дерматологов, врачей других специальностей, так и для пациентов, страдающих этой патологией кожи. Вопросы, связанные с причиной возникновения, особенностями течения, индивидуальными характеристиками клинической картины, трудностями в достижении ремиссии не перестают волновать широкий круг лиц, связанных с этой проблемой. По данным статистического отдела Тюменского ОКВД в 2015 году с диагнозом псориаз обратились 2990 пациентов, из них впервые 577, что составило 19,3 % от общего количества. Таким образом, заболеваемость псориазом, по данным на 2015 год, в Тюменской области составила 214 человек на 100 000 населения. Из общего числа впервые обратившихся пациентов с псориазом, дети от 0 до 17 лет составили 57 (9,9 %), подростки от 15 до 17 лет 17(2,9 %). Высокий уровень заболеваемости псориазом, в том числе среди детей, обуславливает поиск возможных причин и факторов развития псориаза.

Ряд исследователей рассматривает избыточный синтез провоспалительных цитокинов ведущей причиной псориатического воспаления [1, 2], однако неясна первопричина их повышенного синтеза, фактор, иниции-

рующий псориатическое воспаление. Существенную роль в развитии воспаления в настоящее время отводится антимикробным пептидам (АМП) [3]. Клетки врожденной иммунной системы включают кератиноциты, тучные клетки, нейтрофилы и являются главным источником АМП, которые имеют бактерицидное действие против патогенных организмов. Известны две основные группы АМП: b-дефензины и кателицидины, а также существуют доказательства, что они связаны с псориазом [3, 4].

Эндогенные катионные АМП – дефензины и кателицидины входят в систему врожденного иммунитета [1]. Кателицидин hCAP-18 (human cationic antimicrobial peptide) синтезируется в нейтрофилах, кератиноцитах, клетках эпителия дыхательных путей в виде неактивного предшественника с молекулярной массой (м.м.) 18 kDa [2]. При экзоцитозе лейкоцитов сериновая протеаза калликреин расщепляет кателицидин hCAP-18 с образованием активного пептида LL-37, состоящего из 37 аминокислот и двух остатков лейцина и являющегося в настоящее время единственным идентифицированным кателицидином, выявленным у человека. Пептид LL-37 подавляет как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, выполняя тем самым барьерную функцию против местной инфекции кожи [1]. Более высокая чувствительность бактерий к бактерицидному действию пептида LL-37 связана с большим отрицательным зарядом клеточной стенки бактерий по сравнению с мембраной эукариотических клеток [2].

В норме синтез кателицидина в кератиноцитах очень незначителен и находится в непроцессированной форме с м.м. 18 kDa. При псориазе уровень кателицидина в коже резко повышен по сравнению с кожей больных атопическим дерматитом или здоровых людей, и переходит в процессированную форму в виде пептида LL-37 с м.м. 4,5 kDa. Концентрация пептида LL-37 во всех слоях эпидермиса больных псориазом резко повышена. В высоких концентрациях этот пептид присутствует также и в дерме, где находится в тесном контакте с плазмацитоидными дендритными клетками (ДК) [5]. Уровень пептида LL-37 повышается при повреждениях кожи и при различных стрессовых ситуациях, что дало основание отнести его к сигналам тревоги или аларминам. Этот пептид является хемоаттрактантом для нейтрофилов, моноцитов, ДК и Т-лимфоцитов; способствует созреванию ДК и развитию Т-клеточного иммунного ответа. Он стимулирует ангиогенез в коже, индуцирует синтез и высвобождение ряда цитокинов, хемокинов и гистамина, способствует пролиферации, миграции кератиноцитов и реэпителизации раны. Его количество резко возрастает в коже при заживлении раны, что дало основание некоторым авторам называть пептид LL-37 ростовым фактором кератиноцитов. Пептид LL-37 обладает антибактериальными, противогрибковыми и противовирусными свойствами [1], его синтез усиливает активная форма витамина Д3, УФО.

Продукция АМП запускается в результате взаимодействия структур микробов с сигнальными рецепторами клеток (TLR и др.), что сопровождается интенсивным образованием провоспалительных цитокинов. Цитокины также стимулируют образование кератиноцитами АМП кателицидина и дефенсинов. Активацией воспаления при псориазе может быть комплекс из собственных нуклеиновых кислот (ауто-НК) и АМП LL-37. Пептид LL-37 превращает инертную ДНК погибающих клеток в мощный триггер производства α – интерферона, связывая ДНК и формируя комплексы ДНК/ LL-37. Данные комплексы доставляются в ранние эндосомы плазмоцитоидных ДК, чтобы запустить TLR 7 и TLR 9 [1, 5]. В модельных экспериментах *in vitro* показано, что искусственные комплексы LL-37/ДНК и LL-37/РНК являются мощными индукторами синтеза IFN-α в плазмоцитоидных ДК [5]. Комплекс ауто – РНК/LL-37 вызывает в миелоидных ДК синтез IL-6 и TNF-α. Пептид LL-37 выполняет роль переносчика нуклеиновых кислот, а активаторами синтеза провоспалительных цитокинов являются сами РНК и ДНК, активирующие TLR7, TLR8 и TLR9-сигнальные пути.

Нуклеиновые кислоты могут появляться во внеклеточном пространстве при ушибах, сдавлении, различных незначительных повреждениях кожи, но должны быть разрушены внеклеточными нуклеазами. При псориазе известен симптом Кебнера, когда развитие или обострение нередко начинается с каких-то даже незначительных повреждений кожи или после ушиба. Нуклеиновые кислоты могут появляться во внеклеточном пространстве также в результате выхода из стареющих или

апоптотических клеток, особенно в тех случаях, когда фагоцитоз апоптотических клеток понижен. При появлении во внеклеточном пространстве свободных нуклеиновых кислот пептид LL-37 образует с ними комплекс, основанный на электростатическом взаимодействии. Этот комплекс стабилен и устойчив к действию нуклеаз[2].

Повреждения типа травмы или инфекции активируют резидентные ДК в генетически предрасположенном организме. Стресс кератиноцитов приводит к выходу их ДНК, формирующей комплексы с LL-37. Эти комплексы активируют плазмоцитоидные ДК, продуцирующие IFN-α, также синтезируются провоспалительные цитокины: IL-1β, IL-12, IL-23, IL-6 и TNF-α [1]. Активированные ДК мигрируют в лимфатические узлы для презентации антигена наивным Т-лимфоцитам и их деференциации в Th1 и/или Th17. Клетки Th17 секретируют IL-17A, IL-17F и IL-22, стимулирующие пролиферацию кератиноцитов, выход – дефенсинов, и рекрутирование нейтрофилов хемокинами [1]. Цитокины содействуют эпидермальной гиперплазии в псориатической бляшке, что клинически выражается в обострении патологического процесса.

Новые данные о патогенезе псориаза и роли различных иммунологических факторов в развитии псориатического воспаления, а также влияние определенных триггеров на возникновение и течение заболевания позволяют расширить представление о природе и возможностях поиска механизмов контроля над псориатическим процессом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Караулов, А.В., Быков, С.А., Быков, А.С. Иммунология, микробиология и иммунопатология кожи / А.В. Караулов, С.А. Быков, А.С. Быков – Москва: БИНОМ, 2012.– 328 с.
2. Пинегин, Б.В. Роль антимикробного пептида LL 37 в патогенезе псориаза / Б.В. Пинегин // Рос. журнал кожных и венерических болезней.– 2012.– № 5.– С. 32-37.
3. Morizane, S., Gallo, R.L. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. / Morizane S., Gallo R.L. // J Dermatol.– 2012.– T.39.– P. 225-230.
4. Harder, J., Schröder, J.M. Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. / Harder J., Schröder J.M. // J Leukoc Biol.– 2005.– T.77.– P. 476-486.
5. Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V. Plasmacytoid dendritic cells sense self_DNA coupled with antimicrobial peptide. / R. Lande, J. Gregorio, V. Facchinetti // Nature.– 2007.– T. 449.– P. 564-569.

THE ROLE OF ENDOGENOUS ANTIMICROBIAL PEPTIDE CATHELICIDIN LL-37 IN THE DEVELOPMENT OF THE INFLAMMATORY PROCESS IN PSORIASIS

Bakhlykova E.A., Filimonkova N.N., Matusevich S.L., Spirina Y.S.

Tyumen state medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Tyumen; Ural scientific research Institute of dermatology and immunology, Ekaterinburg, Russia

The article presents modern information on pathogenesis of psoriasis; the role of immunological changes, the role of trigger factors, the involvement of the antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 in the development of the inflammatory process in psoriasis.

Keywords: psoriasis, antimicrobial peptide, cathelicidin LL-37.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА КАТЕЛИЦИДИНА LL-37 У БОЛЬНЫХ БЛЯШЕЧНЫМ И ПУСТУЛЕЗНЫМ ПСОРИАЗОМ

Бахлыкова Е. А., Филимонкова Н. Н., Матусевич С. Л.

ГБОУ ВПО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, Тюмень; ГБУЗ СО «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии», Екатеринбург, Россия

В статье представлены результаты собственных исследований антимикробного пептида кателицидина LL-37 у больных бляшечным и ладонно-подошвенным пустулезным псориазом в сыворотке крови. Обнаружено более высокое содержание LL-37 у больных с псориазом, в сравнении с указанной нормой.

Ключевые слова: бляшечный псориаз, пустулезный псориаз, антимикробный пептид, кателицидин LL-37.

Актуальность работы. Исследователи продолжают поиск новых современных данных о псориатической болезни, изучая аспекты патогенеза, роль иммунологических факторов в развитии воспаления, а также влияние определенных триггеров на возникновение и течение заболевания. Входящие в состав врожденной иммунной системы антимикробные пептиды (АМП), а именно кателицидин LL-37, в виде комплекса с собственными нуклеиновыми кислотами способны вызвать активацию воспаления при псориазе [1]. Комплексы LL-37/ДНК и LL-37/РНК активируют плазмоцитоидные дендритные клетки (ДК), продуцирующие IFN-α, а также синтез провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-12, IL-23, IL-6, TNF-α [2]. Пептид LL-37 выполняет роль переносчика нуклеиновых кислот, а активаторами синтеза провоспалительных цитокинов являются сами РНК и ДНК, активирующие TLR7, TLR8 и TLR9-сигнальные пути [3,4]. Активированные ДК мигрируют в лимфатические узлы для презентации антигена наивным Т-лимфоцитам и их деференциации в Th1 и/или Th17. Клетки Th17 секретируют IL-17A, IL-17F и IL-22, стимулирующие пролиферацию кератиноцитов [2]. Цитокины содействуют эпидермальной гиперплазии в псориатической бляшке, что клинически выражается в развитии и обострении патологического процесса. Пептид LL-37 обладает антибактериальными, противогрибковыми и противовирусными свойствами [5].

Цель работы. Изучить содержание АМП кателицидина LL-37 у пациентов бляшечным и пустулезным псориазом в сыворотке крови.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 70 пациентов с псориазом, из них с бляшечным псориазом – 50, с ладонно-подошвенным пустулезным псориазом – 20. Возраст пациентов с псориазом составлял от 19 до 78 лет, средний возраст 44,1 ± 1,2. Длительность заболевания составляла от 3 месяцев до 20 лет (в среднем 8,5 ± 1,0 лет). Проводилось исследование на кателицидин LL-37 с помощью набора для иммуноферментного анализа Human LL-37 ELISA TEST KIT (Hycult biotech) в сыворотке крови больных. Набор предназначен только для научных исследований, но не для диагностики или клинического использования в практической медицине. Интервал нормативных значений содержания LL-37 в плазме составляет 1,2-1,8 нг/мл, диапазон измеряемых концентраций составляет от 0,14 до 100 нг/мл.

Результаты и обсуждение. При исследовании группы пациентов с бляшечным псориазом (n=50) средние показатели содержания LL-37 составили 2,56 ± 0,15 нг/мл, в группе пациентов пустулезного ладонно-подошвенного псориаза (n=20) – 2, 87 ± 0,4 нг/мл. Достоверно значимых различий между группами не было

получено. Однако в сравнении с нормативными показателями (1,2-1,8 нг/мл) различия статистически значимы (p<0,05), как в группе бляшечного, так и пустулезного псориаза. Повышение содержания LL-37 подтверждает его роль в развитии воспалительного иммунного ответа при псориазе. Отсутствие достоверных различий между группами бляшечного и пустулезного псориаза, можно объяснить ограниченной формой последнего, т.е. только ладонно-подошвенной локализацией. При псориазе, как известно, нет выраженных гнойных осложнений, несмотря на повреждение барьерных функций, что можно объяснить напряженностью врожденного иммунитета и присутствием АМП. Клетки врожденной иммунной системы включают кератиноциты, тучные клетки и нейтрофилы являются главным источником антимикробных пептидов, обладающих бактерицидным действием против патогенных микроорганизмов [5].

Выводы. АМП LL-37 имеет важное значение в развитии псориатического процесса, что подтверждается проведенными исследованиями. Влияние роли LL-37 в инициации, течении, а также возможность применения в лечении псориаза требуют дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пинегин Б. В. Роль антимикробного пептида LL-37 в патогенезе псориаза / Б. В. Пинегин // Рос. журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – № 5. – С. 32-37.
2. Караулов А.В., Быков С.А., Быков А. С. Иммунология, микробиология и иммунопатология кожи / А. В. Караулов, С. А. Быков, А. С. Быков. – Москва: БИНОМ, 2012. – 328 с.
3. Ganguly D., Chamilos G., Lande R. Self_RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR 7 and TLR 8 / D. Ganguly, G. Chamilos, R. Lande // J. Exp.Med. – 2009. – T. 206. – P. 1983-1994.
4. Lande R., Gregorio J., Facchinetti V. Plasmacytoid dendritic cells sense self_DNA coupled with antimicrobial peptide. / R. Lande, J. Gregorio, V. Facchinetti //Nature. – 2007. – T. 449. – P. 564-569.
5. Morizane S., Gallo R. L. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis / S. Morizane, R. L. Gallo // J Dermatol. – 2012. – T.39. – P. 225-230.

STUDY OF THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE CATHELICIDIN LL-37 IN PATIENTS WITH PLAQUE AND PUSTULAR PSORIASIS

Bakhlykova E. A., Filimonkova N. N., Matusevich S. L.

Tyumen state medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Tyumen; Ural scientific research Institute of dermatology and immunology, Ekaterinburg, Russia

Summary. The article presents the results of own researches of the antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 in patients with plaque and palmoplantar pustular psoriasis in the serum. Found higher content of LL-37 in patients with psoriasis, in comparison with the specified norm.

Keywords: plaque psoriasis, pustular psoriasis, antimicrobial peptide, cathelicidin LL-37.

Т-ЛИМФОЦИТЫ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПРИ ЮВЕНИЛЬНОМ ИДИОПАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ И ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ С У ДЕТЕЙ

Пашнина И. А.[1,2]

[1]*ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница № 1;*
[2]*ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,*
Екатеринбург, Россия

Обследованы дети 6-17 лет с ювенильным идиопатическим артритом (n=14), с хроническим гепатитом С (n=23), а также условно здоровые дети (n=18). Методом проточной цитометрии выявлено, что количество Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) и цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) с фенотипами наивных клеток ($CD45RA^+CD62L^+$), клеток центральной памяти ($CD45RA^-CD62L^+$), клеток эффекторной памяти ($CD45RA^-CD62L^-$), терминально дифференцированных эффекторных клеток ($CD45RA^+CD62L^-$), в исследованных группах не различалось. Количество дубль-позитивных лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD8^+$ с ювенильным идиопатическим артритом и с хроническим гепатитом С было существенно ниже, чем в контрольной группе.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, проточная цитометрия, дети, клетки памяти, ювенильный идиопатический артрит, гепатит С.

В настоящее время для оценки степени дифференцировки Т-лимфоцитов в норме и при различной патологии широко используется определение экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов методом проточной цитометрии. Одним из наиболее распространенных подходов является определение экспрессии CD45RA и CD62L на поверхности Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток [1]. В рамках данного подхода Т-лимфоциты можно разделить на четыре субпопуляции, в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии указанных маркеров. Клетки, экспрессирующие оба рецептора и имеющие фенотип $CD45RA^+CD62L^+$, являются наивными лимфоцитами (N), способными мигрировать в периферические лимфоидные органы при участии рецептора CD62L. Лимфоциты, имеющие фенотип $CD45RA^-CD62L^+$, относятся к клеткам центральной памяти (CM) и также способны проникать в периферические лимфоидные органы. Отсутствие экспрессии обоих перечисленных рецепторов определяет фенотип клеток эффекторной памяти (EM). Фенотип $CD45RA^+CD62L^-$, характерен для терминально-дифференцированных эффекторных клеток (TEMRA). CM, EM и TEMRA – лимфоциты, прошедшие антигензависимую дифференцировку.

Еще одной субпопуляцией Т-лимфоцитов, представляющей собой зрелые антиген-специфические эффекторные клетки памяти, являются дубль-позитивные лимфоциты с фенотипом $CD3^+CD4^+CD8^+$ [2]. Эти клетки способны секретировать цитокины, характерные для Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток 1 типа, и лизировать клетки-мишени [2]. Изменение количества N, CM, EM, TEMRA и $CD3^+CD4^+CD8^+$ происходит при различных аутоиммунных и инфекционных заболеваниях [2, 3, 4].

Целью настоящего исследования явилась оценка количества Т-лимфоцитов на различных стадиях дифференцировки у детей с ювенильным идиопатическим артритом и с хроническим гепатитом С.

Обследованы дети 6-17 лет: условно здоровые (контроль, n=18), с хроническим гепатитом С (умеренная биохимическая активность заболевания, n=23), с ювенильным идиопатическим артритом в стадии активности заболевания (активность 1-3, n=14). Подсчет количества различных субпопуляций Т-лимфоцитов

проведен методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA). Оценивалось количество Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) и цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) с фенотипами: ($CD45RA^+CD62L^+$), клеток центральной памяти ($CD45RA^-CD62L^+$), клеток эффекторной памяти ($CD45RA^-CD62L^-$), терминально дифференцированных эффекторных клеток ($CD45RA^+CD62L^-$), а также количество дубль-позитивных лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD8^+$. Для статистического анализа данных использованы непараметрические критерии: Манна-Уитни – для независимых выборок, Вилкоксона – для сопряженных выборок; результаты представлены в виде: медиана (верхняя квартиль – нижняя квартиль). Корреляционный анализ выполнен методом Спирмена.

Согласно полученным результатам, у здоровых детей наибольшее количество Т-лимфоцитов относилось к субпопуляции наивных клеток, как среди Т-хелперов, так и среди цитотоксических Т-клеток: 59,5 % (54,00-56,00) и 68,0 % (57,00-75,00), соответственно. Различий по относительному количеству наивных лимфоцитов между Т-хелперами и цитотоксическими Т-клетками не выявлено. Доля клеток центральной памяти составила: $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD62L^+$ 25,5 % (22,00-28,00), $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD62L^+$ 7,3 % (4,50-12,00), причем среди Т-хелперов клеток СМ было существенно больше, чем среди цитотоксической субпопуляции ($p<0,001$). Доля клеток эффекторной памяти среди Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов не различалась, и составила 11,7 % (10,00-14,50) и 16,3 % (8,00-18,80), соответственно. Относительное количество TEMRA среди Т-хелперов равнялось 1,0 % (0,40-1,60), и было существенно ниже ($p<0,001$), чем среди цитотоксических Т-лимфоцитов 11,0 % (6,40-19,00). Следует отметить, что доля наивных Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов у детей была примерно в 1,7 раза больше, чем у взрослых здоровых доноров [3], что соответствует представлениям о возрастной динамике численности данной субпопуляции. У обследованных нами здоровых детей не выявлено взаимосвязи между возрастом и относительным количеством N, CM, EM и TEMRA с помощью корреляционного анализа. У больных с ювенильным идиопатическим артритом и хроническим гепатитом С относительное и абсолютное количество N, CM, EM и TEMRA среди Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток не отличалось от контрольных значений.

Доля дубль-позитивных Т-лимфоцитов у здоровых детей была невелика и составила 0,6 % (0,42-0,80), корреляция данного параметра с возрастом не наблюдалась. По сравнению с контрольной группой у больных с ювенильным идиопатическим артритом и хроническим гепатитом С относительное количество $CD3^+CD4^+CD8^+$ было существенно ниже: 0,2 % (0,06-0,35), $p<0,001$ и 0,4 % (0,20-0,60), $p<0,05$, соответственно.

Таким образом, у детей с ювенильным идиопатическим артритом и хроническим гепатитом С не выявлено изменения количества субпопуляций Т-лимфоцитов: N, CM, EM и TEMRA по сравнению со здоровыми детьми соответствующего возраста. Согласно данным Кудрявцева И. В. с соавт. [3] у взрослых больных с ревматоидным артритом относительное количество $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD62L^-$ и $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD62L^-$ (TEMRA) было повышено по сравнению со здоровыми донорами, а количество $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD62L^+$ (наивные клетки) – снижено. Количество дубль-позитивных Т-клеток у обследованных нами у детей с ювенильным идиопатическим артритом и хроническим гепатитом С было ниже, чем у здоровых детей. В литературных источниках имеются свидетельства того, что при аутоиммунных заболеваниях и хронических вирусных инфекциях у взрослых пациентов количество $CD3^+CD4^+CD8^+$ лимфоцитов, напротив, повышается [3, 4]. Выявленные в нашей работе особенности субпопуляционного состава Т-лимфоцитов на разных стадиях дифференцировки свидетельствуют о своеобразии механизмов формирования патологии в детском возрасте.

Автор приносит искреннюю благодарность врачам ГБУЗ СО «ОДКБ № 1» Козловой Е. С., Скоробогатовой О. В., Салохиной Е. Н. и Каракиной М. Л. за подбор пациентов для исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maeker H. T., McCoy G. P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotiping for the Human Immunology Project / H. T. Maeker, G.P. McCoy, R. Nussenblatt // Nat. Rev. Immunol.– 2012.– V. 12.– P. 191-200.

2. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions / M. Nascimbeni, E.C. Shin, L. Chiriboga et al. // Blood.– 2004.– V. 104.– P. 478-486.
3. Исследование основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток при ревматоидном артрите / И.В. Кудрявцев, Г.А. Захарова, Т.В. Гапонова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8 (17), № 2 (1).– С. 89-92.
4. Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence / S.N. Mueller, T. Gebhardt, F.R. Carbone et al. // Rev. Immunol.– 2013.– Vol. 31.– P. 137-161.

T-LYMPHOCYTES ON DIFFERENT STAGES OF DIFFERENTIATION IN CHILDREN WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS AND CHRONICLE HEPATITIS C

Pashnina I.A.[1,2]

[1]Regional Children's Clinical Hospital № 1; [2]Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch of the Russian Acad. Sci., Yekaterinburg, Russia

Children of 6-17 years old with juvenile idiopathic arthritis (n=14), with chronicle hepatitis C (n=23) and conditionally healthy children (n=18) were investigated. It was revealed by flow cytometry that the amount of T-helpers ($CD3^+CD4^+$) and cytotoxic T-cells ($CD3^+CD8^+$) with phenotype of naïve cells ($CD45RA^+CD62L^+$), central memory cells ($CD45RA^-CD62L^+$), effector memory cells ($CD45RA^-CD62L^-$) and terminally differentiated effector cells ($CD45RA^+CD62L^-$) in investigated groups did not differ. The amount of double-positive T-cells ($CD3^+CD4^+CD8^+$) in patients with juvenile idiopathic arthritis and with chronicle hepatitis C was significantly lower than in the control group.

Keywords: T-lymphocytes, flow cytometry, children, memory cells, juvenile idiopathic arthritis, hepatitis C.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО И ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА УСЛОВНО- ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПАЦИЕНТОВ С ЭНДЕМИЧЕСКИМ ЗОБОМ В АНАМНЕЗЕ

Попова Е.В.[1], Тиньков А.А.[1], Никоноров А.А.[1], Попова Н.П.[2]

[1]ГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России; [2]ГУЗ «Областная детская клиническая больница», Оренбург, Россия

Изучен тиреоидный и цитокиновый профили у условно-здоровых лиц (УЗЛ) и пациентов с эндемическим зобом в анамнезе. У пациентов с эндемическим зобом в анамнезе выявлено повышение уровня общего Т3, а также снижение свободного Т3 и ИЧ по сравнению с контролем, что носило компенсаторный характер. Повышение уровня ИФγ и снижение содержания рецепторного антагониста ИЛα свидетельствовали о дисбалансе иммунной системы инфекционно- воспалительного характера.

Ключевые слова: цитокины, тиреоидные гормоны, эндемический зоб в анамнезе.

Оренбургская область относится к регионам с легким йододефицитом. Постоянное недостаточное поступление в организм йода приводит к уменьшению его содержания в ткани щитовидной железы. Неравномерность распределения йода в паренхиме железы, гиперчувствительность к нормальному уровню ТТГ являются пусковыми механизмами струмо-

генного эффекта дефицита йода [1]. Однако, формирование диффузного эндемического зоба (ДЭЗ) является полиэтиологичным, обусловленным взаимодействием как факторов окружающей среды, так и влиянием эндогенных факторов (генетическая предрасположенность, иммунореактивность) [2, 3]. Кроме того, лица, имевшие в анамнезе ДЭЗ, продолжают проживать на йододефицитной территории. Насколько велика вероятность рецидива? Сохраняются ли изменения гормонального и эндокринного статуса после восстановления размера щитовидной железы?

В связи с этим **целью** настоящего исследования явилось изучение тиреоидного и цитокинового профиля у пациентов с ДЭЗ в анамнезе в сравнении с аналогичными параметрами у условно-здоровых лиц, проживающих в условиях легкого йододефицита.

Материалы и методы. В работе обследованы 43 условно-здоровых пациента в возрасте 16-30 лет, имевших в анамнезе ДЭЗ, у которых в период наблюдения отсутствовали изменения в щитовидной железе по данным УЗИ. В качестве контроля обследованы условно-здоровые лица (УЗЛ). Больные с сопутствующей патологией, во время острых воспалительных процессов были исключены из исследования. Цитокиновый статус (уровни ИЛ1α, РАИЛ, ИЛ2, ИЛ4, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10, ИФγ в сыворотке) определялся методом ИФА с использованием тест-систем «Цитокин» (СПб). Гормональный статус (уровни тиреотропного гормона (ТТГ), трийодтиронина (Т3) общего и свободного, тироксина (Т4) общего и свободного), а также антитиреоидных антител (к тиреоглобулину и тиреопероксидазе) определялись методом ИФА с использованием тест-систем «Алкор-Био» (СПб). Рассчитывались индекс компенсации (ИК= Т4 своб/Т3 своб) и индекс чувствительности тиреоцитов к ТТГ (ИЧ= (Т4 своб+Т3 своб)/ТТГ). Статистическую обработку проводили с использованием методов параметрической статистики.

Результаты и обсуждение. При изучении тиреоидного статуса и уровней антитиреоидных антител у условно-здоровых лиц установлено, что уровень ТТГ варьировал от 0,27 до 3,97 мк МЕ/мл, практически не зависел от возраста и составлял в среднем 1,48±0,03 мк МЕ/мл. Уровни антитиреоидных антител также были в пределах норм, рекомендованных фирмой-изготовителем наборов. У здоровых пациентов с уровнем ТТГ от 0,27 до 0,5 мк МЕ/мл выявлялось снижение ИК, а также увеличение ИЧ по сравнению с обследованными, имевшими уровень ТТГ в пределах «идеальной нормы» (от 0,5 до 2,0 мк МЕ/мл). Снижение активности дейодиназы (снижение ИК), наряду с гиперчувствительностью к ТТГ (повышение ИЧ) в условиях йододефицита, продолжающемся воздействии других струмогенных факторов могут привести к формированию ДЭЗ [4].

Цитокиновый профиль в контрольной группе не зависел от функции щитовидной железы. Лишь в группе УЗЛ с уровнем ТТГ ниже «идеальной нормы» выявлялись более низкие по сравнению со всей группой уровни ИЛ10 (5,03±0,5пг/мл против 7,7±0,6 пг/мл) и ИЛ8 (10,32±2,17 пг/мл, против 25,52±3,84 пг/мл). Значимых корреляционных связей между уровнем ТТГ и указанными цитокинами выявлено не было.

По данным анкетирования 60 % пациентов с ДЭЗ в анамнезе относились к группе часто и длительно болеющих (ЧДБ) респираторными заболеваниями.

В результате оценки тиреоидного статуса пациентов с ДЭЗ в анамнезе установлено, что все обследованные находились в эутиреоидном состоянии. Уровень ТТГ варьировал от 0,4 до 3,9 мк МЕ/мл, составив в среднем 1,48± 0,03 мк МЕ/мл, что практически идентично с уровнем у УЗЛ без ДЭЗ в анамнезе. Уровни антитиреоидных антител также не отличались от контроля. Однако, у каждого пятого обследованного выявлен повышенный уровень общего Т3 по сравнению с референсным значением для тест-системы (2,05-2,80 нмоль/л). Фракция общего Т3, в основном, представлена Т3, связанным с тироксинсвязывающим глобулином. Являясь неактивным, общий Т3 является депо гормона. Кроме того, у УЗЛ с ДЭЗ в анамнезе уровни свободного Т3 и ИЧ были ниже, чем в контроле. Требует дальнейшего исследования факт снижения ИЧ и активной фракции Т3 (Т3св.).

Цитокиновый статус пациентов с ДЭЗ в анамнезе отличался от такового в контрольной группе. Так, отмечались уменьшение уровня РАИЛ (375,5±48,84пг/мл, против 521,34±60,12пг/мл), повышение уровня противовоспалительного цитокина ИФγ (71,38± 10,19 пг/мл, против 24,32±3,37 пг/мл) по сравнению с контрольной группой. Причем, между указанными цитокинами и уровнем Т3 св об-

наруживалась сильная корреляционная связь (отрицательная – между Т3св и РАИЛ и положительная – между Т3св и ИФγ).

Указанные особенности цитокинового статуса свидетельствуют о дисбалансе иммунной системы, характерном для инфекционно-воспалительного синдрома. С одной стороны это объясняет принадлежность пациентов с ДЭЗ в анамнезе к группе ЧДБ, с другой стороны – может способствовать более частым респираторным инфекциям. Наличие указанного дисбаланса цитокинового профиля необходимо учитывать при назначении терапии соответствующей группе пациентов. Вместе с тем, наличие сильной корреляционной связи между уровнем наиболее активного тиреоидного гормона (Т3 свободного) и цитокинами может служить доказательством влияния тиреоидных гормонов на иммунный ответ [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Потин В.В., Сазонова С.Н. Особенности регуляции функции щитовидной железы у больных диффузным нетоксическим зобом / В.В. Потин, С.Н. Сазонова // Пробл. эндокринол.– 1988.– Т. 34, № 1.– С. 40-42.
2. Цаболова З.Т. Степень тяжести йододефицита, уровень кортизола крови и иммунный статус у школьников с эндемическим зобом в РСО – Алания / З.Т. Цаболова // Цитокины и воспаление.– 2009 – Т. 9, № 4 – С. 130-131.
3. Łącka, K. Selected genetic aspects in the pathogenesis of the thyroid diseases / K. Łącka // Thyroid Res.– 2015.– V. 8, Suppl 1.– A21.
4. Самсонова, Л.Н. Оптимизация системы профилактики йоддефицитных заболеваний: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук. (14.00.03)/ Самсонова Любовь Николаевна.– Москва, 2009.– 47с.
5. Antonelli, A. CXC-Chemokines and Thyroid Associated Autoimmunity / A. Antonelli // Thyroid Disorders Ther.– 2012.– V.1, Issue 4.

FEATURES OF THE CYTOKINE STATUS IN HEALTH PERSONS AND PATIENTS WITH GOITER IN ANAMNESIS

Popova E.V.[1], Tinkov A.A.[1], Nikonorov A.A.[1], Popova N.P.[2]

[1]Orenburg Medical University; [2]Orenburg regional children's hospital, Orenburg, Russia

A studied of thyroid and cytokine profile in health persons and patients with goiter in anamnesis was performed. Increased level of common T3 as well as decrease level of free T3 and sensitive index was revealed in the patients having goiter in anamnesis. Such changing probably was compensatory character. Raising levels of IFγ and decrease concentration of receptor antagonist for ILα indicated an infectious inflammatory imbalance of the immune system in these patients.

Keywords: cytokines, thyroid hormones, patients with goiter in anamnesis.

ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ КРОВИ У МОЛОДЫХ ЛЮДЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ АНАМНЕЗОМ

Саранчина Ю.В., Третьякова И.Е., Агеева Е.С.

ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», Абакан, Россия

Аллергические реакции отмечались у 56,7% обследуемых. У студентов с проявлениями аллергии содержание IgE было выше, чем без них и выше у юношей по сравнению с девушками. У юношей с аллергией наблюдалось увеличение относительного количества сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов и снижение палочкоядерных нейтрофилов по сравнению с группой условно здоровых студентов. У девушек повышалось содержание эозинофилов и уменьшалось количество сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. Полученные данные свидетельствуют о повышении иммунологической реактивности у студентов.

Ключевые слова: аллергия, лейкоциты, иммуноглобулин Е.

Введение. Иммунная система наряду с нервной и эндокринной участвует в поддержании постоянства внутренней среды организма, а именно его антигенного гомеостаза. Среди нарушений иммунной системы наиболее распространенными являются аллергические заболевания. Согласно многочисленным эпидемиологическим исследованиям в России выявлен высокий уровень аллергических заболеваний – до 50 %, среди них лидирующую позицию занимают пищевая аллергия [1], поллинозы и аллергические конъюктивиты [2]. Причинами широкого распространения заболеваемости является нарастающее негативное влияние среды обитания, ухудшение демографических показателей и состояния здоровья различных групп населения, особенно молодежи. Анализ литературных источников показал, что здоровье обучающейся молодежи за последние годы значительно ухудшилось [3]. В связи с чем, сохранение и укрепление здоровья студенческой молодежи имеет большое медико-социальное и общественное значение, являясь одним из индикаторов состояния здоровья населения, определяющее его благополучие.

Таким образом, актуальным является вопрос о выявлении предрасположенности и ранней диагностики аллергических заболеваний, направленных на сохранение здоровья молодого поколения. В связи с чем, **целью** исследования является оценка состояния системы лейкоцитов у молодых людей, имеющих в анамнезе проявления аллергических реакций.

Материалы и методы исследования. По результатам скринингового анкетирования, в котором приняло участие 30 студентов 2 и 3 курса специальности «Лечебное дело» в возрасте от 18 до 20 лет, все обследуемые были разделены на две группы: 1 группа – условно здоровые студенты, 2 группа – студенты, имеющие аллергический анамнез. Материал – венозная кровь в объеме 5 мл, отобранная по общепринятой методике. Количество лейкоцитов определяли на автоматическом гематологическом анализаторе MindrayBC-3200, а также в фиксированных препаратах крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Уровень IgE в сыворотке крови выявляли методом ИФА-анализа (Вектор-Бест). Обработку данных проводили с помощью программы Statistica 8.0. Результаты представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. Достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни, статистически значимыми считали различия с достоверностью $p \leq 0,05$.

Результаты исследования. По данным анкетирования было выявлено, что среди обследуемых наличие аллергических реакций (АР) отмечалось у 56,7 % опрошенных. Наиболее распространёнными причинами АР были пищевые аллергены (чаще цитрусовые и шоколад) – 53,8 %, пыльца растений – 46,2 %, домашняя пыль – 38,4 % и шерсть животных – 30,8 %. Другие виды сенсибилизации встречались значительно реже. Среди клинических проявлений студенты указывали на наличие конъюктивитов (63,4 %), высыпаний на коже (33,3 %) и бронхиальной астмы (3,3 %). Подобные результаты были получены в работах Дубровиной Л. Н. и с соавторами [4].

У молодых людей, страдающих аллергической сенсибилизацией, содержание IgE в сыворотке крови было выше, чем в группе условно здоровых лиц. У девушек с аллергией содержание IgE было статистически значимо выше, чем у девушек без аллергии и составило 138,64 (110,33-469,71) пкг/мл и 13,25 (0,0-51,87) пкг/мл (при $p=0,002$) соответственно. Статистически значимое повышение концентрации IgE также наблюдалось у юношей с аллергией по сравнению с юношами, не имеющими проявлений АР [480,18 (226,64-712,17) пкг/мл и 46,64 (16,09-84,49) пкг/мл, соответственно, при $p=0,02$]. Кроме того, в уровне продукции иммуноглобулина Е наблюдались половые различия: концентрация IgE была выше у юношей в обеих обследуемых группах по сравнению с девушками. Сходные данные были получены Т. И. Оконенко при изучении возрастно-половых особенностей развития бронхиальной астмы [5].

Абсолютное содержание лейкоцитов в периферической крови не имело статистически значимых различий между показателями в группах здоровых студентов и с гиперчувствительностью к аллергенам. Однако наблюдалась тенденция к понижению абсолютного содержания лейкоцитов у юношей с АР [6,25 (5,05-7,6)$\times 10^9$/л, $p=0,47$] по сравнению с условно здоровыми юношами [7,35 (6,75-7,8)$\times 10^9$/л]. В то время как у девушек, наоборот, при наличии АР наблюдалась тенденция к снижению общего количества лейкоцитов в крови [6,00 (4,80-6,70)$\times 10^9$/л] по сравнению с группой условно здоровых девушек [6,20 (5,90-7,20)$\times 10^9$/л]. Кроме того, содержание лейкоцитов у девушек

как с АР, так и без них было ниже, чем у юношей, хотя и не имело достоверных различий.

При анализе лейкоцитарной формулы крови было выявлено, что у юношей с аллергической сенсибилизацией наблюдается относительное увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов [49,0 (40,0-52,5)%], лимфоцитов [41,5 (32,0-49,5)%], эозинофилов [7,5 (4,0-21,0)%, ***p=0,03***] и снижение палочкоядерных нейтрофилов [5,5 (2,0-16,5)%] по сравнению со здоровыми юношами [47,0 (40,0-52,5)%; 36,0 (33,5-40,5)%; 0,5 (0,0-2,0)%; 11,5 (7,5-17,5), соответственно]. Содержание базофилов и моноцитов в обследуемых группах не изменялось и было равно у юношей с аллергическими заболеваниями: 0,5 (0,0-1,5)% и 1,5 (0,5-4,0)%, а у здоровых юношей – 0,5 (0,0-1,0)% и 1,5 (1,0-4,5)%, соответственно. У девушек, имеющих АР, изменения в лейкоцитарной формуле характеризовались повышением содержания эозинофилов [6,0 (4,0-10,0)%, ***p=0,02***] и снижением количества сегментоядерных нейтрофилов [47,0 (39,0-55,0)%], лимфоцитов [35,0 (33,0-38,0)%] по сравнению с группой условно здоровых девушек [4,0 (1,0-5,0)%; 49,0 (33,0-58,0)% и 38,0 (33,0-40,0), соответственно]. Среди других популяций лейкоцитов изменений выявлено не было.

Выводы. Была выявлена высокая распространенность аллергической сенсибилизации среди молодых людей. В лейкоцитарной формуле крови обследуемых был обнаружен аллергический компонент – повышение количества эозинофилов. При этом у юношей с аллергическим анамнезом наблюдалась тенденция к увеличению количества сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, а у девушек наоборот, эти показатели снижались.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фёдорова О. С., Огородова Л. М. Механизмы формирования перекрестной реактивности при пищевой аллергии: результаты современных исследований / О. С. Фёдорова, Л. М. Огородова // Россиийский аллергологический журнал.– 2009.– № 6.– С. 5-11.
2. Майчук Ю. Ф. Сезонный поллинозный конъюнктивит – самая распространённая форма глазных аллергозов. Часть I. Эпидемиология, этиология, патофизиология, клиника, диагностика / Ю. Ф. Майчук // Российский офтальмологический журнал.– 2010.– № 1.– С. 37-41.
3. Темных А. С., Богащенко Ю. А. Влияние социально-экономических перемен на здоровье студентов Сибирского федерального университета / А. С. Темных, Ю. А. Богащенко // Физическое воспитание студентов.– 2012.– № 6.– С. 108-113.
4. Атопический дерматит у подростков: факторы риска, триггерные факторы и спектр сенсибилизации / Л. Н. Дубровина, Л. Ф. Казначеева, Н. В. Геращенко и др. // Вестник НГУ: Серия: Биология, клиническая медицина.– 2009.– Т. 7, вып. 2.– С. 108-114.
5. Оконенко Т. И., Токмачев М. С., Гатилов Д. В. Возрастно-половой аспект заболеваемости бронхиальной астмой в новгородской области / Т. И. Оконенко, М. С. Токмачев, Д. В. Гатилов // Вестник новгородского государственного университета.– 2012.– № 66.– С. 8-12.

THE FEATURES OF LEUKOCYTIC FORMULA OF THE BLOOD AMONG YOUNG PEOPLE WITH AN ALLERGIC HISTORY

Saranchina Yu.V., Tretiakova E. I., Ageeva E. S.

Federal State-Funded Educational Institution of Higher Professional Education «Katanov Khakass State University», Abakan, Russia

Allergic reactions were noted in 56,7 % of cases. The IgE content of blood in the group of the students with allergy was higher than in the group of healthy students. In this case, the IgE concentration was higher in boys group in comparing with girls group. The number of segmentonuclear neutrophils, lymphocytes, eosinophils increased and the number of band nuclear neutrophils decreased among the boys with allergy in comparing with the healthy students. The change of white blood cells count among the girls could be characterized by a reliable increase of the content of eosinophils and decrease of segmentonuclear neutrophils and lymphocytes. The obtained data indicates increased immunological reactivity among the students.

Keywords: allergy, white blood cells, immunoglobulin E.

АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ И ФЕНОТИПА

Манашева Д. И., Агеева Е. С., Саранчина Ю. В.

Хакасский государственный университет им.Н.Ф. Катанова, Абакан, Россия

В статье представлен сравнительный анализ показателей клеток периферической крови у пациентов с разными фенотипами и степенью тяжести бронхиальной астмы. Установлено увеличение лейкоцитов и снижение лимфоцитов, эозинофилов у пациентов с тяжелой и среднетяжелой степенью БА. Выявлено наличие относительного лейкоцитоза при неаллергической бронхиальной астме и абсолютного при аллергической.

Ключевые слова: бронхиальная астма, эозинофилы, лимфоциты, нейтрофилы.

Введение. Современный этап развития научно-технического прогресса способствует развитию аллергических заболеваний у населения. По данным международных эпидемиологических исследований, в России страдают бронхиальной астмой (БА) более 7 млн. человек, но официально зарегистрировано лишь около одного миллиона [1]. В литературе накоплено достаточное количество данных о состоянии иммунной системы у больных с БА, но они носят описательный характер, часто фрагментарны. Оценка иммунологических показателей организма поможет врачу назначить патогенетически обоснованную терапию, обеспечивающую эффективность медикаментозной синдромной терапии.

В связи с чем, **целью** исслдеования являлась оценка особенностей иммунологических показателей периферической крови у пациентов с БА.

Материалы и методы. Ретроспективным методом были исследованы 32 медицинские карты пациентов (форма № 003/у), находившихся на стационарном лечении во II терапевтическом отделении базы ФГУЗ РКБ «Республиканская клиническая больница им. Г. Я. Ремишевской» с диагнозом БА, в период с 2014 по 2015 год. Количество женщин составило 23 (от 31 до 77 лет), мужчин 9 (от 23 до 70 лет).

Собранные данные были рассмотрены с двух позиций: БА по степени тяжести (интермитирующая, легкая персистирующая, средняя персистирующая и тяжелая персистирующая) и по фенотипам (аллергическая, неаллергическая и неясного генеза (смешанная)) [2, 3]. Для исследования были использованы данные общего анализа крови: количество лейкоцитов и лейкоцитарная формула. Данные были получены на базе клинико-диагностической лаборатории ФГУЗ РКБ им. Г. Я. Ремишевской по стандартным методикам. Статистическая обработка была проведена с помощью программы Statistica 6.0 и программного обеспечением Microsoft Office Excel 2007. Результаты представлены в виде медианы и 25 и 75 квартилей (Me ($Q_1 \div Q_3$)). Для сравнения независимых выборок использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Достоверность различий считали значимой при $p<0,05$.

Результаты исследования. Общее количество лейкоцитов крови изменялось в зависимости от степени тяжести течения БА и наибольшего значения достигало у больных с легкой и средней степенью тяжести (8,8 (5,9-9,5)$\times 10^9$/л и 7,9 (7,0÷11,6)$\times 10^9$/л, соответственно). В то время как у пациентов с тяжелой степенью течения БА содержание лейкоцитов составило 7,7 (6,7÷10,9)$\times 10^9$/л. Полученные результаты не имели статистически значимых различий.

При сравнении показателей в группах с различными фенотипами БА, было выявлено, что наибольшее количество лейкоцитов регистрировалось при неаллергической и смешанной БА: 8,3 (6,3-9,6)$\times 10^9$/л и 8,7 (8,1-9,5)$\times 10^9$/л соответственно. При аллергической БА общий уровень лейкоцитов достигал 7,5 (6,7-12,7)$\times 10^9$/л.

Полученные результаты во всех обследуемых группах не выходили за пределы референсных значений.

Анализ лейкоцитарной формулы показал, что у больных с БА наблюдаются изменения в перераспределении отдельных популяций лейкоцитов, особенно в содержании нейтрофилов, эозинофилов и лимфоцитов. Относительное количество сегментоядерных нейтрофилов повышалось в зависимости от степени тяжести патологического процесса. Так, у пациентов с легким течением содержание сегментоядерных нейтрофилов составило 72,5 (70,5-73,6)%, со средним – 66,5 (65,0÷71,4)%, с тяжелым – 61,4 (59,2÷67,1)%. Уровень сегментоядерных нейтрофилов при аллергическом типе БА составил 72,0 (70,0÷74,0)%, а при неаллергическом варианте – 73,8 (71,0÷77,0)%. Данные значения были выше по сравнению с показателем в группе со смешанной БА (61,2 (47,0÷77,5)%).

Количество палочкоядерных нейтрофилов имело тенденцию к снижению в подгруппах с интермитиирующей БА – 1,5 (0,0÷3,0)%, легким течением – 0,0 (0,0÷ 0,0)%. Необходимо отметить, что повышение числа палочкоядерных нейтрофилов отмечалось в подгруппах с БА среднетяжелого течения (4,5 (3,0÷9,0)%) и смешанной БА (4,0 (0,0÷9,0)%). Из данного описания следует, что лейкоциты, в частности нейтрофилы имеют тенденцию к повышению относительно нормы, что можно объяснить восполнением клеток в кровотоке за счет повышения пролиферации их в костном мозге и выброса в кровь. Что касается палочкоядерных нейтрофилов, то снижение их в некоторых подгруппах больных можно объяснить созреванием их в сегментоядерные, которые, в свою очередь, превышали порог референсных значений.

Уровень эозинофилов в обследуемых группах имел тенденцию к уменьшению относительно нормы, особенно стойкое снижение отмечалось в подгруппах с легким течением БА легкого течения (0,1 (0,0÷4,6)%) и – БА смешанного генеза (0,0 (0,0÷0,0)%). Отмечается незначительное повышение числа данной популяции клеток в подгруппах с БА среднетяжелого течения (2,0 (0,0÷5,8)%) и аллергической БА (3,0 (0,0÷5,8)%). У больных с острой тяжелой астмой возможна эозинопения вследствие миграции клеток в респираторный тракт [4].

Количество лимфоцитов было ниже установленной нормы во всех подгруппах, кроме БА легкого течения (23,3 (21,0÷28,1)%), более устойчивое уменьшение можно отметить в подгруппах БА среднетяжелого (17,3 (12,0÷22,0)%) и тяжелого течения (19,0 (18,0÷25,8)%). Данная зависимость имеет отражение и в результатах других авторов, которые свидетельствуют о том, что у больных БА прослеживается связь: чем тяжелее протекает заболевание, тем ниже уровень лимфоцитов в крови [5].

Заключение. При аллергической БА наблюдается повышение всех популяций лейкоцитов, кроме лимфоцитов, в отличие от неаллергической, в которой повышение лейкоцитов происходит за счет перераспределения популяций клеток. При анализе БА в зависимости от степени тяжести можно отметить повышение популяций лейкоцитов при среденетяжелом и тяжелом течении БА, за исключением лимфоцитов. Последние имеют стойкое снижение при всех обострениях БА. Сравнительный анализ показателей периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой в зависимости от фенотипа и степени тяжести демонстрирует снижение эозинофилов, что объясняется тяжелым обострением, которое возможно у пациентов с БА любой степени тяжести.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овсянникова Л.В., Петров Д.В. Бронхиальная астма в Омской области: динамика показателей заболеваемости и распространенности / Л.В. Овсянникова, Д.В. Петров // Омский научный вестник.– 2015.– № 1.– С. 18-20.
2. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (пересмотр 2011 г.) / Под ред. А.С. Белевского.– М.: Российское респираторное общество, 2012.– 108 с.
3. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению бронхиальной астмы / Под ред. А.Г. Чучалина, З.Р. Айсанова, А.С. Белевского.– М.: Российское респираторное общество, 2013.– 47 с.
4. Апоптоз эозинофилов при бронхиальной астме / Е.С. Агеева, И.И. Иванчук, А.Э. Сазонов и др.– Томск: Сибирский государственный университет, 2008.– 116 с.
5. Особенности морфологических показателей и количественной оценки лимфоцитов периферической крови у больных апотпической бронхиальной астмой / М.М.Д. Нсагу, А.С. Водунон, З.И. Абрамова и др. // Казанский медицинский журнал. 2007.– Т. 88, № 2.– С. 168-171.

THE ANALYSIS OF IMMUNOLOGICAL INDICATORS AT PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA OF DIFFERENT SEVERITY AND PHENOTYPE

Manasheva D. I., Ageeva E. S., Saranchina Yu.V.

Khakass state university of N. F. Katanov, Abakan, Russia

There is a comparative analysis of indicators of quality the cells of among peripheral blood the group of patients with various phenotypes and severity of bronchial asthma are considered in this article. Increase in leukocytes and decrease in lymphocytes, eosinophils at heavy and medium-weight degrees was established BA. It was revealed an existence of a relative leykocytosis at not allergic bronchial asthma and absolute leukocytes at allergic BA.

Keywords: bronchial asthma, eosinophils, lymphocytes, neutrophils.

ВЛИЯНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ЧАСТЫМИ ОБОСТРЕНИЯМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, НА ТЕЧЕНИЕ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Геворкян О. В.[1], Оспельникова Т. П.[2]

[1]ГБУЗ МНПЦДК ДЗМ; [2]ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Выявлен характер нарушений интерферонового статуса у пациентов с атопическим дерматитом, имеющих в анамнезе частые обострения вируса простого герпеса. Изучена положительная динамика изменений лабораторных и клинических показателей у пациентов с атопическим дерматитом, на фоне терапии сопутствующей герпетической инфекции.

Ключевые слова: атопический дерматит, герпес, интерфероновый статус.

Атопический дерматит – аллергическое заболевание кожи с наследственной предрасположенностью и характеризующееся хроническим рецидивирующим течением, аномалиями клеточного иммунитета в коже с дисрегуляцией Т-клеточного звена и гиперчувствительностью ко многим иммунным и неимунным стимулам. Атопический дерматит один из самых частых дерматозов, развивающихся с раннего детства и сохраняющихся в пубертатном и взрослом возрасте, является одним из наиболее распространенных аллергических заболеваний у детей. Атопичекий дерматит относят к мультифакторной патологии. В формировании атопических заболеваний велика роль наследственной предрасположенности, заболевание характеризуется генетически детерминированной энзимопатией и нарушениями нейрогуморальной регуляции. Неблагоприятными факторами, усиливающими появления заболевания, провоцирующими его обострения, являются бактериальные, вирусные или грибковые инфекции [1]. Иммунопатогенез данного заболевания достаточно сложен и сочетает в себе угнетение клеточного иммунитета и активацию клеточно-опосредованной аллергической реактивности [2].

Цель исследования – изучить характер нарушений интерферонового статуса у пациентов с атопическим дерматитом, имеющих в анамнезе частые обострения вируса простого герпеса, оценить влияние обострений герпетической инфекции на течение атопического дерматита и диинамику показателей в системе интерферона.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 42 пациента с атопическим дерматитом, в возрасте от 18 до 28 лет. Все пациенты имели клинические проявления атопического

дерматита с раннего детства. Степень тяжести заболевания (в баллах) определяли в период обострения, на момент поступления. У всех обследованных больных отмечалось среднетяжелое течение заболевания (49 баллов; частота обострений 3-4 раза в год, длительность ремиссии 2-3 месяца). Все пациенты находились в стадии обострения и получали стандартную базисную терапию (антигистаминные, детоксикационные, седативные, гипосенсибилизирующие лекарственные средства, наружно ГКС мази). У всех больных процесс имел распространенный характер (площадь поражения 46-49 %). В анемнезе всех обследуемых были клинические проявления герпетической инфекции (Herpes simplex). У 76 % больных (32 пациента) герпетическая инфекция с частыми обострениями (каждые 2-3 месяца), у 37 % (11 пациентов) 2 раза в год, локализация преимущественно на губах. У всех пациентов оценивали интерфероновый статус при обращении к врачу до начала терапии. Половина пациентыов с частыми обострениями простого герпеса (16 пациентов) после базистой стандартной терапии, находясь в стадии ремиссии атопического дерматита, получали Циклоферон в инъекциях по 2,0 мл, в/м по схеме (дни инъекций 1, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 20, 23). У данной группы пациентов оценивали интерфероновый статус повторно, через месяц после терапии Циклофероном. Клинические наблюдения за всеми пациентами велись в течение года.

Интерфероновый статус определялся биологическим методом, используя культуру клеток фибробластов легких эмбриона человека (штамм 977 ФЛЭЧ 9-13 пассажей из клеточного банка Медико-генетического научного центра РАМН, Москва, Россия). Исследовали гепаринизированную кровь больных атопическим дерматитом: продукцию ИФН-α, продукцию ИФН-γ, уровень циркулирующего ИФН в плазме крови, уровень спонтанно продуцируемого клетками крови ИФН. Статистическую обработку данных проводили, используя программу BIOSTAT (вычисление M±σ, достоверность различий средних значений по парному критерию Стьюдента).

Результаты. У всех обследуемых отмечалась недостаточность системы интерферона по продукции α- и особенно γ-ИФН (1-2 и 2-3 степени соответственно) лейкоцитами крови. Средние показатели интерферонового статуса у пациентов в стадии обострения составили (M±m, в Ед/мл): способность к продукции ИФН-α лейкоцитами крови 158±12,35; ИФН-γ- 12,43 ± 0,93. При этом, выявлен повышенный уровень сывороточного ИФН у 16 (38 %) и наличие спонтанного ИФН у 9 (21 %) больных.

Средние показатели интерферонового статуса у пациентов с частыми обострениями герпеса до лечения Циклофероном составили (M±m, в Ед/мл): ИФН-α-148,7 ± 16,94, ИФН-γ- 12,8 ± 0,8; после терапии: ИФН-α- 276,7 ± 37,82, ИФН-γ- 18,93 ± 1,13. Данные являются достоверными ($p<0,05$).

В ходе клинического наблюдения за больными (в течение года, клиническая картина оценивалась ежемесячно) получена выраженная положительная динамика у всех пациентов с атопическим дерматитом и частыми обострениями простого герпеса, которые получали Циклоферон после полученной стандартной базисной терапии. Отмечалось уменьшение количества обострений герпетической инфекции и атопического дерматита в данной группе пациентов в 2 раза, увеличение продолжительности ремиссий (до 6 мес.). У пациентов, получавших только базисную терапию, можно отметить положительную динамику после завершения курса терапии, но при динамическом наблюдении клиническая картина не менялась (длительность ремиссий и количество обострений остались прежними). Можно предположить, что отсутствие сохранности положительной клинической динамики, при отдаленном наблюдении за пациентами, получавшими базисную терапию, обусловлено нарушениями в системе интерферона и влиянием обострений герпетической инфекции на течение атопического дерматита. Так как при включении в комплекс терапии препарата индуктора ИФН Циклоферона у пациентов отмечалась не только лабораторная, но и клиническая положительная динамика, которая сохранялась на протяжении года. Изменение интерферонового статуса коррелирует с клинической картиной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геворкян О. В., Оспельникова Т. П. Иммунологические изменения у пациентов с атопическим дерматитом / О. В. Геворкян, Т. П. Оспельникова // Российский аллергологический журнал.– 2010.– № 6.– С. 14-19.
2. Подкатова Е. Г. Клинико-иммунологический статус при атопическом дерматите / Е. Г. Подкатова // Вестник Российского государственного медицинского университета.– 2006.– № 2.– С. 51.

INFLUENCE IMMUNOLOGICAL DISORDERS, CAUSED BY FREQUENT EXACERBATIONS OF CHRONIC HERPES VIRUS INFECTION ON THE COURSE OF ATOPIC DERMATITIS

Gevorkyan O. V.[1], Ospelnikova T. P.[2]

[1]Moscow scientific practical center of dermatology and cosmetology Health Department of Moscow; [2]FGBU "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology name N. F. Gamalei " the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

The character disorders interferon status of patients with atopic dermatitis, with a history of frequent exacerbations of herpes simplex virus. Studied the positive dynamics of changes in laboratory and clinical parameters in patients with atopic dermatitis, during therapy with concomitant herpetic infection

Keywords: atopic dermatitis, herpes, interferon status.

В-ЛИМФОЦИТЫ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ: TH17-ЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Куклина Е. М.[1], Сурсякова Н. В.[2], Байдина Т. В.[2], Данченко И. Ю.[2], Некрасова И. В.[1]

[1]ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; [2]ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия имени академика Е. А. Вагнера» МЗ РФ, Пермь, Россия

Изучены альтернативные (не связанные с продукцией иммуноглобулинов) функции В-лимфоцитов у пациентов с ремиттирующей формой рассеянного склероза. Показано, что периферические В-клетки при данной патологии обладают более высоким провоспалительным и антигенпрезентирующим потенциалом в сопоставлении В-лимфоцитами здоровых доноров. Предложен новый, Th17-зависимый, механизм активации В-клеточной дифференцировки при данной патологии.

Ключевые слова: В-лимфоциты, презентация антигена, цитокины, Th17.

Рассеянный склероз (РС) – воспалительное нейродегенеративное аутоиммунное заболевание, связанное с демиелинизацией нервных волокон. Несмотря на то, что основная роль в патогенезе данного заболевания традиционно отводится Т-клеточным реакциям, в настоящее время на первый план выходит исследование роли в этом процессе В-лимфоцитов. С одной стороны, на мышах с экспериментальными аутоиммунными энцефаломиелитами (ЕАЕ, модель РС у животных) показано, что генетически обусловленный дефицит В-лимфоцитов или направленное истощение В-клеточной популяции до индукции заболевания обеспечивают устойчивость организма к развитию аутоиммунного процесса, а удаление или инактивация В-клеток на фоне развития аутоиммунной патологии снимает выраженность заболевания [1]. С другой стороны, В-лимфоциты выявляются в значительных количествах в тканях-мишенях пациентов с аутоиммунными патологиями, более того, они формируют в этих тканях зародышевые центры, свидетельствующие о наличии В-клеточного иммунного ответа,– аналогично зародышевым центрам в лимфатических узлах и селезенке [2]. Одной из современных стратегий лечения РС является истощение популяции В-лимфоцитов с помощью препарата ритуксимаб на основе моноклональных антител

к В-клеточной мембранной молекуле CD 20. При этом основная функция В-лимфоцитов, продукция иммуноглобулинов, как полагают, не играет решающей роли в этом процессе, поскольку у животных с ЕАЕ удаление аутоантител после индукции заболевания не приводит к исчезновению симптомов, а экзогенное введение аутоантител не вызывает развития аутоиммунной патологии или осложнения течения заболевания. Поэтому акцент в настоящее время делается на альтернативные функции В-лимфоцитов – продукцию цитокинов и презентацию антигенов, в том числе – аутоантигенов, Т-лимфоцитам.

Мы в своих исследованиях оценили синтез основных про- и противовоспалительных цитокинов фракционированными В-лимфоцитами пациентов с РС, находящихся в стадии ремиссии, а также потенциальную антигенпрезентирующую способность этих клеток, по экспрессии факторов, играющих ключевую роль в этом процессе – костимулирующих молекул CD80/CD86 и молекулы МНС II класса HLA-DR, в составе которой В-лимфоциты представляют антиген $CD4^+$ Т-клеткам, *ex vivo* и *in vitro*. Установлено, что даже в отсутствие активатора синтез провоспалительных цитокинов В-лимфоцитами у пациентов с РС статистически значимо выше, чем у здоровых доноров, а противовоспалительного, напротив, снижен (процент цитокин-позитивных $CD3^-CD19^+$-клеток у здоровых доноров и пациентов с РС, соответственно: для фактора некроза опухоли α (TNFα) – 2,49 ± 0,484 и 7,95 ± 1,28, $p < 0,05$; для лимфотоксина α (LTα) – 5,40 ± 1,15 и 13,4 ± 1,61, $p < 0,05$; для интерлейкина 10 (IL-10) – 7,50 ± 0,879 и 3,65 ± 0,978, $p < 0,05$). А в условиях поликлональной активации эти отличия еще более выражены (процент цитокин-позитивных $CD3^-CD19^+$-клеток у здоровых доноров и пациентов с РС, соответственно: для TNFα – 16,8 ± 1,72 и 26,3 ± 2,70, $p < 0,05$; для LTα – 33,6 ± 3,88 и 41,7 ± 6,24, $p > 0,05$; для IL-10 – 9,82 ± 2,72 и 5,21 ± 0,859, $p < 0,05$). Оценка экспрессии В-лимфоцитами молекул, участвующих в презентации антигена, выявило повышение данного показателя при РС для костимулирующей молекулы CD 80, но только в ответ на активацию клеток в культуре и только для уровня экспрессии данного маркера, но не процента CD80-позитивных В-лимфоцитов (Уровень экспрессии CD 80 в субпопуляции $CD3^-CD19^+$-клеток (Mean Fluorescence Intensity, MFI, усл. ед.) у здоровых доноров и пациентов с РС, соответственно: 211 ± 26,4 и 282 ± 25,1, $p < 0,05$). Выявленные эффекты могут иметь особое значение для РС, поскольку В-клетки при данной патологии активно инфильтрируют ЦНС и могут провоцировать нейровоспалительные процессы, усугубляя течение заболевания.

Как следствие, факторы и механизмы, участвующие в регуляции функций В-лимфоцитов, находятся в фокусе внимания ученых. И очевидным претендентом на роль В-клеточного активатора при РС является субпопуляция Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17). Во-первых, РС, как и другие аутоиммунные заболевания, сопровождается существенным увеличением численности Th17 и повышением уровня соответствующих цитокинов – IL-17, IL21, IL-22, причем активность Th17 коррелирует с выраженностью клинических проявлений. Во-вторых, показано, что Th17 поддерживают выживание В-лимфоцитов, защищая их от апоптоза, а также индуцируют пролиферацию и дифференцировку В-клеток и усиливают пролиферативный ответ на антиген [3]. Более того, Th17 промотируют формирование зародышевых центров и переключение классов иммуноглобулинов до IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 [3]. В свою очередь, в литературе имеются данные и об обратном процессе – показано, что презентация аутоантигена В1-лимфоцитами индуцирует преимущественную дифференцировку наивных $CD4^+$ Т-клеток в Th17 [4]. Более того, сами В-лимфоциты способны продуцировать IL-17A и IL-17F [5]. Неудивительно, что истощение популяции В-лимфоцитов у пациентов с РС при терапии с использованием антител к В-клеточной молекуле CD 20 сопровождается снижением численности Th17 в циркуляции и уровня IL-17A в сыворотке. В связи с вышесказанным, одной из наиболее актуальных проблем в исследовании механизмов развития РС на сегодняшний день является анализ связи и взаимной регуляции между двумя лимфоцитарными популяциями, играющими ключевую роль в патогенезе – В-лимфоцитами и Th17.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 14-04-96007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression / T. K. Matsushita, J. D. Bouaziz, M. Fujimoto et al. // J Clin Invest. – 2008. – V. 118 (10). – P. 3420-3430.

2. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology / R. Magliozzi, O. Howell, A. Vora et al. // Brain.– 2007.– V. 130.– P. 1089-1104.
3. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers / M. Mitsdoerffer, Y. Lee, A. Juger et al. // PNAS USA – 2010.– V. 107.– P. 14292-14297.
4. Reciprocal generation of Th1/Th17 and Treg cells by B1 and B2 B cells / X. Zhong, W. Gao, N. Degauque et al. // Eur. J. Immunol.– 2007.– V. 37.– P. 2400-2404.
5. IL-17A and IL-17F Expression in B Lymphocytes / A. Vazquez-Tello, R. Halwani, R. Li et al. // Int. Arch. Allergy Immunol – 2012.– V. 157.– P. 406-416.

B LYMPHOCYTES IN MULTIPLE SCLEROSIS: TH17-DEPENDENT ACTIVATION AS A POSSIBLE MECHANISM OF DISEASE PROGRESSION

Kuklina E.M.[1], Sursiakova N.V.[2], Baidina T.V.[2], Danchenko I.U.[2], Nekrasova I.V.[1]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; [2]«Perm State Medical University named after academician E.A. Vagner" of Ministry of Health of the Russian Federation, Perm, Russia

Alternative (non-immunoglobulin production) function of B-lymphocytes in patients with relapsing forms of multiple sclerosis has been explored. It has been shown, that peripheral B cells in this disease have higher proinflammatory and antigen-presenting potential than B lymphocytes of healthy donors. A new Th17-dependent mechanism of activation of B-cell differentiation in this pathology has been suggested.

Keywords: lymphocytes, antigen presentation, cytokine, Th17.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВЛИЯНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНИТЕТА И УСЛОВИЙ ТРУДА НА ЧИСЛО СЛУЧАЕВ ОРВИ У РАБОТНИКОВ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Мартынов А.И., Федоскова Т.Г., Феофанова Т.В., Зеленова З.В.

ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России, Москва, Россия

Предложена статистическая модель связи числа случаев ОРВИ с показателями иммунитета и условиями труда для работников промышленного производства. Модель идентифицирована для двух групп – мужчин и женщин. Показано, что модели для мужчин и женщин включают разные показатели иммунитета. Результаты обсуждаются.

Ключевые слова: статистическая модель, производственный фактор, состояние здоровья, иммунный статус, повторные ОРВИ.

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) занимают значительное место в структуре заболеваемости человечества, а среди заболеваний инфекционной этиологии стойко удерживают первое место. По данным ВОЗ на долю ОРВИ, включая грипп, приходится около 90 % случаев всех инфекционных заболеваний. Они же приносят и основной экономический ущерб. Временная нетрудоспособность от ОРВИ и гриппа составляет 25-30 % случаев временной нетрудоспособности от всех заболеваний, травм и ухода за больными. Высокий уровень заболеваемости ОРВИ особенно актуален для организованных коллективов (в частности, для работников индустриальной сферы). Причиной частой вирусной патологии на промышленном производстве являются такие экзогенные факторы, как экологическое и социальное неблагополучие, адаптационная перестройка, производственные вредности

и др. [1]. Результат воздействия неблагоприятных производственных факторов (ПФ) проявляется, в частности, в сдвигах иммунологических показателей, как в сторону снижения, так и в сторону роста их значений вплоть до возникновения иммунологических синдромов. Характер этих сдвигов во многом определяется длительностью действия ПФ [2].

Цель исследования. Изучить возможную связь среднегодового числа случаев ОРВИ с иммунным статусом и условиями труда у работников промышленного предприятия средней полосы России.

Материалы и методы. В исследование были включены 55 человек, работавшие в условиях контакта с производственным фактором (ПФ). Длительность работы в условиях контакта с ПФ (стажПФ) была выбрана основной характеристикой условий труда. Среднегодовое число случаев ОРВИ (чОРВИ) определяли со слов обследуемого работника как среднее число случаев ОРВИ в год за 5 последних лет. Обследование проводилось в рамках планового профосмотра. Состояние иммунного статуса оценивали по содержанию иммунокомпетентных клеток и иммуноглобулинов в сыворотке крови (leyk, lymph, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 (в абсолютных количествах и в%), FAGn, FAGm, IgE, IgG, IgA, IgM, IRI) и слюне (IgG-sal, IgA-sal, s-IgA-sal). Возможную связь между этими показателями, стажемПФ и чОРВИ определяли методом ранговых корреляций Спирмена (R, p). Для выявления основных показателей, влияющих на показатель чОРВИ, строили линейное многофакторное регрессионное уравнение, в котором показатель чОРВИ был зависимой переменной, а показатели иммунного статуса (ПИС) и стажПФ были независимыми переменными. Вычисляли коэффициент детерминации (R^2) уравнения и оценивали степень влияния (К) независимых переменных на чОРВИ. В расчетах использовали только те корреляции, для которых было справедливо неравенство $p<0,20$ (т.е. статистически значимые корреляции с $p\leq0,05$ и их тенденции с $0,05<p\leq0,20$). Сравнение между группами проводили по методу Манн-Уитни. В качестве описательных статистик использовали медиану (M) и размах (min-max).

Результаты и обсуждение. При сравнении двух групп (группа 1, мужчины, 38 человек, группа 2, женщины, 19 человек) были выявлены статистически значимые различия по следующим показателям: IgE (M_1=180,0, (25-1570), M_2=30,0, (20-248), $p<0,0001$); CD19 % (M_1=6,3, (3,6-13,7), M_2=7,3, (3,7-15,1), $p=0,033$); стажПФ (M_1=14,5, (0,5-50,0), M_2=29,5, (3,0-51,0), $p=0,046$). Возрастные различия между группами отсутствовали: M_1=55,0, (20,0-75,0), M_2=59,0, (46,0-73,0), $p=0,24$. Дальнейшие расчеты производили для каждой группы отдельно.

Группа 1. Корреляционный анализ выявил статистически значимые связи и тенденции показателя чОРВИ с шестью ПИС и стажемПФ. Для пары показателей «чОРВИ – CD19 %» R=0,37, p=0,069, «чОРВИ – FAGn» R= –0,27, p=0,11, для «чОРВИ – IgG-sal» – R=0,22, p=0,19, для «чОРВИ – IgA-sal» – R=0,36, p=0,031, для «чОРВИ – s-IgA-sal» – R=0,29, p=0,08, для «чОРВИ – стажПФ» – R=0,27, p=0,12. Регрессионное уравнение в этом случае имеет вид:

чОРВИ = 0,0033 s-IgA-sal + 0,029 стажПФ (1)

Статистическая значимость уравнения $p<0,003$. Статистическая значимость коэффициента при переменной s-IgA-sal – p_1=0,036, при переменной стажПФ – p_2=0,005, коэффициент детерминации уравнения R^2 =29,0 %. Степень влияния переменной s-IgA-sal на переменную чОРВИ K_1=12,2 %. Степень влияния переменной стажПФ на переменную чОРВИ K_2=16,8 %.

Группа 2. Аналогичные расчеты были проведены для группы 2. Выявлены две статистически значимые корреляции показателя чОРВИ: с IgM (R= –0,56, p=0,013) и стажПФ (R=0,71, p=0,001) и две тенденции: с lymph% (R= –0,31, p=0,19) и возрастом (R=0,40, p=0,093). Регрессионное уравнение в этом случае имеет вид:

чОРВИ = –0,0095 IgM + 0,043 стажПФ (2)

Это уравнение статистически значимо с $p<0006$. Статистическая значимость коэффициента при переменной IgM – p_1=0,075 (тенденция), при переменной стажПФ – p_2=0,011, коэффициент детерминации уравнения $R^2\approx$ 50,0 % (точное значение R^2=0,4992). Степень влияния переменной IgM на переменную чОРВИ $K_1\approx$20,0 %. Степень влияния переменной стажПФ на переменную чОРВИ $K_2\approx$30,0 %.

Таким образом, в ходе проведенного исследования получены два линейных многофакторных уравнения (одно для группы мужчин и другое для группы женщин), имитирующих связь между числом случаев острой респираторной вирусной инфекции в течение одного календарного года у работника (работницы) промышленного объекта и двумя показателя-

ми: одним ПИС и стажемПФ. Оба уравнения статистически значимы, но неинформативны (т.к. R^2<50 %), поэтому не пригодны для построения прогноза. Показатель стажПФ входит в оба уравнения с положительным знаком. Изменчивость показателя стажПФ объясняет изменчивость показателя чОРВИ на 16,8 % в уравнении (1), на 30 % – в уравнении (2). Показатели иммунитета в уравнениях (1) и (2) разные. В уравнении (1) это показатель местного гуморального иммунитета s-IgA-sal (со знаком плюс), а в уравнении (2) это показатель сывороточного гуморального иммунитета IgM (со знаком минус). Вариабельность показателя s-IgA-sal объясняет 12,2 % вариабельности показателя чОРВИ в уравнении (1), вариабельность показателя IgM – 20 % вариабельности показателя чОРВИ в уравнении (2).

Для работающих мужчин (в соответствии с (1)) значение показателя чОРВИ может быть снижено только за счет снижения показателя s-IgA-sal, для работающих женщин (в соответствии с (2)) – только за счет роста показателя IgM. Поскольку известно, что проживание на загрязненных территориях, равно как и работа на производстве в условиях действия неблагоприятного ПФ приводят к снижению уровня сывороточных иммуноглобулинов, в частности, IgM [2] и росту секреторного s-IgA-sal [3], то снижения величины показателя чОРВИ в рамках наших моделей можно достичь двумя способами. Во-первых, повысив экологическую безопасность труда на объекте, что со временем должно привести к нормализации уровней s-IgA-sal и IgM как у мужчин, так и у женщин, а, во-вторых, дополнительно подняв уровень IgM в сыворотке крови работающих женщин, используя для этого соответствующие иммуномодуляторы.

Различие уравнений (1) и (2) по входящим в них независимым переменным ПИС, вероятно, отражает принципиальные различия в условиях работы на объекте для мужчин и женщин. Возможно, именно с этими различиями также связаны выявленные различия по показателям IgE и CD 19 % между мужчинами и женщинами.

Выводы. Идентифицирована статистическая модель связи среднегодового числа случаев ОРВИ у отдельного работника/работницы промышленного производства с показателями иммунитета и стажем работы на данном предприятии в условиях контакта с производственным фактором. Установлено, что основным показателем иммунитета в модели для работников, влияющим на чОРВИ, является показатель местного иммунитета s-IgA-sal, в модели для работниц – показатель сывороточного иммунитета IgM. Модель позволила определить направление изменений этих показателей, приводящее к снижению числа случаев ОРВИ в год у отдельного работника/работницы, и получить количественные оценки этого процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика острых респираторных вирусных инфекций у работников промышленных предприятий. / Е. А. Вострикова, С. Н. Гойхман, Н. В. Шабалина и др. // Лечащий врач.– 2007.– № 10.– С. 81-82.
2. Цыганок С. С., Парахонский А. П. Диагностика нарушений иммунитета при иммуноэкологических исследованиях. / С. С. Цыганок, А. П. Парахонский // Успехи современного естествознания.– 2005.– № 2 – С. 52-52.
3. Richter J., Pelech L. Immunological findings in groups of children after compensatory measures. / J. Richter, L. Pelech // Toxicol Lett.– 1996.– V. 88, № 1-3.– P. 165-168.

THE STATISTICAL MODEL OF THE INFLUENCE OF THE IMMUNE SYSTEM AND WORKING CONDITIONS ON THE INCIDENCE OF VIRAL RESPIRATORY INFECTIONS IN WORKERS OF INDUSTRIAL PRODUCTION

Martynov A. I., Fedoskova T. G., Feofanova T. V., Zelenova Z. V.

FSBO SSC Institute of immunology of Federal medical-biological Agency of Russia, Moscow, Russia

The statistical model for the relationship of the incidence of viral respiratory infections with immune system and working conditions for workers in industrial production is proposed. The model identified for two groups – men and women. It is shown that models for men and women include various indicators of immunity. The results are discussed.

Keywords: statistical model, production factor, health status, immune status, frequent SARS.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ В СТАДИЮ РЕМИССИИ

Рябова Л. В.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский Государственный Медицинский университет», Челябинск, Россия

При изучении 2 групп больных с аллергическим ринитом персистирующего течения и больных с бронхиальной астмой легкого течения в фазе клинической ремиссии заболеваний были получены однотипные иммунные изменения, что выражалось в снижении активации иммунной системы, что, по-видимому, является одной из причин хронизации процесса. Особенно схожие показатели были получены по цитокиновому каскаду, что свидетельствует об общем патологическом процессе только разной степени тяжести.

Ключевые слова: иммунология, аллергология, пульмонология.

Аллергический ринит (АР) и бронхиальная астма (БА) являются важнейшими проблемами современной медицины [4]. В последние годы серьезно возросло число больных трудоспособного возраста с данной патологией. АР и БА являются этапами единого воспалительного процесса. Вместе с тем, очевидная взаимосвязь двух заболеваний мало исследована и признается не всеми исследователями.

Цель исследования: изучение иммунных механизмов развития АР и БА с целью установления взаимоотношения двух указанных нозологий.

Материалы и методы исследования. Были изучены иммунологические показатели в группах больных АР и БА. В них вошли 22 пациента с АР персистирующего течения легкой степени тяжести, 40 больных БА легкой степени в стадии ремиссии. Контрольную группу составили 22 человека. Группа (22 человека) была сформирована из условноздоровых лиц, которые выявлялись во время проведения профилактических медицинских осмотров, включавшего осмотр следующих специалистов: врач аллерголог-иммунолог, хирург, стоматолог, эндокринолог, гинеколог, ЛОР-врач. На момент обследования все условноздоровые лица не предъявляли каких-либо жалоб на наличие хронического или аллергического заболевания и в течение 3 месяцев перед обследованием отрицали наличие острых воспалительных процессов.

Проводилось иммунологическое исследование периферической крови: общее количество лейкоцитов и развернутая лейкоцитарная формула, субпопуляции лимфоцитов методом иммунофенотипирования [3] с использованием моноклональных антител серии ИКО: CD3, CD4, CD8, CD10, CD11в, CD16, CD20, CD25, CD34, CD56, CD95, HLA-DR. Изучалась функциональная активность нейтрофилов: лизосомальная активность, фагоцитарная функция на модели поглощения частиц полистерольного латекса, кислородзависимый метаболизм с помощью спонтанного и индуцированного NST-теста [2]. Определяли 3 класса иммуноглобулинов; комплемент и его компоненты (CH50, C1, C2, C3, C4, C5), спонтанную и индуцированную стандартными митогенами (PHA и LPS E.coli) в супернатантах цельной крови продукцию IFN-γ, IL-4, IL-1β и IL-10 [1]. Статистическая обработка – параметрические методы Стьюдента.

Основные результаты. У больных АР в фазу клинической ремиссии заболевания относительный и абсолютный уровень CD4 и CD8-позитивных лимфоцитов достоверно снижен в сравнении с данными показателями контрольной группы. При этом имеется общая тенденция к снижению хелперно-супрессорного

коэффициента. Сравнивая показатели В-клеточного звена в фазе ремиссии АР отмечалась тенденция к активации данного звена, что выражалось в тенденции к повышению относительных и абсолютных показателей уровня CD20 позитивных лимфоцитов, также было отмечено достоверно статистическое повышение IgA, IgE, тенденция к активации относительных и абсолютных показателей моноцитов, тенденция к повышению активности, интенсивности и фагоцитарного числа нейтрофилов в сравнении со здоровыми лицами. При этом отмечена тенденция к снижению NK-клеток, тенденция к снижению относительных и статистически достоверное понижение абсолютных показателей CD16, CD56 и CD95 позитивных лимфоцитов. Анализируя фагоцитарную функцию у больных АР, нужно отметить, что наши исследования показали достоверное повышение спонтанной и индуцирующей способности нейтрофилов в фазе клинической ремиссии заболевания.

Изучение популяционного спектра лимфоцитов тем же методом у больных БА легкой степени в фазе ремиссии выявило угнетение Т-клеточного звена, что проявилось достоверным снижением CD3 %, CD4 %, CD4/CD8 и тенденцией к снижению CD8 %, в сравнении с группой контроля. В фазе затухания воспалительного процесса у больных БА легкой степени были выявлены однонаправленные изменения показателей, отражающие нарушения гуморального иммунитета иммуноглобулинов в виде достоверного роста IgE.

В стадию ремиссии в отношении каскада комплемента мы не наблюдали значимых изменений. Анализируя показатели работы фагоцитарного звена, мы могли констатировать торпидность нейтрофилов и моноцитов. Остальные показатели претерпели незначительные изменения. Сравнительный анализ популяционного состава лимфоцитов на основе идентификации клеток с помощью моноклональных антител против маркерных антигенов поверхности лимфоцитов в группе больных персистирующего течения АР и БА легкой степени тяжести в фазе клинической ремиссии заболеваний, а также с группой практически здоровых лиц показал однотипные изменения. В фазе клинической ремиссии хронического воспалительного процесса отмечалось снижение активации иммунной системы, т.е. вялотекущий хронический процесс сопровождался недостаточным по интенсивности иммунным ответом. Это являлось, по-видимому, одной из причин хронизации процесса. Значения показателей иммунограмм в фазе ремиссии, которые до этого соответствовали картине активного воспаления, указывали на наличие иммуносупрессии в организме, но насколько выражена эта тенденция, только по анализу иммунограмм мы сказать не могли. Все эти процессы сопровождались структурной перестройкой как провоспалительного, так и антивоспалительного цитокинового каскада. Для определения этой тенденции вторым этапом данного исследования было выявление различий в цитокиновом каскаде у больных персистирующего течения АР и БА в фазе клинической ремиссии заболеваний. Особый акцент был поставлен на изучение состояния систем регуляции (цитокиновый профиль) в изучаемых группах в сравнении с группой условноздоровых лиц.

Данные процессы сопровождались функциональной перестройкой в системе цитокинов, о чем свидетельствовало восстановление высокого уровня IL-4, характерного для больных аллергическими заболеваниями, а также высокого уровня IL-1β, восстановлением концентраций IFN-γ и нормализацией продукции IL-10, как противовоспалительного цитокина. Именно представленный комплекс иммунных изменений, по-видимому, и формирует стабилизацию клинической картины у пациентов АР в период ремиссии и одновременно играет роль в формировании последующего обострения заболевания.

Сравнительный анализ показателей цитокинового статуса в супернатанте крови у больных легкой степени БА показал, что выработка спонтанной продукции IFN-γ имела однотипную тенденцию к повышению в сравнении с условноздоровыми. Изучая выработку спонтанной продукции провоспалительного цитокина IL-1β, мы не выявили изменения в сравнении с условноздоровыми.

Данный процесс характеризуется продукцией цитокиновой сети IgE-зависимых процессов, что особенно выражено в разности биосинтеза и секреции IL-4 и IL-10, поэтому особенно интересные результаты были получены при исследовании данных цитокинов. Исследование спонтанной продукции IL-4 показало трехкратное увеличение его в группе больных БА легкой степени тяжести, в сравне-

нии с условноздоровыми. В то же время было выявлено отсутствие изменений в спонтанной продукции IL10 в сравнении с нормой.

Исследования, изложенные выше, показали, что уже на ранних стадиях БА формируется хронический воспалительный процесс как проявление вторичной иммунодисфункции с изменениями всех звеньев иммунной системы.

Выводы. Подводя итог нашим исследованиям, мы пришли к следующему выводу: у больных АР и БА выявлены не только сходные этиопатогенетические факторы развития, но иммунологические сдвиги при АР, особенно по цитокиновому каскаду схожи с изменениями того же уровня при БА, что свидетельствовало об общем патологическом процессе только разной степени тяжести.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кетлинский С. А. Иммунология для врача / С. А. Кетлинский.– СПб.,1998.– 156 с.
2. Маянский А. Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинеготетразолия / А. Н. Маянский.– Казань, 1979.– 11 с.
3. Сибиряк С. В. Иммунофенотипирование лимфоцитов в клинической практике/ С. В. Сибиряк.– Уфа,1977.– 24 с.
4. Федосеев Г. Б., Трофимов В. И. Бронхиальная астма / Г. Б. Федосеев, В. И. Трофимов.– СПб., 2006.– 308 с.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF IMMUNOLOGICAL INDICES IN ALLERGIC RHINITIS AND BRONCHIAL ASTHMA IN REMISSION

Ryabova L. V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Studying 2 groups of patients suffering from allergic rhinitis of persistent character and patients with bronchial asthma of light character in the phase of clinical remission immune changes of similar type were received that was expressed in lowering of immune system activity which is likely to be one of the reasons for the chronicle character of the process. Particularly similar results were received in cytokine cascade that demonstrates the general pathological process of different degree of difficulty.

*Keywords: i*mmunology, allergology, pulmonology.

ДИНАМИКА УРОВНЯ IFN-α, IFN-γ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ СЛИЗИ ПРИ ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОК С ИНВАЗИВНЫМИ ФОРМАМИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Батурина И. Л., Орнер И. Ю., Абрамовских О. С., Зотова М. А., Никушкина К. В., Мезенцева Е. А. Логинова Ю. В., Никонова Т. И., Емельянов И. В.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет Минздрава РФ, Челябинск, Россия

Заболеваемость раком шейки матки (РШМ) продолжает занимать лидирующее место среди онкологической заболеваемости у женщин и продолжает неуклонно расти. Проведено изучение уровня IFN-α, IFN-γ цервикальной слизи в динамике у пациенток с инвазивными формами рака шейки матки. Установлено, что определение интерферонового профиля цервикальной слизи является перспективным направлением в клинико-лабораторной диагностике (РШМ) и может использоваться для оценки динамики опухолевого процесса и эффективности применяемых специальных методов лечения.

Ключевые слова: Рак шейки матки, цервикальная слизь, IFN-α, IFN-γ.

За последние десятилетия РШМ "помолодел" и разработка подходов к органосохраняющему лечению с сохранением репродуктивной функции требует надежных методов мониторинга и оценки эффекивности проводимой противоопухолевой терапии. Доля запущенных случаев, среди первично выявленных случаев, остается высокой, составляя более трети (37,9 %) и не имеет тенденции к снижению [1, 2, 3].

Известно, что существующие прогностические факторы имеют низкую специфичность в плане выбора тактики ведения опухолевого заболевания как до лечения, так и в процессе проведения противоопухолевой терапии. Современные исследования доказали, что основными регуляторами молекулярного механизма взаимодействия опухоли и иммунной системы являются цитокины. Особое значение в генезе вирусиндуцированных опухолей придается системе интерферонов – IFN-α и IFN-γ [4, 5].

Цель исследования: изучение уровней IFN-α и IFN-γ цервикальной слизи, у пациенток с местнораспространенными (инвазивными) формами рака шейки матки (МРШМ), до лечения, через 6 и 12 месяцев после лечения.

Материалы и методы. Для осуществления поставленной цели в НИИ иммунологии и на кафедре онкологии Челябинской государственной медицинской академии и Челябинском окружном клиническом онкологическом диспансере (ЧОКОД) г. Челябинска за период 2009-2014 г. проведено комплексное обследование 80 пациенток с МРШМ – IIb, IIIa, IIIb стадии (T2N0M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) в возрасте от 20 до 49 лет. Диагноз МРШМ, был выставлен врачами-онкогинекологами ЧОКОД на основании клинических, гистологических и инструментальных методов исследования. Всем пациенткам был проведен одинаковый курс химио-лучевого лечения, который включал 2 курса неоадьювантной полихимиотерапии (НАПХТ) и лучевую терапию (дистанционная гамма терапия (ДГТ) и внутриполостная гамма терапия (ВПГТ)). Для решения поставленных задач все пациентки с МРШМ ретроспективно, через 12 месяцев после окончания специального лечения, были разделены на 2 группы больных: группа А (n=40) с положительной и группа В (n=40) с отрицательной динамикой течения заболевания. В каждой группе больных анализ уровня концентрации цитокинов цервикальной слизи проводился 3-х кратно через условные временные периоды – до лечения (А1, В1), через 6 (А2, В2) и 12 месяцев (А3, В3) после окончания специального лечения. Уровень интерферонов цервикальной слизи – IFN-α, IFN-γ определяли методом твердофазного ИФА на аппарате «Adaltis Italia», (WBProc., Personal LAB, Италия). Полученные результаты исследований были подвергнуты статистической обработке с использованием пакета прикладных программ "Statistica for Windows 6.0"

Результаты и обсуждение. При изучении уровня интерферонов цервикальной слизи в динамике у женщин МРШМ с положительным терапевтическим эффектом отмечалось снижение IFN-α и повышение IFN-γ как через 6, так и через 12 месяцев после окончания специального лечения. Тогда как в группе женщин МРШМ с отрицательным терапевтическим эффектом регистрировалось прогрессирующее снижение IFN-γ как через 6, так и через 12 месяцев после лечения. А повышенный через 6 месяцев уровень IFN-α, через 12 месяцев не претерпевал существенных изменений. Примечательно, что уровень IFN-α и IFN-γ был достоверно выше у пациенток с отрицательной динамикой заболевания, до лечения, по сравнению с группой женщин с положительным терапевтическим эффектом от лечения. Известно, что одними из клеток продуцентов IFN-γ и IFN-α являются эпителиальные клетки слизистой шейки матки. Мы предположили, что при их неопластической трансформации, возможно, с одной стороны, начинают синтезироваться «мутантные формы» IFN-α и IFN-γ, а с другой стороны, нарушение рецепторного аппарата трансформированных клеток экспрессирующих рецепторы к данным цитокинам делает их не чувствительными к действию изучаемых лимфокинов и приводит к тому, что по механизму обратной связи происходит увеличение концентрации IFN-α и IFN-γ в цервикальной слизи. Таким образом, при повышенной концентрации IFN-α и IFN-γ цервикальной слизи, исследуемые цитокины не выполняют своей биологической функции. Установленный факт согласуется с данными мировой литературы о том, что повышенная концентрация интерферонов у пациенток с онкопатологией женской половой сферы, является плохим прогностическим фактором указывающим на прогрессию неопластического процесса [2, 3, 4].

Выводы.

1. Повышенный уровень IFN-α и IFN-γ цервикальной слизи у пациенток с МРШМ на этапе до лечения свидетельствует о неблагоприятном прогнозе течения неопластического процесса и требует более агрессивной тактики противоопухолевого лечения.

2. Оценить эффективность проведенной терапии у пациенток с МРШМ, можно уже через 6 месяцев после лечения на основании повышения уровня IFN-α и IFN-γ цервикальной слизи, что может свидетельствовать о прогрессировании неопластического процесса и неэффективности применяемой противоопухолевой терапии.

Таким образом, изучение интерферонового профиля цервикальной слизи является перспективным направлением в клинико-лабораторной диагностике рака шейки матки и может использоваться для оценки динамики опухолевого процесса и эффективности применяемых специальных методов лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евстигнеева Л. А., Бахидзе Е. В., Семиглазов В. В. Иммунологический статус у больных карциномой *in situ* и инвазивным раком шейки матки. / Л. А. Евстигнеева, Е. В. Бахидзе, В. В. Семиглазов // Материалы V съезда онкологов и радиологов СНГ (Ташкент, 14-16 мая 2008 г.).– Ташкент, 2008 – С. 93.
2. Мальцева В. Н. Респираторный взрыв и особенности его регуляции в периферических нейтрофилах при росте опухоли *in vivo*: дис. … канд. биол. наук / В. Н. Мальцева.– Пущино, 2007.– 138 с.
3. Русскова А. Н. Новые сведения об иммуносупрессии / А. Н. Русскова // Междунар. журн. эксперим. образования.– 2010.– № 8.– С. 47-49.
4. SCC antigen in cervical cancer / G. Borras, R. Molina, J. Xercavins et al. // Eur. Gynaecol. Oncol.– 1999.– V.13, № 5.– P. 414-418.
5. A combination of serum tumor markers identifies high risk patients with early-stage squamous cervical cancer / E. M. Davelaar, J. van de Lande, S. von Mensdorff-Pouilly et al. // Tumour. Biol.– 2008.– V.29, № 1.– P. 9-17.

DYNAMIC LEVEL OF IFN-α, IFN-γ CERVICAL MUCUS IN EVALUATING THE EFFICACY OF ANTICANCER THERAPY IN PATIENTS WITH INVASIVE CERVICAL CANCER FORMS

Baturina I. L., Orner I. J., Abramovskikh O. S., Zotova M. A., Nikushkina K. V., Mezentseva E. A., Loginova Y. V., Nikonova T. I., Emelyanov A. T.

Medical University of South Ural of the Ministry of Health, Chelyabinsk, Russia

The incidence of cervical cancer (CC) continues to occupy a leading position among the cancer incidence among women and continues to grow steadily. The study of the level of IFN-α, IFN-γ in the dynamics of the cervical mucus in patients with invasive cervical cancer forms. It has been established that the definition of interferon profile cervical mucus is a promising direction in the clinical and laboratory diagnosis (cervical cancer) and can be used to assess the dynamics of the tumor process and the effectiveness of specific therapies used.

Keywords: cervical cancer, cervical mucus, IFN-α, IFN-γ.

РОЛЬ ПСИХОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Смык А. В., Маркова Е. В., Непомнящих В. М., Дёмина Д. В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Бронхиальная астма является классическим примером многофакторно обусловленной болезни, основу которой составляют иммунологические нарушения. Кроме того, указанная патология представляет собой классический пример психосоматического заболевания, в основе которого лежат как физиологические, так и психологические причины, в том числе, психоэмоциональный стресс и личностные особенности пациента, в частности, алекситимия. Так как алекситимия характеризуется неспособностью к идентификации и вербализации собственных чувств, она существенно осложняет процесс вербальной психотерапии, в ряде случаев делая его невозможным. Нами было установлено, что невербальная, телесно-ориентированная психокоррекционная работа с пациентами снижает степень выраженности алекситимии и обеспечивает нормализацию некоторых параметров Т-клеточного звена иммунной системы.

Ключевые слова: бронхиальная астма, алекситимия, психокоррекция.

Введение. Бронхиальная астма (БА) представляет собой глобальную проблему здравоохранения – в мире живёт около 300 млн. больных с данным заболеванием. В России, по разным данным [1], распространённость астмы среди взрослого населения колеблется от 2,2 до 5-7 %, а в детской популяции этот показатель составляет около 10 %. Заболевание может возникнуть в любом возрасте; примерно у половины больных бронхиальная астма развивается до 10 лет, ещё у трети – до 40 лет. Среди детей, больных бронхиальной астмой, мальчиков в два раза больше, чем девочек. К 30-летнему возрасту соотношение полов выравнивается [2].

Бронхиальная астма относится к классическим психосоматическим заболеваниям [3, 4]. В патогенезе таких болезней, как известно, особенно большую роль играют факторы психологического порядка, что подтверждается, в частности, данными о возникновении и провоцировании приступов бронхиальной астмы при эмоциональной нагрузке и психологическом стрессе [1, 2]. Указанные факторы являются одним из компонентов сложного патогенетического механизма, которым определяется развитие бронхиальной астмы.

В настоящее время внимание исследователей [3, 4] привлечено к так называемому алекситимическому радикалу в структуре преморбидной личности, как одному из возможных психологических факторов риска психосоматических расстройств. Алекситимия также рассматривается [4] как следствие недостаточной связи левого (сознательного, речевого, малоэмоционального) и правого (подсознательного, невербального, эмоционального) полушарий. Так как алекситимия характеризуется неспособностью к идентификации и вербализации собственных чувств, можно предположить, что для алекситимичных пациентов традиционные формы психокоррекции будут мало эффективными и нужны принципиально иные подходы, подготавливающие алекситимика к вербальным способам терапевтического взаимодействия. Определённый терапевтический эффект у данной категории больных может быть достигнут с привлечением невербальных, телесно-ориентированных методов психокоррекции [4].

Цель исследования: определение особенностей воздействия методов телесно-ориентированной психокоррекции на психофизиологические и иммунологические параметры пациентов с БА.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе аллергологического отделения Клиники иммунопатологии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии». Нами был обследован 141 пациент, в том числе 62 мужчины и 79 женщин, сопоставимых по возрасту, вариантам БА и степени тяжести заболевания. Пациенты были разделены на две группы. С пациентами первой группы проводилась телесно-ориентированная психокоррекция (ТОП) по разработанной нами схеме, направленная на снижение уровня алекситимии. Пациентам второй группы (контрольной) назначалось обследование и медикаментозное лечение по аналогичной схеме, за исключением курса ТОП. Оценка эффективности лечения проводилась в конце стационарного курса (на 18-20 сутки). Клиническая оценка лечения осуществлялась врачом – аллергологом. При обследовании пациентов применялся комплекс экспериментально-психологических (оценка уровня алекситимии; оценка уровня контроля бронхиальной астмы) и иммунологических методов (определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и фагоцитоза латексных частиц моноцитами и нейтрофилами методом проточной цитофлюорометрии).

Результаты. После проведённого лечения, как медикаментозного, так и с присоединением ТОП, все пациенты были выписаны в состоянии клинической ремиссии. Нами было установлено снижение уровня алекситимии (согласно Торонтской алекситимической шкале) до нормативных показателей и достоверное улучшение функции внешнего дыхания (увеличение абсолютных и относительных показателей объёма форсированного выдоха за первую секунду) у пациентов, которым медикаментозная терапия была дополнена психокоррекционным воздействием, по сравнению с контрольной группой пациентов, где проводилась только медикаментозная терапия.

Анализ механизмов взаимных влияний психической сферы и функций иммунной системы чрезвычайно сложен, впрочем, как и анализ любых психосоматических и соматопсихических влияний. По нашему мнению, уменьшение степени выраженности алекситимии у пациентов, которым был проведен курс ТОП, может быть связано с улучшением показателей Т-клеточного звена иммунной системы, поскольку имеются данные о негативном влиянии алекситимии на содержание $CD4^+$ и $CD16^+$ клеток; при этом предполагается также, что алекситимия может быть причиной нарушения Th1/Th2 баланса в сторону доминирования Th2 фенотипа за счёт снижения клеточно-опосредованного иммунного Th1 ответа [5].

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о позитивном влиянии ТОП у больных БА на течение патологического процесса, которое проявляется не только в снижении степени выраженности алекситимии, как патогенетического фактора БА, на который и было направлено указанное воздействие; но также и в повышении показателей функции внешнего дыхания, что, с одной стороны еще раз подтверждает существенную роль алекситимии в патогенезе БА.

Заключение. Таким образом, представленные нами результаты свидетельствуют о том, что телесно-ориентированное психокоррекционное воздействие играет существенную роль в лечении БА, повышая эффективность стандартных методов терапии, способствуя более адекватному поведению больных вне стационара и улучшая качество их жизни. Вышеизложенное свидетельствует о позитивном влиянии указанного воздействия у больных БА на течение патологического процесса, что является обоснованием включения его в комплексную терапию данного заболевания и целесообразности дифференцированного подхода к терапии пациентов, страдающих БА, с учетом индивидуальных особенностей функционирования их нервной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / Под ред. Чучалина А. Г.– М.: Издательский дом «Атмосфера», 2007.– 104 с.
2. Чучалин А. Г. Бронхиальная астма / А. Г. Чучалин.– М.: Рус. врач, 2001.– 143 с.
3. Александер Ф. Психосоматическая медицина / Ф. Александер.– М.: Институт общегуманитарных исследований, 2009.– 320 с.
4. Малкина-Пых И. Г. Психосоматика / И. Г. Малкина-Пых.– М.: Эксмо, 2009.– 1024 с.
5. Guilbaud O., Corcos M., Hjalmarsson, L. Is there a psychoneuroimmunological pathway between alexithymia and immunity? Immune and psysiological correlates of alexithymia / O. Guilbaud, M. Corcos, L. Hjalmarsson // Biomed. Pharmacother.– 2003.– V.57 (7).– P. 292-295.

THE ROLE OF PSYCHOLOGICAL CORRECTION IN COMPLEX TREATMENT OF ASTHMA

Smyk A. V., Markova E. V., Nepomnyashchikh V. M., Demina D. V.

Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology», Novosibirsk, Russia

Asthma is a classic example of multifactorial disease, which is based on immunological disorders. In addition, this pathology is the classic example of a psychosomatic disease, which is based in psychophysiological and psychological disorders, including psycho-emotional stress and personality features of the patient, in particular, alexithymia. Since alexithymia is characterized by an inability to identify and verbalize their feelings, it significantly complicates the process of verbal psychotherapy, in some cases, making it impossible. It is shown that non-verbal, body-oriented psychological correction with patients reduces the severity of alexithymia and provides the normalization of some parameters of T-cell immunity.

Keywords: asthma, alexithymia, psychological correction.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ МИКРОБНОЙ ЭКЗЕМЫ

Лысенко О. В., Лукьянчикова Л. В.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Челябинск, Россия

Цель работы: Выявить у больных микробной экземой наиболее значимые изменения иммунитета и на их основе разработать диагностические и дифференциально-диагностические критерии заболевания. Проведено одноцентровое проспективное исследование с привлечением 139 больных микробной экземой и 50 больных инфицированной истинной экземой. Для разработки диагностических и дифференциально-диагностических критериев микробной экземы были использованы многомерные методы статистического исследования (факторный анализ, ROC-анализ). Диагностическими критериями микробной экземы являются процентное соотношение CD25, CD95, CD16, CD45RA лимфоцитов, концентрация IgA и IL-2. Дифференциально-диагностическим критерием между микробной и инфицированной истинной экземой определено процентное соотношение CD25 лимфоцитов.

Ключевые слова: микробная экзема, инфицированная истинная экзема.

Экзема – острое или хроническое рецидивирующее аллергическое заболевание кожи, формирующееся под влиянием экзогенных и эндогенных триггерных факторов и характеризующееся появлением полиморфной сыпи, острой воспалительной реакцией, обусловленной серозным воспалением кожи, и сильным зудом [1]. Актуальность проблемы экземы определяется хроническим течением трудно поддающегося терапии дерматоза с частыми рецидивами. В последние годы отмечается рост заболеваемости экземой у лиц молодого возраста, увеличение удельного веса тяжелых и резистентных к традиционной терапии форм, нередко приводящих к инвалидизации и нарушающих социальный статус и общественную адаптацию больных [2, 3]. По данным разных авторов, одной из самых распространенных форм данного дерматоза является экзема микробная, занимающая второе место после истинной. В последние десятилетия, изучение роли дисбаланса иммунной системы в разви-

тии экзематозного процесса, является одним из приоритетных направлений, позволивших сформулировать новые концепции патогенеза экземы и во многом определивших спектр, применяемых терапевтических мероприятий. На современном этапе вопросы диагностики иммунопатологических состояний при микробной экземе продолжают изучаться [4].

Цель работы. Выявить у больных микробной экземой наиболее значимые изменения иммунитета и на их основе разработать диагностические и дифференциально-диагностические критерии заболевания.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели в 2009-2013 г. проведено одноцентровое проспективное исследование с привлечением 100 больных микробной экземой (39 мужчин и 61 женщины). Группу сравнения в данном исследовании составили 50 больных инфицированной истинной экземой (27 мужчин и 23 женщины). Контролем явились 30 условно-здоровых лиц. Определение количества популяций и субпопуляций лимфоцитов в периферической крови производилось путем индентификации CD-молекул, экспрессированных на мембране клеток, методом непрямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами ИКО.

С помощью иммуноферментного анализа с тест-системами производства ВЕКТОР БЕСТ (г. Новосибирск) проводилась оценка концентрации в сыворотке крови иммуноглобулинов классов А, М, G. Уровень общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови вычисляли методом твёрдофазного иммуноферментного анализа. Содержание IL-2 оценивали методом иммуноферментного анализа в микропланшетном формате с регистрацией результатов на ридере «Multiscan Plus» фирмы «Labsystems» (Финляндия) с применением реактивов фирмы ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург). Статистический анализ данных проводили с помощью пакетов прикладных программ MicrosoftExcel 2007 и STATISTICA 6.0 (forWindows; «StatSoft, Inc.», 2001), а также многомерных методов статистического исследования (факторный анализ, ROC-анализ).

Результаты и обсуждение. Наиболее существенные отклонения показателей иммунитета у больных микробной экземой выявлены со стороны популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов (достоверно высокий уровень CD4, CD45RA, соотношения CD4/CD8, низкие показатели CD16, CD95, CD25), гуморального звена иммунитета (заниженный уровень Ig A, Ig M, повышенное содержание Ig G) и цитокинового профиля (достоверное увеличение концентрации ИЛ-2).

На основе выявленных девиаций иммунной системы больных экземой нами были разработаны диагностические и дифференциально-диагностические критерии микробной экземы с использованием многомерных методов статистической обработки материала. Для этого мы применили методику факторного анализа. В результате проведения анализа, иммунологическими диагностическими критериями микробной экземы были приняты показатели, имеющие наиболее высокую степень факторной нагрузки:

- Процентное соотношение CD25 лимфоцитов 9,78 % и менее
- Процентное соотношение CD95 лимфоцитов 4,86 % и менее
- Процентное соотношение CD16 лимфоцитов 17,76 % и менее
- Процентное соотношение CD45RA лимфоцитов 32,52 % и более
- Уровень IgA 0,93 г/л и менее
- Уровень IL-2 4,57 пг/мл и более

Далее, для определения возможности разделения пациентов на группы с микробной и инфицированной истинной экземой на основании иммунологических данных, мы провели ROC анализ, в результате которого дифференциально-диагностическим критерием между микробной и инфицированной истинной экземой явился единственный показатель, имеющий высокую степень чувствительности (99,0 %) и специфичности (90,0 %) – процентное соотношение CD25 лимфоцитов.

Соотношение процентное	Микробная экзема	Инфицированная истинная экзема
CD 25	9,78 % и менее	17,48 % и более

Выводы:

1. Диагностическими критериями микробной экземы являются процентное соотношение CD25, CD95, CD16, CD45RA лимфоцитов, концентрация IgA и IL-2;

2. Дифференциально-диагностическим критерием между микробной и инфицированной истинной экземой определено процентное соотношение CD25

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Охлопков В. А., Правдина О. В., Зубарева Е. Ю. Федеральные рекомендации по ведению больных экземой / В. А. Охлопков, О. В. Правдина, Е. Ю. Зубарева.– М., 2013.– 18 с.
2. Лысенко О. В., Зиганшин О. Р., Лукьянчикова Л. В. Иммунологические критерии в диагностике инфекционной экземы / О. В. Лысенко, О. Р. Зиганшин, Л. В. Лукьянчикова // Клин. дерматология и венерология.–2015.– Т. 14, № 6.– С. 50-55.
3. Лысенко О. В. Особенности популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов у больных инфекционной экземой / О. В. Лысенко // Российский иммунологический журнал.–2014.– Т8, № 3(17).– С. 556-559.
4. Лукьянчикова Л. В., Лысенко О. В. Особенности гуморального звена иммунитета и цитокинового профиля у больных инфекционной экземой / Л. В. Лукьянчикова, О. В. Лысенко // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т9, № 2 (1).– С. 78-80.

IMMUNOLOGICAL DIAGNOSTIC CRITERIA MICROBIAL ECZEMA

Lysenko O. V., Lukyanchikova L. V.

Medical University of South Ural of the Ministry of Health, Chelyabinsk, Russia

To identify in patients with microbial eczema the most significant changes in the immune system and on their basis to develop diagnostic and differential diagnostic criteria of the disease. Conducted a single centre prospective study involving 139 patients with microbial eczema and infected 50 patients with true eczema. The development of diagnostic and differential-diagnostic criteria of microbial eczema were used multidimensional statistical research methods (factor analysis, ROC-analysis). Diagnostic criteria microbial eczema are the percentage of CD25, CD95, CD16, CD45RA lymphocytes, the concentration of IgA and IL-2. Differential diagnostic criterion between microbial and true eczema infected determined the percentage of lymphocytes CD25.

Keywords: microbial eczema, infected eczema true.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА ДЕТЕЙ ПРИ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА И ЭПШТЕЙН-БАРР-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Желтова А. А., Белан Э. Б., Садчикова Т. Л., Тибирькова Е. В., Доценко А. М., Панина А. А.

ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Волгоград, Россия

Целью данного исследования было оценить особенности иммунологического статуса у детей трех лет с ринитом различной этиологии. Дети были разделены на три группы: группа AV – дети, серопозитивные по ВЭБ, у которых был диагностирован АР и определена ДНК вируса, группа V – дети, серопозитивные по ВЭБ, и группа А – дети с АР, у которых обнаружена ДНК ВЭБ и антитела к нему. У детей с АР, ассоциированном с ВЭБ-инфекцией, наблюдаются изменения в показателях иммунологического статуса.

Ключевые слова: ринит, аллергический ринит, вирус Эпштейн-Барр.

Хронические заболевания верхних дыхательных путей остаются одной из актуальных проблем педиатрии. Этиологические факторы хронического ринита разнообразны, поэтому более точное понимание патогенетических механизмов развития может способствовать

оптимизации диагностики и повышению эффективности лечения. Вне зависимости от этиологии хроническое воспаление верхних дыхательных путей ассоциируется с повышенным риском развития бронхиальной астмы [1].

Одной из частых причин инфекционного поражения верхних дыхательных путей у детей является вирус Эпштейн-Барр (*Herpesviridae*: *Gammaherpervirinae*; ВЭБ) [2]. Существующие данные о взаимном влиянии двух иммунопатологических процессов – аллергического ринита и ВЭБ-индуцированной иммунопатологии – противоречивы [3, 4]. В то же время показано, что у детей в возрасте до двух лет (но не в более старшем возрасте) ВЭБ проявляет протективное действие по отношению к атопическим заболеваниям [3-5]. В этой связи представляет интерес изучение иммунопатогенетических механизмов у детей не только с моно-, но и сочетанной ВЭБ-индуцированной и атопической патологией.

Цель: оценить иммунный статус у детей трех лет с сочетанием аллергического ринита (АР) и ВЭБ-инфекцией (ВЭБ).

Материалы и методы. В исследование было включено 70 детей в возрасте 3 лет с клиническими симптомами хронического ринита, обратившихся за консультацией врача аллерголога-иммунолога в ГУЗ «Консультативно-диагностическая поликлиника № 2» г. Волгограда. В исследование не включались пациенты, имевшие другую патологию дыхательных путей и ЛОР-органов, острые и хронические воспалительные заболевания другой локализации или получавшие иммунотропные лекарственные препараты.

Всем детям выполнено обследование в следующем объеме: общий анализ крови; определение общего и относительного количества $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$-клеток, сывороточные уровни IgA, IgM, IgG, IgE и содержание IgM и IgG к ВЭБ, ДНК вирусов герпеса 1, 2, 4, 5, 6 типов, аденовирусов в материале из зева и носа; бактериологическое исследование; иммунологическое обследование; кожные скарификационные пробы с бытовыми, эпидермальными и пищевыми аллергенами.

Основную группу составили 30 серопозитивных по ВЭБ детей, у которых был диагностирован аллергический ринит и определена ДНК вируса на момент обследования (группа AV). Группы сравнения составили 20 детей, серопозитивных по ВЭБ (группа V); 20 детей, у которых диагностирован аллергический ринит, но ДНК ВЭБ и антитела к нему на момент обследования не были выявлены (группа А). Данные представлены в виде M±σ или медианы с указанием интерквартильного размаха.

Результаты и их обсуждение. Анализ субпопуляций лейкоцитов показал, что относительное количество нейтрофилов во всех группах не отличалось, однако, абсолютное количество нейтрофилов в группе AV ($2,67±0,42×10^9$/л) было ниже, чем в группе V ($2,99±1,40×10^9$/л, p=0,034). В то же время абсолютное и относительное количество эозинофилов в группе V ($0,25±0,09×10^9$/л; 3,01±1,2 %) по сравнению с группой А ($0,43±0,09×10^9$/л, p=0,048; 5,26±3,2 %, p=0,018) было гораздо ниже. В группе AV количество эозинофилов составило ($0,30±0,20×10^9$/л; 4,03±2,5 %). Абсолютное количество лимфоцитов в группе V ($4,28±0,48×10^9$/л) было выше, чем в группе А ($3,08±0,60×10^9$/л, p=0,012).), а относительное количество лимфоцитов не имело достоверных различий между всеми группами. У детей, серонегативных по ВЭБ, обнаружено более высокое содержание $CD4^+$-клеток (1568±170 кл/мкл), чем в группах AV (1087±232 кл/мкл, p=0,045) и V (1116±223 кл/мкл, p=0,039). Статистически значимых отличий в содержании $CD3^+$, $CD8^+$, $CD16^+$-клеток, абсолютных количествах лейкоцитов, абсолютном и относительном содержании моноцитов и базофилов между группами не наблюдалось.

Ряд изменений был обнаружен и со стороны гуморального звена. В группе А наблюдалось более высокое содержание IgE (105,0 [9;993] мЕ/мл) по сравнению с группой V (15,0 [4,11;105] мЕ/мл, p=0,001). В группе AV содержание IgE составило 67,0 [1;212] мЕ/мл. Различий в сывороточном уровне IgM в исследуемых группах не отличалось. Содержание IgA и IgG в группе А составило 1,41±0,36 г/л и 9,42±0,45 г/л, что было статистически значимо выше, чем в группах V (IgA: 0,59±0,22 г/л, p=0,044; IgG: 7,08±0,7 г/л, p=0,016) и AV (IgA: 0,56±0,3 г/л, p=0,026; IgG: 6,24±0,6 г/л, p=0,003).

Анализ полученных данных ставит перед вопросом, требующим дальнейшего изучения, являются выявленные различия результатом интерференции Th1- и Th2-путей иммунного ответа при сочетании вирусной инфекции и IgE-зависимой патологии, или же ведущим является нарушение синтеза иммуноглобули-

нов В-лимфоцитами в результате поражения лимфотропным ВЭБ.

Выводы. ВЭБ-инфекция у детей с аллергическим ринитом ассоциируется с более низким количеством $CD4^+$-лимфоцитов, IgA, IgG и IgE по сравнению с атопической монопатологией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прогнозирование риска развития неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей / А. А. Сависько, М. М. Батюшин, А. А. Лебеденко и др. // Фундаментальные исследования.– 2011.– № 6.– С. 154-157.
2. Некоторые этиопатогенетические аспекты рецидивирующего ринофарингита у детей в практике врача аллерголога-иммунолога / Т. Л. Садчикова, Э. Б. Белан, М. В. Гутов и др. // Российский аллергологический журнал.– 2012.– № 2.– С. 173-174.
3. Epstein-Barr virus infection in childhood may precipitate atopic diseases / R. Okudaira, T. Mukoyama, N. Suzuki et al. // Allergology International.– 2005.– V. 54, № 3.– P. 483-490.
4. Chronic virus infections supress atopy but not asthma in a set of children from a large latin american city: a cross-section study / R. V. Veiga, S. S. Cunha, V.C.C. Dattoli et al. // BMC Pulmonary Medicine.– 2011.– V. 11.– P. 24.
5. Does early EBV infection protect against IgE sensitization? / C. Nilsson, A. Linde, S. M. Montgomery et al. // Journal of Allergy and Clinical Immunology.– 2005.– V. 116, № 2.– P. 438-444.

FEATURES OF THE IMMUNE STATUS IN CHILDREN WITH EPSTEIN-BARR VIRUS-ASSOCIATED ALLERGIC RHINITIS

Zheltova A. A., Belan E. B., Sadchikova T. L., Tibirkova E. V., Dotsenko A. M., Panina A. A.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

The aim of this study was to evaluate the immunological status in children three years of age with rhinitis of different etiology. The children were divided into three groups: group AV – EBV-positive children have been diagnosed with allergic rhinitis and defined the DNA of the virus; group V – EBV-positive children; group A – children with allergic rhinitis in whom EBV-DNA and antibodies to it were not identified. There are changes of the immune status in children with EBV-associated allergic rhinitis.

Keywords: rhinitis, allergic rhinitis, Epstein-Barr virus.

Т-ХЕЛПЕРЫ-1 И Т-ХЕЛПЕРЫ-17 У ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАНИЕМ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Кологривова И. В., Суслова Т. Е., Кошельская О. А., Винницкая И. В.

НИИ кардиологии, Томск, Россия

Проведена оценка содержания и фенотипических особенностей Th1-, Th17-, $FoxP3^+$ Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов с сахарным диабетом (СД) 2-го типа в зависимости от наличия ишемической болезни сердца (ИБС). Было показано, что при сочетании СД 2-го типа и ИБС количество Th1-лимфоцитов возрастает, в то время как содержание Th17-лимфоцитов и клеток, позитивных по экспрессии рецептора к интрелейкину-23, снижается.

Ключевые слова: Т-хелперы-1, Т-хелперы-17, сахарный диабет 2-го типа, ишемическая болезнь сердца.

Наличие сахарного диабета (СД) 2-го типа значительно увеличивает риск развития атеросклероза [1]. Было показано, что иммунная дисрегуляция играет важную роль в патогенезе как СД 2-го типа, так и ишемической болезни сердца (ИБС), однако механизмы, лежащие

в основе данной взаимосвязи, остаются изученными недостаточно [1, 2].

Было обследовано 20 пациентов с СД 2-го типа (8 мужчин; 12 женщин; средний возраст: 58,2±1,4 лет) и 8 пациентов с сочетанием СД 2-го типа и ИБС (4 мужчины; 4 женщины; средний возраст 57,7±1,4 лет).

Методом проточной цитометрии (проточный цитометр FACSCalibur, BD, США) оценивали количество FoxP3$^+$ Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), а также количество Т-хелперов-1 (Th1), Т-хелперов-17 (Th17), клеток, несущих рецептор к интерлейкину-23 (IL-23R$^+$) в интактной культуре мононуклеаров и культуре, активированной форбол-миристат-ацетатом (PMA) и иономицином (моноклональные антитела анти-FoxP3-PE, анти-CD4-FITC, анти-CD25-APC, анти-IFN-γ-FITC, анти-CD4-PECy5 – BD, США; анти-IL-17-PE, анти-IL23R-APC – R&D, США; субстанции – Sigma Aldrich, США). В сыворотке крови определяли концентрацию инсулина, глюкозы, липидных фракций (общий холестерин, холестерин липопротеинов высокой и низкой плотности, триглицериды). Рассчитывали индекс инсулинорезистентности HOMA (homeostatic model assessment) с помощью формулы HOMA= $G_0 \times I_0$ /22,5; где G_0 – концентрация глюкозы в сыворотке натощак (мМ); I_0 – концентрация инсулина в сыворотке натощак (мкМЕ/мл).

По результатам нашего исследования для пациентов с сочетанием СД 2-го типа и ИБС было характерно увеличение содержания Th1 в интактной культуре мононуклеаров (p=0,038) и снижение содержания Th17 как в интактной (p=0,033), так и в митоген-активированной культуре (p=0,049) по сравнению с пациентами с СД 2-го типа без ИБС. Известно, что функциональная активность Th17-лимфоцитов в большой степени зависит от сигнального пути, опосредуемого IL-23 [3]. Мы выявили, что число лимфоцитов, несущих IL-23R, было снижено у пациентов с сочетанием СД 2-го типа и ИБС как при активации, так и в отсутствии активации мононуклеаров (p=0,010 и в том, и в другом случае в сравнении с соответствующими показателями в группе пациентов с СД 2-го типа). Число FoxP3$^+$ Treg не различалось в исследуемых группах пациентов.

По результатам корреляционного анализа у пациентов с СД 2-го типа без ИБС количество IL-23R$^+$ лимфоцитов в интактной культуре мононуклеаров было прямо связано с количеством Th17 (r=0,830; p<0,001), в то время как у пациентов с сочетанием ИБС и СД 2-го типа количество IL-23R$^+$ клеток положительно коррелировало с содержанием Th1 (r=0,657; p=0,020). В отношении содержания FoxP3 Treg, призванных контролировать силу иммунного ответа, была выявлена противоположная закономерность: у пациентов без ИБС количество FoxP3$^+$ Treg отрицательно коррелировало с содержанием Th1 в интактной культуре мононуклеаров (r= –0,671; p<0,001); у пациентов с сочетанием СД 2-го типа и ИБС выявлена отрицательная взаимосвязь между содержанием FoxP3$^+$ Treg и Th17 в интактной культуре (r= –0,642; p=0,013).

Вероятно, выявленные закономерности свидетельствуют об активации различных направлений иммунных ответов у пациентов с СД 2-го типа в зависимости от наличия ИБС: в отсутствии сопутствующей кардиоваскулярной патологии отмечается повышение функциональной активности Th17, а при сочетании СД 2-го типа+ИБС преимущественным направлением дифференцировки Т-лимфоцитов становится Th1-путь иммунного ответа.

Пациенты в исследуемых группах не различались по продолжительности заболевания сахарным диабетом (p=0,648) и степени ожирения, оцениваемой как по индексу массы тела (p=0,076), так и по окружности талии (p=0,738). Однако для пациентов с сочетанием СД 2-го типа и ИБС было характерно более выраженное нарушение со стороны метаболических показателей: были увеличены индекс инсулинорезистентности HOMA (p=0,007) и концентрация триглицеридов в сыворотке крови (p=0,005).

Таким образом, мы установили, что при ассоциации ИБС и СД 2-го типа для пациентов характерны определенные особенности иммунорегуляторного дисбаланса: возрастает количество Th1-лимфоцитов и снижается содержание Th17-лимфоцитов. Это может быть взаимосвязано со снижением рецепторов к IL-23 на лимфоцитах. Известно, что Th17-лимфоциты играют важную роль в развитии иммунного ответа на ранних этапах заболевания [4]. Возможно, на этапе присоединения ИБС к нарушениям углеводного обмена начальная активация Th17 сменяется увеличением содержания Th1-лимфоцитов. Кроме того, не исключено что различные направления иммунных ответов в исследуемых группах могут быть обусловлены более выраженными метаболическими нарушениями, характерными для пациентов с ИБС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donath M.Y., Shoelson S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease / M.Y. Donath, S.E. Shoelson // Nature Reviews Immunology.– 2011.– V. 11.– P. 98-107.
2. Woollard K.J. Immunological aspects of atherosclerosis / K.J. Woollard // Clin. Sci. (Lond).– 2013.– V. 125 (5).– P. 221-235.
3. A critical function for transforming growth factor beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human Th-17 responses / E. Volpe, N. Servant, R. Zollinger et al. // Nature Immunology.– 2008.– V. 9.– P. 650-657.
4. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis / J. Leipe, M. Grunke, C. Dechant et al. // Arthritis and Rheumatism.– 2010.– V. 62 (10).– P. 2876-2885.

TH1- AND TH17-LYMPHOCYTES IN PATINETS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2 ASSOCIATED WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshelskaya O.A., Vinnizkaya I.V.

RI Cardiology, Tomsk, Russia

Numbers and phenotypic characteristics of Th1-, Th17-, FoxP3$^+$ T-regulatory lymphocytes in patients with diabetes mellitus type 2 (DM2) depending on the presence of the ischemic heart disease (IHD) were evaluated. We showed that in patients with DM2 associated with IHD numbers of Th1-lymphocytes increase, while numbers of Th17-lymphocytes and lymphocytes positive for the expression of receptors to interleukin-23 decline.

Keywords: T-helper-1, T-helper-17, diabetes mellitus type 2, ischemic heart disease.

ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПОСЛЕ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

Гусакова А.М., Насрашвили Г.Г., Огуркова О.Н.

Томский НИМЦ, Томск, Россия

Цель. Оценить динамику и выявить особенности параметров внеклеточного матрикса и эндотелиальной функции у пациентов с ИБС и нарушениями углеводного обмена после коронарного шунтирования (КШ). Материалы и методы. В исследование включено 24 пациента, в возрасте 62,5±6,0 лет с основным диагнозом ИБС: стенокардия, II-III ФК. Всем пациентам было выполнено КШ. Группу 1 составили 14 пациентов с сахарным диабетом II типа. Группу 2-14 человек без метаболических нарушений. Определяли содержание матриксной металлопротеиназы ММП-1, С-терминального телопептида (СТТП) и эндотелина (ЭТ) до операции, через 2 недели и спустя 4-6 месяцев. Результаты. ММП-1 в обеих группах достоверно увеличивалась к 2-х недельному сроку, с последующим значимым снижением, но существенно и достоверно выше исходных величин. У пациентов группы 1 СТТП до и спустя 2 недели после операции достоверно ниже по сравнению с группой 2. В группе 1 выявлены обратные корреляции фракции выброса с СТТП на всех этапах наблюдения. СТТП в обеих группах достоверно нарастал к 2-недельному этапу, затем снижался. В обеих группах спустя 4-6 месяцев после КШ содержание ЭТ достоверно возрастало. Уровень ЭТ в обеих группах на всех этапах исследования был значительно выше референсных значений и достоверно отличался в предоперационном и отдаленном периодах. Выявлена сильная корреляция между ЭТ до операции и ЭТ в отдаленном периодах. В обеих группах ММП-1 до операции имеют положительный коэффициент парной корреляции с ЭТ на первом этапе и через 4-6 месяцев.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, матриксные металлопротеиназы, функция эндотелия.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС), развивающаяся вследствие атеросклероза (АТ) коронарных артерий, лидирует в структуре заболеваемости и смертности населения развитых стран [1]. У больных ИБС воспаление может проявляться как в виде острого локального процесса в местах атеросклеротического поражения, так и в виде хронического системного воспалительного процесса, связанного с генерализованным повреждением эндотелия и сосудистого русла [2]. В последнее время большое внимание уделяется роли матриксных металлопротеиназ (ММП) в патогенезе АТ и ИБС. Синтез и секреция ММП находится под контролем цитокинов, интегринов и рада других соединений. ММП продуцируются в основном под действием провоспалительных цитокинов, а главным их источником считаются активированные макрофаги, нейтрофилы, фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки [3]. Согласно существующим представлениям, ММП воздействуют на коллагеновые волокна покрышки атеросклеротической бляшки, приводя к ее ослабеванию, разрыву, и как следствие, к дестабилизации ИБС. В патогенезе ИБС ведущая роль отводится дисфункции эндотелия сосудов. В настоящее время эндотелин является маркером коронарного АТ и коронарной эндотелиальной дисфункции. Увеличение экспрессии, синтеза и содержания эндотелина в крови способствует развитию гипертрофии миокарда, усилению синтеза коллагена и развитию фиброза в сердечной мышце, и как следствие, напрямую связано с увеличением частоты развития ишемии и инфарктов миокарда [4]. Таким образом, для оценки отдаленных прогнозов и предотвращения возможных послеоперационных осложнений представляется актуальным поиск и изучение биомаркеров внеклеточного матрикса (ВКМ) и функции эндотелия.

Цель. Оценить динамику и выявить особенности параметров внеклеточного матрикса и эндотелиальной функции у пациентов с ИБС и нарушениями углеводного обмена после коронарного шунтирования (КШ).

Материалы и методы. В исследование включено 24 пациента, в возрасте 62,5±6,0 лет с основным диагнозом ИБС: стенокардия напряжения преимущественно II-III ФК. Всем пациентам было выполнено КШ. В зависимости от наличия нарушений углеводного обмена пациенты были разделены на две группы. Основная группа включает 14 пациентов с сахарным диабетом (СД) II типа и нарушением толерантности к углеводам (НТУ). Группу сравнения составили 14 человек без метаболических нарушений. По основному заболеванию, видам хирургической коррекции заболеваний и иной сопутствующей патологии группы не различались. Методом твердофазного иммуноферментного анализа выполнено определение матриксной металлопротеиназы pro-MMP-1 (ММП-1), С-терминального телопептида коллагена I типа (СТТП), и эндотелина-1 (ЭТ). Динамика показателей оценивалась до проведения операции, через 2 недели и в отдаленном периоде спустя 4-6 месяцев в сыворотке и плазме крови. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 6.0 for Windows.

Результаты. Сравнительный анализ уровня и динамики ММП-1 в обеих группах показал достоверное увеличение содержания показателя к 2-х недельному сроку ($p<0,001$), с последующим значимым снижением. При этом значения ММП-1 в обеих группах через 4-6 месяцев после операции остаются существенно и достоверно выше исходных величин ($p<0,001$). Сравнительный анализ выявил в обеих группах статистически значимые различия в показателях СТТП. Установлено, что в основной группе содержание СТТП на дооперационном периоде (0,34±0,13) и спустя 2 недели после операции (0,73±0,24 нг/мл) достоверно ниже, чем в группе сравнения (0,64±0,29 и 1,14±0,55 нг/мл, соответственно). Динамика СТТП в обеих группах достоверно нарастала к 2-недельному этапу, после чего снижалась: в группе сравнения значительно и достоверно ($p<0,005$), в основной – недостоверно, достигнув предоперационного уровня. В группе с СД выявлены обратные сильные корреляционные связи фракции выброса с содержанием СТТП на всех этапах наблюдения ($r= –0,66; –0,72; –0,69$). Отмечено высоко значимое достоверное увеличение содержания ЭТ ($p<0,001$) спустя 4-6 месяцев после оперативного вмешательства. При этом уровень ЭТ на всех этапах исследования был кратно выше по сравнению с референсными значениями и достоверно отличался в предоперационном и отдаленном периодах. Выявленные закономерности позволяют предположить, что реваскуляризирующий эффект операции блокирует явления коронарной недо-

статочности, однако не влияет на протекание хронических воспалительных реакций в эндотелии, вызванных коронарным АТ. Отмечена сильная корреляционная связь (r=0,86) между ЭТ до операции и ЭТ в отдаленном периоде. В обеих группах ММП-1, измеренные перед операцией, имеют положительный коэффициент парной корреляции с ЭТ на первом этапе и в отдаленном периоде.

Выводы. Динамика ММП-1 свидетельствует о наиболее активном обмене компонентов внеклеточного матрикса к двухнедельному этапу в обеих группах. Установленный низкий уровень СТТП у пациентов основной группы свидетельствует о развитии дисбаланса и замедлении коллагенолитических процессов. Накопление избыточного коллагена способствует повышению жесткости миокарда, сопровождается развитием сердечного фиброза и дегенерацией кардиомиоцитов. Выявленная обратная корреляция СТТП с фракцией выброса подтверждает связь степени фиброзных изменений в миокарде с нарушением показателей функционального состояния сердца. В обеих группах выявлены высокие концентрации ЭТ и наблюдается его увеличение в отдаленном периоде. Установленная положительная корреляция между ММП и ЭТ демонстрирует взаимосвязь клеток эндотелия с нейтрофилами и интегринами, под чьим непосредственным контролем находится синтез и секреция ММП. Полученные результаты подтверждают важность поиска и изучения биомаркеров с целью оценки отдаленных послеоперационных прогнозов и предотвращения возможных осложнений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бойцов С. А., Оганов Р. Г. От профилактической кардиологии к профилактике неинфекционных заболеваний в России / С. А. Бойцов, Р. Г. Оганов // Российский кардиологический журнал.– 2014.– Т. 102, № 4.– С. 6-13.
2. Закирова Н. Э., Хафизов Н. Х., Карамо И. М. Иммуновоспалительные реакции при ишемической болезни сердца / Н. Э. Закирова, Н. Х. Хафизов, И. М. Карамова // Рациональная фармакотерапия в кардиологии.– 2007.– Т. 3.– № 2.– С. 16-19.
3. Суслова Т. Е. Провоспалительные цитокины и эндотелиальная дисфункция у больных с коронарным атеросклерозом и у лиц с отягощенной по атеросклерозу наследственностью // Т. Е. Суслова // Аллергология и иммунология.– 2000.– Т. 1., № 2.– С. 159.
4. Взаимосвязь цитокинов и факторов бактерицидности нейтрофилов у больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения //В. В. Новицкий, С. П. Чумакова, В. М. Шипулин и др. // Вестник Российской академии медицинских наук.– 2006.– № 6.– С. 13-18.

DYNAMICS OF MARKERS EXTRACELLULAR MATRIX AND ENDOTHELIAL FUNCTION AT PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE AFTER CORONARY SHUNTING

Gusakova A. M., Nasrashvili G. G., Ogurkova O. N.

Research Institute for cardiology, Tomsk, Russia

To estimate dynamics and to reveal features of parameters of an extracellular matrix and endothelium function at patients with coronary heart disease and carbohydrate metabolism disorder after coronary shunting (CS). Material and methods. Research has included 24 patients, at the age of 62,5±6,0 years. CS has been executed in all the patients. The gr.1 consisted of 14 patients with the diabetes mellitus of the II type. Gr.2-14 consisted of people without metabolic violations. Concentrations of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), C-terminal telopeptid (CTTP) and endothelin-1 (ET) before CS, in 2 weeks and in 4-6 months were evaluated. Results. MMP-1 authentically increased to 2-week term in both groups, with the subsequent significant decrease, but was significantly elevated compared to the initial values. CTTP in gr.1 patients was lower than group 2 before to and 2 weeks after operation. Negative correlations of ejection fraction with STTP at all stages of supervision were revealed in group 1. CTTP in both groups significantly increased by the 2nd week with subsequent decrease. ET content authentically increased in both groups 4-6 months after CS. ET level in all investigation phases was much higher compared to reference values and authentically differed in the preoperative and remote periods in both groups. Strong correlation between ET contents in the preoperative and remote periods was revealed. MMP-1 positively correlated with ET at the 1st stage and after 4-6 months in both groups.

Keywords: coronary heart disease, matrix metalloproteinases, endothelial function.

ВЛИЯНИЕ АУРИКУЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ВАГУСНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ЗАСТОЙНОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Огуркова О. Н., Суслова Т. Е., Павлюкова Е. Н., Кузьмичкина М. А., Гусакова А. М.

НИИ кардиологии, Томск, Россия

Основным механизмом развития и прогрессирования ХСН является субклиническое воспаление и активация системы цитокинов, а так же наблюдается дисбаланс автономной нервной системы, сопровождающийся увеличением ЧСС. Была проведена оценка влияния курса АЭВС для коррекции вегетативного статуса при СН и исследование влияния курса на содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Было отмечено положительное влияние курса АЭВС для таких показателей, как СРБ и ИЛ-6 и снижение частоты сердечных сокращений.

Ключевые слова: воспаление, цитокины, сердечная недостаточность.

Развитие и прогрессирование СН связаны с разнообразными патофизиологическими механизмами, среди которых в последние годы особое внимание уделяется изучению роли “провоспалительных” цитокинов [2]. Иммунная система активируется не только при инфекционных агрессиях, но реагирует и на любое стрессовое воздействие, в том числе ишемию, гемодинамическую перегрузку, интоксикацию, то есть на факторы, являющиеся причиной развития сердечной недостаточности. Гипер-экспрессия системы цитокинов рассматривается, как ведущий патофизиологический механизм сердечной недостаточности, при котором происходит активация системы анти- и провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли-альфа, интерлейкина-6, молекул адгезии, хемокинов, растворимых рецепторов апоптоза и ростовых факторов [2,4]. У больных с застойной СН наблюдается дисбаланс автономной нервной системы, сопровождающийся изменением вариабельности ритма сердца. Показателем симпатической гиперактивности является повышенная частота сердечных сокращений. Высокая ЧСС является фактором сердечно-сосудистого риска и предиктором внезапной сердечно-сосудистой и общей смертности. Увеличение ЧСС сопряжено с субклиническим воспалением и нарушением баланса автономной нервной системы, что увеличивает потребность миокарда в кислороде, рабочую нагрузку на сердце и, тем самым, способствуя развитию ишемии [1,3].

Как известно, ушная раковина является областью наличия соматических афферентных ветвей, в частности блуждающего нерва. Следовательно, можно предположить, что стимуляция этой области может опосредованно воздействовать на активность симпатоадреналовой системы [3]. Особое внимание обращено на участие медиаторов иммунитета в нейроиммунном взаимодействии. Считается, что помимо выполнения своих специфических функций внутри иммунной системы, медиаторы иммунитета могут осуществлять и межсистемные связи [2]. В связи с этим была проведена оценка возможности использовать курс аурикулярной электростимуляции центральных ядер n. vagus для коррекции вегетативного статуса при СН ишемического генеза тяжелых функциональных классов и исследовать влияние АЭВС на уровни С-реактивного белка, фактора некроза опухоли альфа и интерлейкина-6 в сыворотке крови.

Исследование было выполнено у 50 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) в возрасте 60,0±8,9 лет с функциональным классом СН III-IV (по NYHA) и фракцией

выброса левого желудочка менее 35%. Критериями включения были: стабильное клиническое состояние в отношении симптомов ХСН в течение не менее 4 недель; оптимальная и неизмененная терапия по поводу СН в течение последнего месяца; подписанное информированное согласие; ЧСС≥60уд/мин; ФК СН III-IV по NYHA; отсутствие диссинхронии ЛЖ (по данным Эхо-КГ) и клапанной болезни сердца. АЭВС проводилась с использованием прибора «Вагус» (МПК "Электропульс", г. Томск), длительность курса-15 дней. Поскольку показателем симпатической гиперактивности является повышенная ЧСС, то состояние вегетативной регуляции оценивали именно по изменению этого показателя. ЧСС всех пациентов оценивали по суточным записям ЭКГ (исходно, через сутки и через 3 месяца после курса АЭВС). Для определения активности воспалительного процесса использовали показатели С-реактивного белка. Участие цитокинового звена воспаления оценивалось по данным содержания в сыворотке крови ФНО-альфа и ИЛ-6, определяемых иммуноферментным методом с помощью диагностических наборов фирмы Biomedica. Образцы крови брали на этапе включения пациентов в исследование, через сутки и через 3 месяца после последнего сеанса АЭВС. Пациенты были разделены на две группы с ЧСС > 80 уд/мин (n=12) и с ЧСС < 80 уд/мин (n=38). У всех обследованных пациентов, которым был проведен курс АЭВС, установился новый баланс симпатической и парасимпатической иннервации, что выражалось в урежении ЧСС до 10% от исходного уровня на фоне неизмененной базовой терапии. При исследовании показателей воспалительных реакций было обнаружено, что уровень СРБ в сыворотке крови пациентов с начальной ЧСС > 80 уд/мин был достоверно выше, чем в группе с начальной ЧСС<80 уд/мин до вагусной стимуляции, после и через 3 месяца после окончания курса АЭВС. После проведения процедуры, уровень СРБ в обеих группах достоверно снизился, но через 3 месяца после курса содержание СРБ вернулось к исходному уровню.

Важное место в современной нейроэндокринной теории развития сердечной недостаточности цитокиновому звену. Повышенная активность нейрогуморальной системы стимулирует выработку ФНО-альфа, интерлейкина-6, обладающих провоспалительным действием, это ведет к развитию патологических изменений в периферических тканях, нарушению функции энергорецепторов, что приводит к их сверхстимуляции и к гиперактивации симпато-адреналовой системы, замыкая порочный круг [2, 3].

Содержание в сыворотке крови ФНО-альфа в группе с ЧСС> 80 уд/мин было достоверно выше, по сравнению с группой с ЧСС< 80 уд/мин до, после и через 3 месяца АЭВС, при этом не было отмечено динамики изменения содержания ФНО-альфа в сыворотке крови после проведенной вагусной стимуляции. Интерлейкин-6 обеспечивает важные регуляторные функции не только в реализации воспалительных реакций, но и в регуляции определенных звеньев метаболизма, нейроиммунных и нейровегетативных взаимодействиях [2, 4]. При исследовании уровня ИЛ-6 были получены следующие результаты: в группе с ЧСС > 80 уд/мин содержание ИЛ-6 было значительно повышено по сравнению с содержанием данного цитокина в группе с ЧСС< 80 уд/мин до, после и через 3 месяца после процедуры АЭВС. При этом было отмечено снижение уровня ИЛ-6 к 3 месяцу после окончания курса АЭВС по сравнению с начальным уровнем в обеих группах, независимо от исходной ЧСС. Снижение ЧСС после АЭВС может быть отражением установления нового баланса между симпатической и парасимпатической иннервацией, которое должно способствовать улучшению функционального состояния сердечной мышцы. Чем выше исходная ЧСС, тем сильнее выражена воспалительная реакция организма, характеризующаяся высокими уровнями СРБ, ФНО-альфа, интерлейкина-6, при этом положительное влияние АЭВС было отмечено для таких показателей, как СРБ и ИЛ-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Писклова А. В., Афанасьев С. А., Антонченко И. В. Немедикаментозная коррекция вегетативного тонуса в лечении желудочковой экстрасистолии у пациентов с ишемической болезнью сердца / А. В. Писклова, С. А. Афанасьев, И. В. Антонченко // Вестник аритмологии.– 2006.– № 43. С. 23-27.
2. Абрамов В.В., Козлов В.А., Повещенко А. Ф. Цитокины – факторы нейроэндокринной регуляции / В. В. Абрамов, В. А. Козлов, А. Ф. Повещенко // Успехи физиологических наук.– 2007.– № 3.– С. 40-46.

3. Azevedo E. R., Parker J. D. Parasympathetic control of cardiac sympathetic activity: normal ventricular function versus congestive heart failure / E. R. Azevedo, J. D. Parker // Circulation.– 1999.– V.100.– P. 274-279.
4. Smart N. A. Effect of exercise training on interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and functional capacity in heart failure / N. A. Smart // Cardiol. Res. Pract.– 2011.– V. 2011.– P. 6.

EFFECT OF AURICULAR ELECTRICAL VAGAL STIMULATION ON CYTOKINES CONCENTRATION IN PATIENTS WITH CONGESTIVE HEART FAILURE

Ogurkova O. N., Suslova T. E., Pavlukova E. N., Kuzmichkina M. A., Gusakova A. M.

RI Cardiology, Tomsk, Russia

The main mechanism for the development and progression of heart failure is subclinical inflammation and activation of cytokine system, as well as an imbalance of the autonomic nervous system, accompanied by an increase of heart rate. The influence of AEVS on the correction of the vegetative status in heart failure was evaluated as well as the impact of the course on the serum levels of proinflammatory cytokines was studied. We observed positive impact of AEVS on changes of such indicators as CRP and IL-6 while the heart rate decreased.

Keywords: inflammation, cytokines, heart failure.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ И ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОК С АДЕНОМИОЗОМ ПРИ НЕУДАЧНЫХ ПОПЫТКАХ ЭКО

Кравцова Е. И., Куценко И. И., Авакимян В. А., Данилова Н. Р., Колесникова Е. В.

ГБОУ ВПО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Краснодар, Россия

В работе изучались взаимосвязи между особенностями цитокинового профиля фолликулярной жидкости и системным гормональным фоном при бесплодии связанным с аденомиозом. Обнаружен «цитокиновый дефицит» в фолликулярной жидкости при аденомиозе начальных степеней с двукратным уменьшением выхода яйцеклеток с высокой оценкой качества, что закономерно приводит к значимому снижению эффективности последующего оплодотворения. Выявлено, что и изменения гормонального и цитокинового профиля у женщин с аденомиозом носят синергический характер.

Ключевые слова: аденомиоз, бесплодие, интерлейкины, цитокины, прогестерон.

Частота бесплодных браков в России превышает 15%, что по данным ВОЗ является критическим уровнем. Показатели женского бесплодия за последние 5 лет увеличились на 14% [2] и более 50% из них нуждаются в проведении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Частота наступления беременности в циклах ВРТ за последние 5 лет практически не изменилась и составляет по данным XI отчета РАРЧ в расчете на цикл – 33,1%. Аденомиоз выявляется у 40-45% женщин, страдающих первичным бесплодием

и у 50-58 % – вторичным. В настоящее время частота наступления беременности после программы ЭКО у этих пациенток составляет по разным данным 15-25 % в расчете на перенос эмбрионов, что существенно ниже, чем у пациенток с трубно-перитонеальным фактором (28,6-37,4 %). Вопрос значимости аденомиоза в разрезе проблемы бесплодия, а также оценка его влияния на результативность программы ЭКО до сих пор остается предметом дискуссий. Ряд работ свидетельствуют о нарушении цитокинового баланса фолликулярной жидкости доминантных фолликулов посредством которых могут осуществляется местный контроль за созреванием фолликула и, возможно, определяются функциональные свойства яйцеклетки [1]. Интерес к вопросам гормонопосредованной цитокиновой регуляции на начальных этапах репродуктивного процесса не является чисто теоретическим и во многом связан с клиническими запросами связанными с улучшением результативность методик ВРТ у пациенток с аденомиозом.

Цель исследования – оценить взаимосвязь системного гормонального фона и цитокинового профиля фолликулярной жидкости у больных аденомиозом с неудачными попытками программы ЭКО.

Материалы и методы. В исследование были включены 82 пациентки с бесплодием ассоциированным с аденомиозом I и II степеней пациенток и неудачной попыткой ЭКО, а также 30 (контроль) здоровых женщин (программа донорства яйцеклеток). Все исследования проводились после добровольного информированного согласия женщин. Для оценки гормонального статуса исследовались концентрация гонадотропных и стероидных гормонов в сыворотке крови в цикле предшествующем началу протокола суперовуляции методом ИФА. Интерлейкиновый профиль фолликулярной жидкости исследовался на пике овуляции в день планируемой пункции яичников по протоколу ЭКО. Определение содержания про – и противовоспалительных цитокинов в фолликулярной жидкости (ИЛ-1β, ИЛ-8, ИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10) проводилось методом ИФА Для индукции суперовуляции использовались стандартный «короткий» протокол подсчета количества полученных ооцитов и оценки их качества проводился по общепринятой шкале. Математическую обработку результатов проводили методами описательной и непараметрической статистики на персональном компьютере.

Результаты и обсуждение. Количество полученных в результате стимулированной овуляции не имело статистически достоверных различий и составило 8,3±2,4 в группе у пациенток с аденомиозом против 7,3±1,2 в группе доноров. Однако доля качественных ооцитов у пациенток с аденомиозом оставила 66,3±3,4 %, и была достоверно ниже значений контроля (98,3±2,4 %) ($p<0,01$). Частота оплодотворения в среднем составила 39,3±2,5 % и 93,4±1,3 % у пациенток с аденомиозом и 92,1±0,8 %, частота дробления зигот – 94,3± 0,5 % в группе контроля соответственно. Концентрация подавляющего большинства из анализируемых цитокинов в фолликулярной жидкости находилась на нижней границе чувствительности метода. В группе пациенток с аденомиозом определялся выраженный дефицит регуляторного цитокина IL-2 (1,6±0,6 пкг/мл против 22,2±0,1 пкг/мл у доноров), а также противовоспалительного пуля цитокинов – IL-4, IL-10 – (1,2±0,2 пкг/мл, 5,7±3,1 пкг/мл, 3,8±1,3 пкг/мл против 9,7± 0,2 пкг/мл, 12,8±1,2 пкг/мл, 10,3±2,3 пкг/мл у доноров) ($p<0,05$). Концентрация провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6) также была достоверно снижена по сравнению с уровнем здоровых доноров (16,2±3,0 пкг/мл, 5,7± 3,1 пкг/мл, против 22,9±2,4 пкг/мл, 12,8± 2,3 пкг/мл) (($p<0,05$) и только уровень IL8 был сопоставим по значению с группой контроля (17,5±2,3 пкг/мл против 19,8±3,4 пкг/мл).

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что для созревания ооцитов в морфологически качественные яйцеклетки необходимым фактором является наличие в микроокружении фолликула определенного баланса цитокинов. В условиях «цитокинового дефицита» наблюдается двукратное уменьшение выхода яйцеклеток с высокой оценкой качества, что закономерно приводит к значимому снижению эффективности последующего оплодотворения (39,34 % против 92,1 % в контроле, $p < 0,01$).

При обследовании контрольной группы гормональный статус соответствовал нормоэстрогеновому овуляторному менструальному циклу с полноценной второй фазой. При анализе гормонального фона женщин с бесплодием, ассоциированным с аденомиозом обращало на себя внимание то, что овуляторные пики гонадотропных гормонов сохранялись, но их интен-

сивность была менее выражена, особенно ЛГ (29,9±2,74 МЕ/л против 45,3±2,29 МЕ/л), обнаружено достоверное уменьшение уровня овуляторного эстрадиола (1245,5±143,4 пмоль/л против 867,4±113,8 пмоль/л и уровня прогестерона (10,3±1,45 нмоль/л против 5,1±1,36 нмоль/л) по сравнению с уровнем в контрольной группе ($p<0,03$). В лютеиновую фазу уровни ЛГ и ФСГ были значительно снижены, в большей степени ЛГ ($p<0,05$). Определялся достоверно сниженый уровень прогестерона ($p<0,05$). В итоге при анализе результатов, полученных для гормональных профилей, обращало на себя внимание выраженная тенденция к дизрегуляции центрального звена, и наличие относительной гиперэстрогении и гипопрогестеронемии.

Проведенный корреляционный анализ на наличие связи между исходным системным гормональным фоном и цитокиновым окружением созревающей яйцеклетки. Обнаружили положительную направленность корреляционной зависимости по коэффициенту Спирмена между уровнем прогестерона и лютеонизирующего гормона в момент предполагаемой овуляции и показателями цитокинового баланса в фолликулярной жидкости на этапе проведения стимуляции с коэффициентом сопряженности в пределах 0,82-0,97, что свидетельствует о сильных взаимосвязях.

Заключение. Таким образом, при аденомиозе, даже начальных степеней, причиной неудач ЭКО может служить эмбриональный фактор. Фолликулогенез и процесс созревания ооцитов в полноценные в количественном и качественном отношении яйцеклетки находятся в тесной взаимосвязи с регуляторной цитокиновой системой и гормональным статусом пациенток. Изменения гормонального и цитокинового профиля у женщин с аденомиозом носят синергический характер. Коррекция гормонального фона путем проведения предгравидарной подготовки может опосредовано служить позитивным изменениям цитокинового баланса в созревающих фолликулах и, следовательно, обеспечивать повышение результативности ЭКО у пациенток с бесплодием, обусловленного аденомиозом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мальцева А. Н., Конопля А. А., Ярош А. А. Взаимосвязь иммунных и метаболических нарушений при эндометриозе / А. Н. Мальцева, А. А. Конопля, А. А. Ярош // Медицинская иммунология.– 2015.– Т. 15, специальный выпуск.– С. 176-177.
2. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных / Л. В. Адамян, Е. Н. Андреева, И. А. Аполихина и др.– Москва, 2013, 65 с.

CORRELATION OF CYTOKINE PROFILE OF FOLLICULAR FLUID AND HORMONAL STATUS IN PATIENTS WITH ADENOMYOSIS, IN AN UNSUCCESSFUL IVF ATTEMPTS.

Kravtsova I. E., Kutsenko I. I., Avakimyan V. A., Danilova N. R., Kolesnikova E. V.

Kuban State Medical University, Russian Ministry of Health, Krasnodar, Russia

This paper studied the relationship between the characteristics of the cytokine profile of follicular fluid and systemic hormonal infertility associated with adenomyosis. Discovered "cytokine deficiency" in follicular fluid adenomyosis primary degree with a twofold decrease in the yield of oocytes with a high quality assessment that naturally leads to a significant decrease in the efficiency of subsequent fertilization. It is revealed that the change of the hormonal and cytokine profile in women with adenomyosis are synergistic in nature.

Keywords: adenomyosis, infertility, interleukins, cytokines, progesterone.

ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА СЛИЗИСТОЙ ЖЕЛУДКА ПО ДАННЫМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Бычкова Н. В., Давыдова Н. И., Калашникова А. А., Калинина Н. М.

ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Методом многоцветной проточной цитометрии оценили соотношение субпопуляций лимфоцитов в биопсийном материале при различных вариантах течения хронического воспаления слизистой оболочки желудка. Выявили, что иммунный ответ характеризуется превалированием Т-клеточного ответа за исключением группы с эрозивно-язвенными состояниями. При изменении характера воспаления и прогрессировании трансформации слизистой оболочки в соответствии с каскадом Correa наблюдается истощение слизистой лимфоцитами и, особенно, Т-цитотоксическими клетками.

Ключевые слова: проточная цитометрия, клеточный иммунитет слизистой желудка.

Частота встречаемости хронической патологии верхних отделов желудочно-кишечного тракта в современной популяции остается высокой. Наиболее часто диагностируются хронические гастриты и язвенная болезнь.

Патофизиологической основой различных вариантов гастрита, рака желудка является хроническое воспаление, которое имеет свои особенности в каждой группе. Лимфоциты, инфильтрирующие слизистую оболочку желудка, осуществляют противоинфекционную и противоопухолевую защиту.

Оценка воспалительного процесса, развивающегося при обострении хронических заболеваний, включает широкий спектр показателей клеточного и гуморального иммунитета, как правило, при этом материалом для исследования является периферическая кровь. Локальный иммунный ответ протекает при кооперации, в том числе, клеток иммунной системы. Соотношение субпопуляций лимфоцитов при различных заболеваниях желудка имеет особенности – превалирование той или иной субпопуляции клеток-эффекторов.

Современным корректным методом оценки клеточного иммунитета признан метод многоцветной проточной цитометрии, позволяющий охарактеризовать популяции лимфоцитов одновременно по нескольким клеточным маркерам. Этот метод является традиционным для анализа субпопуляций лимфоцитов периферической крови. Ограничением использования проточной цитометрии для исследования лимфоцитов в ткани является необходимость ее предварительной дезагрегации, что имеет методические сложности и обусловливает недостаточное применение данного метода для исследования местного иммунитета по сравнению с иммуногистохимическим.

Целью настоящего исследования явился анализ соотношения субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии в биопсийном материале при различных вариантах течения хронического воспаления слизистой оболочки желудка.

Комплексное обследование было проведено 87 пациентам. По данным эндоскопического осмотра на видеоинформационной системе EVIS Exera II в режиме NBI с 80-кратным увеличением (NBI – ME), с прицельной биопсией измененных участков слизистой оболочки желудка (СОЖ) и результатов гистологического анализа биоптатов пациенты были разделены на группы: 1-я группа (n = 14) с хроническим неатрофическим гастритом (НГ) со слабой или умеренной степенью воспаления (HP-неассоциированным), 2-я группа (n = 31) с хроническим атрофическим гастритом (АГ) (HP-неассоциированным), 3–я группа (n = 29) с аденокарциномой слизистой оболочки же-

лудка (РЖ), 4-я группа – эрозивно-язвенное поражение желудка (n = 13) (ЭЯ).

Методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC 500, Beckman-Coulter) в многоцветном анализе был исследован субпопуляционный состав лимфоцитов (CD45-PC7, CD8-FITC/CD4-PE/CD3-PC5, CD3-FITC/CD(16+56)-PE, CD19-FITC, HLA-DR-PC5, CD95-PE, Beckman-Coulter), инфильтрирующих слизистую оболочку желудка, полученных из гастробиоптата при помощи механической дезагрегации (Medimachine, BD) с последующей фильтрацией и центрифугированием в растворе Версена.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica (версия 5.0).

Последовательность изменений слизистой оболочки желудка через воспаление → атрофию → метаплазию → прогрессирующую дисплазию → рак *in situ* → к инвазивному раку носит название каскада Correa [1].

В суспензии клеток, полученной из слизистой оболочки желудка, количество лимфоцитов ($CD45^{+bright}$) варьировало от 0,2 до 24,8 %, прогрессивно уменьшаясь в соответствии с каскадом Correa в ряду «слизистая с НГ»-«слизистая с АГ»-«РЖ»-«ЭЯ» (12,5 %-7,5 %-3,9 %-3,6 %, $p<0,05$).

Среди лимфоцитов во всех исследованных образцах преобладали зрелые Т-клетки (44-94 %). Самое низкое количество Т-лимфоцитов наблюдалось у пациентов с язвенным поражением желудка. Среди Т-лимфоцитов преобладали цитотоксические Т-клетки во всех группах, кроме пациентов раком желудка, что резко отличало распределение Т-клеток слизистой оболочки желудка от субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. Преобладание Т-лимфоцитов и специфических цитотоксических Т-лимфоцитов в слизистой оболочке желудка сопоставимо с распределением этих субпопуляций в кишке [2].

В ряду «слизистая с НГ»-«слизистая с АГ»-«РЖ»-«ЭЯ» наблюдалось незначительное увеличение относительного количества Т-хелперов при выраженном снижении Т-цитотоксических лимфоцитов в двух последних группах (74,3 %-65,9 %-39,9 %-42 % $p<0,05$). «Дубль-позитивные» Т-лимфоциты составили в разных группах от 2 до 3,4 %, самые высокие значения наблюдались при новообразованиях желудка.

Количество NK-клеток в биоптатах пациентов всех групп было невысоким, наблюдалось повышение относительного количества этих клеток в ряду «слизистая с НГ»- «слизистая с АГ»-«РЖ»-«ЭЯ» (1,9 %-3,5 %-5,4 %-6,7 % $p<0,05$). Количество TNK-клеток в 2-6 раз превышало число NK-клеток в биоптатах слизистой желудка всех обследованных групп и было сопоставимо во всех группах.

Среди лимфоцитов, инфильтрирующих слизистую, доля В-клеток составила 7-26 %, их количество увеличивалось в ряду «слизистая с НГ»-«слизистая с АГ»-«РЖ»-«ЭЯ» (3,6 %-10,6 %-17,5 %-25,7 %, $p<0,05$). Высокое количество В-лимфоцитов при эрозивно-язвенных состояниях и в опухолях с наличием некротических повреждений обусловлено, вероятно, доминированием гуморальной составляющей иммунного ответа при облегченном процессе распознавания инфекционного агента клетками иммунной системы вследствие нарушения целостности слизистой этого барьерного органа.

Различий в иммунологических показателях в зависимости от наличия или отсутствия тонко- и толстокишечной метаплазии у пациентов с атрофическим гастритом не получено.

Проведенное исследование показало, что соотношение субпопуляций лимфоцитов слизистой оболочки желудка резко отличается от такового периферической крови, иммунный ответ характеризуется превалированием Т-клеточного ответа за исключением группы с эрозивно-язвенными состояниями.

При изменении характера воспаления и прогрессировании трансформации слизистой оболочки в соответствии с каскадом Correa наблюдается истощение слизистой лимфоцитами и, особенно, Т-цитотоксическими клетками. Они осуществляют противоопухолевую защиту, их гибель вносит существенный вклад в прогрессирование опухолевого заболевания и, вероятно, оценка увеличения соотношения Т-хелперы/Т-цитотоксические поможет выделить группы пациентов с неблагоприятным прогнозом заболевания. Значительные изменения соотношения Т- и В-лимфоцитов у пациентов с язвенным поражением являются основанием для динамического наблюдения с целью ранней диагностики рака желудка. Наибольшую информацию о механизмах реализации иммунного ответа в слизистой оболочке желудка при различных воспалительных и неопластических процессах позволит получить комплексное исследование параметров системного и местного иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Correa P. Human gastric cancerogenesis: a multistep and multifactorial process/ P. Correa // Cancer rev.– 1992.– № 52.– P. 6735-6740.
2. Ярилин А. А. Иммунология / А. А. Ярилин – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010.– 749 с.

ANALYSIS CELLULAR LOCAL IMMUNITY OF THE GASTRIC MUCOSA BY FLOW CYTOMETRY

Bychkova N., Davydova N., Kalashnikova A., Kalinina N.

The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, Saint-Petersburg, Russia

By multi-color flow cytometry lymphocyte subpopulations evaluated in biopsy material in different variants of chronic inflammation of the gastric mucosa. We found that the immune response is characterized by a predominance of T-cell response with the exception of the group with erosive and ulcerative conditions. By changing the nature of the inflammation and mucosal transformation progression in accordance with a cascade Correa mucosal lymphocyte depletion is observed, and particularly cytotoxic T-cells.

Keywords: flow cytometry, cell immunity gastric mucosa.

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ АУТОИММУННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Репина Е. А.

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ, Москва, Россия

Проведен анализ зависимости продукции цитокинов в ответ на инсулин от вариантов генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* у 35 пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ. Контрольную группу составили 30 здоровых добровольцев без аутоиммунных заболеваний. Отмечалось значимое увеличение показателей продукции провоспа-лительных цитокинов в ответ на инсулин у пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ по сравнению с контролем: ИЛ-1 (p=0,00004), ИЛ-6 (p=0,00004), ИЛ-8 (p=0,0006), ИЛ-12 (p=0,0006) и ФНО-α (p=0,0006), а также цитокинов Т-клеточного иммунного ответа: ИФНγ (p=0,0006), ИЛ-2 (p=0,0006) и ИЛ-4 (p=0,0006). При этом уровни ИЛ-10 в ответ на стимуляцию инсулином были значимо ниже по сравнению с контролем (p=0,003). Характер и степень активности аутоиммунного воспаления при различных вариантах СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ зависит от профиля и уровней продуци-руемых цитокинов в ответ на инсулин.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, иммуногенетика, цитокины.

Сахарный диабет 1 типа (СД1) – тяжелое заболевание, в основе развития которого лежат иммунные нарушения, реализующиеся у генетически предрасположенных лиц под воздействием ряда провоцирующих факторов [1].

В предыдущих исследованиях нами доказана ассоциация варианта СД1 в сочетании с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АИЗ ЩЖ) с полиморфизмом *rs 2476601* гена *PTPN22* [2, 3].

Целью настоящего исследования является прогнозирование течения иммуногенетических вариантов СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ на основании функциональных иммунологических показателей.

Материалы и методы. Нами обследовано 80 пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ. Из них мы отобрали 35 пациентов с длительностью СД1 от 10 до 25 лет. Поскольку из трех возможных вариантов генотипов полимор-

физма *rs 2476601* гена *PTPN22 – CC*, *CT* и *TT* генотип *TT* встречается крайне редко, всех пациентов мы разделили на 2 группы: в первую группу вошло 17 пациентов с генотипами *TT* или *CT*; вторую группу составили 18 пациентов с генотипом *CC*. В контрольную группу вошло 30 здоровых добровольцев без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним.

Функциональное состояние лимфоидных клеток мы оценивали по профилю продуцируемых цитокинов в ответ на специфический для СД1 антиген – инсулин.

Перед определением цитокинов лимфоциты пациентов выделяли из периферической крови методом градиентного центрифугирования с использованием смеси фиколл-верографина с плотностью 1,077.

Клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером с pH 7,2 и ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 («Панэко», Россия) с добавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки («Панэко», Россия), 20 мкг/мл гентамицина, 2 мМ L-глутамина и 2 мМ HEPES. Суспензию лимфоцитов в концентрации 10^6 клеток на 1 мл среды культивировали в пластиковых 24-луночных планшетах (Nunc, Дания) в течение 18-20 ч в CO_2-инкубаторе. По окончании культивирования плашки центрифугировали, супернатанты каждого образца собирали в разные микропробирки и замораживали при –70 °С до момента исследования в них уровня продукции цитокинов. Продукцию цитокинов оценивали методом проточной флюориметрии на двулучевом лазерном автоматическом анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США).

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью пакета прикладных программ Statistica v 6,0 for Windows. Сравнение показателей исследуемых групп пациентов проводилось по U-критерию Манна-Уитни. Количественные показатели представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q25; Q75]. Критический уровень значимости принимался 2,5 %.

Результаты и их обсуждение. При анализе полученных данных нами установлено статистически значимое по сравнению с контролем повышение уровней продукции ИЛ-6 и ФНОα в ответ на ФГА в обеих основных группах (p=0,00004/0,0006). Вместе с тем, уровень продукции ИЛ-12 в ответ на ФГА был значимо ниже в основных группах по сравнению с контролем (p=0,00004/0,0006). Нами выявлены значимые отличия в уровнях продукции ИЛ-1 в ответ на ФГА между основными группами по сравнению с контролем. При этом в основной группе с генотипом *TT/CT* отмечалось значимое повышение уровня ИЛ-1 по сравнению с контролем. Группа с генотипом *CC* не отличалась по уровню продукции ИЛ-1 в ответ на ФГА, что свидетельствует о менее агрессивном течении аутоиммунного процесса при данном варианте заболевания. При сравнении этих групп с контролем по уровням продукции цитокинов Т-клеточного иммунного ответа в ответ на ФГА были также выявлены значимые отличия: в группе с генотипом *TT/CT* отмечалось значимое повышение уровней ИФНγ (p=0,019) и ИЛ-4 (p=0,049), в то время, как группа с генотипом *CC* не отличалась от контроля по уровням продукции этих цитокинов. Уровни продукции ИЛ-2 в ответ на ФГА в основных группах значимо не отличались от контроля. Обращало также внимание значимое снижение уровней продукции ИЛ-10 в ответ на стимуляцию ФГА в обеих основных группах по сравнению с контролем (p=0,00004/0,0006).

В обеих основных группах отмечалось статистически значимое увеличение показателей продукции провоспалительных цитокинов в ответ на инсулин: ИЛ-1 (p=0,00004/0,0006), ИЛ-6 (p=0,00004/0,0006), ИЛ-8 (p=0,00002/0,0006), ИЛ-12 (p=0,00004/0,0006) и ФНО-α (p=0,00004/0,0006), а также цитокинов Т-клеточного иммунного ответа: ИФНγ (p=0,00004/0,0006), ИЛ-2 (p=0,00004/0,0006) и ИЛ-4 (p=0,00004/0,0006). Обращало внимание значимое снижение ИЛ-10 в ответ на стимуляцию инсулином в обеих основных группах по сравнению с контролем (p=0,00004/0,003), что свидетельствует о снижении функциональной способности Т-регуляторных клеток.

Выводы.

1. Риск развития и форма течения СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ ассоциированы с полиморфным маркером *rs 2476601* гена *PTPN22*.
2. Инсулин в реакции *in vitro* является диагностическим маркером СД1 у пациентов с сочетанием СД1 и АИЗ ЩЖ.
3. Характер и степень активности аутоиммунного воспаления при различных вариантах СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ зависит от профиля и уровней продуцируемых цитокинов в ответ на ФГА и инсулин.

4. Полученные данные свидетельствуют о повышении воспалительной активности в обеих группах по сравнению со здоровыми, а также об участии как ТН-1, так и ТН-2 ответа в реализации аутоиммунных механизмов при СД1 у пациентов с сочетанием СД1 и АИЗ ЩЖ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И., Шестакова М.В. Сахарный диабет: руководство для врачей / И.И. Дедов, М.В. Шестакова.– Москва: Универсум Паблишинг, 2003.– 445 с.
2. Полиморфизм *rs 2476601* гена *PTPN22* – фактор высокого риска развития клинического варианта сахарного диабета 1 типа в составе аутоиммунного полигландулярного синдрома / Е.А. Репина, М.Н. Болдырева, Ю.И. Сунцов и др. // Научное обозрение.– 2015.– № 9.– С. 160-165.
3. Сахарный диабет 1 типа и аутоиммунные полигландулярные синдромы – иммуногенетические взаимоотношения / Е.А. Репина, М.Н. Болдырева, Ю.И. Сунцов и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9 (18).– № 2 (1).– С. 464-466.

IMMUNOGENETIC VARIANTS AUTOIMMUNE DIABETES

Repina E.A.

FGBU "Endocrinology Research Centre" The Ministry of Health, Moscow, Russia

Analysis of the relationship between the insulin-induced cytokines' production from variants of genotypes of polymorphism of the gene *PTPN22 rs 2476601* was carried out in 35 T1DM in combination with AITHD. The control group consisted of 30 healthy volunteers without autoimmune diseases. Showed a significant increase in the production of proinflammatory cytokines in response to insulin in patients with T1DM in combination with AITHD compared to controls: IL-1 (p=0,0006), IL-6 (p=0,0006), IL-8 (p=0,0006), IL-12 (p=0,0006) and TNF-α (p=0,0006) and cytokines T-cell immune response: IFN (p=0,0006), IL-2 (p=0,0006) and IL-4 (p=0,0006). Noticed significant decrease in IL-10 in response to stimulation with insulin in comparison with control (p=0,003). The nature and extent of activity of autoimmune inflammation in various embodiments T1DM in combination with AITHD depends on the profile and levels of cytokines produced in response to insulin.

Keywords: type 1 diabetes, autoimmune thyroid diseases, immunogenetics, cytokines.

АНАЛИЗ СПЕКТРА АУТОАНТИТЕЛ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА В СОЧЕТАНИИ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Репина Е.А.

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ, Москва, Россия

Проведен анализ спектра аутоантител у 35 пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ в зависимости от вариантов генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22*. Установлены значимые отличия по частоте встречаемости различных видов антител и их сочетаний: у пациентов с генотипом СС по полиморфизму *rs 2476601* гена *PTPN22* более чем в 2 раза чаще встречались антитела к GAD, в 2 раза реже – ICA, почти на 10% чаще – IA-2 и к TG по сравнению с генотипами *TT/CT*. Обращало внимание увеличение частоты встречаемости сочетаний антител у пациентов с сочетанием СД1 с АИЗ ЩЖ. Характер и степень активности аутоиммунного воспаления при различных вариантах СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ зависят от варианта ответа на антиген(ы), что отражается в спектре продуцируемых антител.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, полиморфизма *rs 2476601*гена *PTPN22,* аутоантитела.

Сахарный диабет 1 типа (СД1) – гетерогенное заболевание, в основе развития которого лежат иммунные нарушения, реализующиеся у генетически предрасположенных лиц [1].

В предыдущих исследованиях нами доказана ассоциация варианта СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ с полиморфизмом *rs 2476601* гена *PTPN22* [2]. Белковый продукт данного гена относится к семейству тирозиновых фосфатаз и является мощным ингибитором антигена Т-клеточного рецептора сигнального пути [3-5].

Целью настоящего исследования является сравнительный анализ спектра специфических аутоантител при различных вариантах СД1 в сочетании с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АИЗ ЩЖ) в зависимости от вариантов генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22*.

Материалы и методы. Нами обследовано 80 пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ – АИТ и ДТЗ. Из них мы отобрали 35 пациентов с длительностью СД1 от 10 до 25 лет. Поскольку из трех возможных вариантов генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* – *CC*, *CT* и *TT* генотип *TT* встречается крайне редко, всех пациентов мы разделили на 2 группы: в первую группу вошло 17 пациентов с генотипами *TT* или *CT*; вторую группу составили 18 пациентов с генотипом *CC*. В контрольную группу вошло 30 здоровых добровольцев без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним.

Количественное определение титров специфических аутоантител, характеризующих СД1 – к глутаматдекарбоксилазе (GAD), островковым клеткам (ICA), инсулину (IAA), тирозиновой фосфатазе (IA-2) и АИТ – к тиреоглобулину (ATG) и тиреопероксидазе (ATPO) в сыворотках крови осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов фирмы «Biomerica». Аутоантитела к островковым клеткам определяли с помощью тест-систем ИФА «Isletest-ICA» фирмы «Biomerica» согласно методике производителя.

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью пакета прикладных программ Statistica v 6,0 for Windows. Сравнение показателей исследуемых групп пациентов проводилось по U-критерию Манна-Уитни. Критический уровень значимости принимался 5%.

Результаты и их обсуждение. Проведено исследование уровней продукции антител к глютамат-декарбоксилазе (GAD), островковым клеткам (ICA), инсулину (IAA) и тирозиновой фосфатазе (IA-2) у пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ в зависимости от вариантов генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22*. Установлено, что исследуемые группы значимо отличаются по частоте встречаемости различных видов антител: у пациентов с генотипом CC по полиморфизму *rs 2476601* гена *PTPN22* более чем в 2 раза чаще встречались антитела к GAD, в 2 раза реже – ICA, почти на 10% чаще – IA-2 и к TG по сравнению с генотипами *TT/CT*.

Мы также проанализировали частоту встречаемости различных вариантов сочетаний антител в зависимости от вариантов генотипов того же полиморфизма. Обращало внимание увеличение частоты встречаемости сочетаний антител как к СД1, так и к АИЗ ЩЖ у пациентов с сочетанием СД1 с АИЗ ЩЖ (у 6 пациентов с генотипом *CC* и у 4 – с генотипами *TT/CT*; у 8 пациентов с генотипом *CC* и у 4 – с генотипами *TT/CT*). При этом из 6 пациентов с генотипом *CC* и с сочетаниями антител к СД1 у 4 (67%) в состав сочетания входили антитела к тирозиновой фосфатазе – IA-2, в то время, как лишь у одного пациента из 4 (25%) с генотипами *TT/CT* и сочетаниями антител к СД1 в составе сочетания были антитела IA-2.

Особое внимание мы уделили изучению зависимости вариантов генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* от наличия или отсутствия антител к тирозиновой фосфатазе – IA-2 поскольку белковый продукт этого гена также, как и белковый продукт гена *PTPN22* относится к семейству тирозиновых фосфатаз.

Антитела к IA-2 были определены у 24 пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ и длительностью СД1 от 10 до 25 лет. Из них серопозитивных по IA-2 было 9, серонегативных – 15. В группе пациентов с СД1+АИЗ ЩЖ, серопозитивных по IA-2, у 3 был *TT* или *CT* вариант генотипа по полиморфизму *rs 2476601* гена *PTPN22* и у 6 – *CC* (в 2 раза больше по сравнению с генотипом *TT/CT*). В группе пациентов с СД1+АИЗ ЩЖ серонегативных по IA-2 8 имели вариант генотипа *TT/CT* и 7 – *CC*.

Выводы.

1. СД1 характеризуется клинико-патогенетической гетерогенностью, которая зависит от вариантов генотипов основных генов-кандидатов, кодирующих эффекторные белки, ответственные за развитие аутоиммунного воспаления. Клиническим маркером этой ге-

терогенности при СД1 может быть наличие сопутствующих АИЗ, в том числе ЩЖ. Вариант СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ также гетерогенен и зависит от вариантов генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22*, с которым он ассоциирован.

2. При этом в группе с вариантом генотипа *CC* преобладает гуморальный вариант ответа, в то время, как у пациентов из группы с вариантами генотипов *TT* или *CT* большую роль играет наиболее агрессивный – Т-клеточный вариант ответа.

3. Характер и степень активности аутоиммунного воспаления при различных вариантах СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ зависят от варианта ответа на антиген(ы), что отражается в спектре продуцируемых антител.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И. И., Шестакова М. В. Сахарный диабет: руководство для врачей / И. И. Дедов, М. В. Шестакова. – Москва: Универсум Паблишинг, 2003. – 445 с.
2. Полиморфизм *rs 2476601* гена *PTPN22* – фактор высокого риска развития клинического варианта сахарного диабета 1 типа в составе аутоиммунного полигландулярного синдрома / Е. А. Репина, М. Н. Болдырева, Ю. И. Сунцов и др. // Научное обозрение. – 2015. – № 9. – С. 160-165.
3. Сахарный диабет 1 типа и аутоиммунные полигландулярные синдромы – иммуногенетические взаимоотношения / Е. А. Репина, М. Н. Болдырева, Ю. И. Сунцов и др. // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18). – № 2 (1). – С. 464-466.
3. Маркеры «иммунологической памяти» у пациентов с сахарным диабетом 1 типа и аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы / Е. А. Репина Е. А., Е. Н. Степанова, Я. С. Зверева и др. // Российский аллергологический журнал. – 2012. – № 5. – вып. 1. – С. 222-224.
4. Репина Е. А. Механизмы адаптивного иммунитета (на модели сахарного диабета 1 типа) / Е. А. Репина // Сахарный диабет. – 2010. – № 2. – С. 21-27.
5. Репина Е. А., Степанова С. М. Роль маркёров иммунологической памяти для аутоиммунных вариантов сахарного диабета / Е. А. Репина, С. М. Степанова // Международный научный институт «Educatio». – Ежемесячный научный журнал. – 2015. – № 4 (11). Часть 2. – С. 68-72.

ANALYSIS OF THE AUTOANTIBODIES' SPECTRUM IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1 IN COMBINATION WITH AUTOIMMUNE THYROID DISEASES

Repina E. A.

FGBU "Endocrinology Research Centre" The Ministry of Health, Moscow, Russia

The analysis of the autoantibodies' spectrum was hold in 35 patients with T1DM in combination with AITHD depending on the options of gene *PTPN22 rs 2476601* polymorphism. We found significant differences in the frequency of occurrence of different types of antibodies and their combinations: patients with the *CC* genotype have more than 2 times more common antibodies to GAD, in 2 times less – ICA, nearly 10 % more often IA-2 and TG compared with the genotypes of *TT/CT*. We have noticed an increase in the frequency of occurrence of antibodies' combinations in patients with T1DM and AITHD. The nature and extent of the activity of the autoimmune inflammation in various embodiments T1DM in combination with AITHD depend on the version of the response to the antigen(s), which reflected in the spectrum of the produced antibodies.

Keywords: type 1 diabetes, autoimmune thyroid diseases, polymorphism *rs 2476601* of *PTPN22* gene, autoantibodies.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ И ОГРАНИЧЕННОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

Ерыгина Е. Н., Романова Н. В., Романов В. А.

ГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», Ярославль, Россия

При системной склеродермии продемонстрирована активация апоптоза (увеличение экспрессии $CD95^+$ антигена, снижение ДНК клеток) и метаболических функций моноцитов в виде повышения продукции активных форм кислорода, кислой фосфатазы и катионных белков клеток. При ограниченной склеродермии значимых изменений в показателях апоптоза и метаболических функций моноцитов не обнаружено.

Ключевые слова: моноциты, склеродермия.

Актуальность и цель работы. В настоящее время предполагается, что системная и ограниченная склеродермия (ССД, ОСД) являются аутоиммунными болезнями [1, 2], иммунопатогенез и взаимоотношения которых остаются неясными. Исследование этих вопросов важны не только теоретически в плане расшифровки механизмов развития патологического процесса при ОСД и ССД, в частности, мало исследованной оценки макрофагальных функций при этих заболеваниях, но и в практическом аспекте с точки зрения разработки новых лабораторных подходов к диагностике и дифференциации ОСД и ССД, а также методов их профилактики и лечения. Исходя из этого целью работы являлось изучение метаболических функций и апоптоза моноцитов (Мн у больных ОСД и ССД).

Было обследовано 58 больных женского пола (24 – ССД, 34 – ОСД), средний возраст больных соответственно – 50,1±12,8 года и 41,8±18,4 лет, давность болезни 15,3±9,2 и 9,8±3,8 лет.

Хроническое течение ССД констатировано у 20 больных (83,3 %); подострое – у 4 (16,7 %), умеренная активность воспалительного процесса (AII) – у 16 (66,7 %), минимальная (AI) – у 8 (33,3 %) пациентов. Лимитированная форма склеродермии диагностирована – у 20 (83,3 %) больных, диффузная – у 4 (16,7 %). В 8 случаях (33,3 %) выявлены множественные телеангиэктазии. У всех больных ССД наблюдались поражения кожи, наиболее часто – уплотнения кожи пальцев и лица, подкожные кальцинаты и атрофия кожи. Миалгический синдром обнаружен у 10 (41,7 %) пациентов, склеродактилия – у 15 (62,5 %), остеолиз – у 10 (41,7 %). Синдром Рейно наблюдался у всех больных, синдром Шегрена – у 5 больных (20,8 %). Стеноз устья аорты обнаружен у одного больного, миокардиосклероз – у 12 больных (50 %), адгезивный перикардит – у 9 (37,5 %). Пневмосклероз отмечен у 12 (50 %) пациентов, сухой плеврит – у 5 (20,8 %), поражения почек – у 6 (25 %), ЦНС – у 4 (16,7 %), артериальная гипертензия – у 3 (12,5 %), эзофагит – у 6 (25 %).

ОСД была диагностирована в стадии индурации – у 18 (52,9 %) больных плотного отека у 12 (35,3 %), атрофии – у 4 (11,7 %). У двух больных (5,9 %) была обнаружена алопеция. Бляшечная форма ОСД наблюдалась у 32 пациентов (94,1 %), линейная – у 2 (5,9 %). Контрольную группу составили 33 здоровых женщины, средний возраст 54,9±8,2 года.

Используемые методы. Популяции моноцитов (Мн) человека получали с помощью центрифугирования периферической крови на двойном градиенте плотности фиколла – верографина с последующим выделением моноцитов из смеси мононуклеарных клеток центрифугированием в градиенте плотности перколла [3]. Исследовали маркеры апоптоза – экспрессию CD95 антигена на Мн с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции, ДНК клеток – микроцитофлюориметрическим

методом с красителем акридиновым оранжевым. Кислороднезависимый метаболизм Мн изучали в тестах спонтанной и индуцированной эпидермальным стафилококком люминолзависимой хемилюминесценции (сХЛ, иХЛ) [1], кислороднезависимый – по активности кислой фосфатазы (КФ) и катионных белков (КБ) [4]. О резервных функциях Мн судили по коэффициенту активации (КА - отношение индуцированных тестов к спонтанным).

Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) с вычислением показателей среднего±стандартного отклонения (M±SD), для исследования взаимосвязи изученных показателей применен корреляционный анализ. Различия между группами считались статистически значимыми при $p<0,05$.

Основные результаты и выводы. При ССД количество $CD95^+$ Мн было существенно выше (69,6±4,32), чем у здоровых лиц (39,3±8,32, $p<0,05$) на фоне достоверного снижения ДНК в Мн (4,28±0,45 mV, у доноров – 8,36±1,55 Mv, $p<0,05$). У больных ОСД существенных различий в уровнях ДНК Мн и количестве $CD95^+$ Мн по сравнению с показателями здоровых лиц не установлено.

Показатели кислородзависимого метаболизма Мн (сХЛ – 1,1±1,1, иХЛ – 1,8±2,7×10^4 имп/мин, КА – 2,1±4,1) у больных ОСД не отличались от показателей лиц группы контроля (соответственно 0,7±0,3 и 1,8±1,5×10^4 имп/мин, КА – 2,5±1,8; $p>0,05$), тогда как при ССД констатировано увеличение спонтанной продукции активных форм кислорода (сХЛ – 1,92±1,7×10^4 имп/мин), на фоне снижения индуцированных показателей (иХЛ – 0,8±1,3×10^4 имп/мин) и резервных функций моноцитов (КА – 0,42±0,8; $p<0,05$) по сравнению с аналогичными данными у больных ОСД и здоровых людей

Не было установлено достоверных изменений кислороднезависимого метаболизма моноцитов (КФ175,3±59,5 OD×10^{-3} 196,8±88,9 OD×10^{-3}), (КБ 76,1±41,7 OD×10^{-3}; 73,9±58,9 OD×10^{-3}) у больных ОСД по сравнению с данными группы контроля (КФ 192,8±46,6 OD×10^{-3}; 173,1±49,8 OD×10^{-3}; КБ 61,7±18,0 OD×10^{-3}; 63,4±29,6 OD×10^{-3}). У больных ССД по сравнению со здоровыми лицами и больными ОСД выявлено увеличение в клетках КФ (249,7±98,3 OD×10^{-3}; 263,8±158 OD×10^{-3}) и КБ (106,8±80,2 OD×10^{-3}; 115,1±105,1 OD×10^{-3}) по данным спонтанных и индуцированных тестов на фоне неизмененных КА клеток.

Выполненные исследования свидетельствуют об активации процессов апоптоза Мн при ССД, но не при ОСД, на фоне увеличения метаболических функций (как кислородзависимых, так и кислороднезависимых) клеток с уменьшением показателей индуцированной хемилюминесценции и функционального резерва клеток. Активация метаболических функций фагоцитов по данным литературы сопровождается увеличением продукции гистотоксических факторов, вносящих существенный вклад в развитие склерогенеза, а также повреждений клеток и сосудистой системы [5].

Проведенные исследования свидетельствуют о возможном участии макофагов/моноцитов в механизмах развития склеродермии, а также о перспективности использования в качестве дополнительных лабораторных методов для дифференциации ОСД и ССД тестов, характеризующих маркеры апоптоза и метаболические функции циркулирующих моноцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takehara K., Sato S. Localized scleroderma is an autoimmune disorder / K. Takehara, S. Sato // Rheumatology (Oxford).– 2005.– Т. 44, № 3.– P. 274-279.
2. Современные аспекты аутоиммунных заболеваний кожи / С. В. Сучков, Т. С. Грачева, А. Е. Дорофеев и др. // Российский журнал кожных и венерических болезней.– 2004.– № 2.– С. 4-7.
3. Hardin J.A., Downs J. T. Isolation of human monocytes on reorienting gradients of percoll / J. A. Hardin, J. T. Downs // J. Immunol. Methods.– 1981.– 40.– P. 1-6.
4. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В., Истамов Х. И. Экологическая иммунология / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, Х. И. Истамов.– М: ВНИРО, 1995.– 219 с.
5. Маянский А. Н., Пикуза О. И. Клинические аспекты фагоцитоза / А. Н. Маянский, О. И. Пикуза.– Казань: Магариф, 1993.

FUNCTIONAL STATE OF MONOCYTES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC AND LIMITED SCLERODERMA

Erygina E. N., Romanova N. V., Romanov V. A.

Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

With systemic scleroderma demonstrated activation of apoptosis (increase of the expression of $CD95^+$ antigen, DNA reduction cells) and metabolic functions of monocytes in the form of increasing the production of reactive oxygen species, acid phosphatase and cationic proteins cells. Significant changes in rates of apoptosis and metabolic functions of monocytes in limited scleroderma not detected.

Keywords: monocytes, scleroderma.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В МОНОЦИТАРНО-ТРОМБОЦИТАРНЫХ АГРЕГАТАХ У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ И ЕГО ФАКТОРАМИ РИСКА

Суслова Т. Е., Кологривова И. В., Кравченко Е. С., Кошельская О. А.

НИИ кардиологии, Томск, Россия

Исследовали моноцитарно-тромбоцитарные агрегаты периферической крови у пациентов с атеросклерозом и его факторами риска. Оценивалась спонтанная и стимулированная LPS продукция IL-1β и TNF-α в моноцитарно-тромбоцитарных агрегатах. В группе пациентов коэффициент LPS активации продукции IL-1β и TNF-α в моноцитарно-тромбоцитарных агрегатах, был выше, чем в группе здоровых добровольцев.

Ключевые слова: моноцитарно-тромбоцитарные агрегаты, провоспалительные цитокины, атеросклероз.

Тромбоциты длительное время рассматривались преимущественно как начальное звено свертывающей системы крови и как мишень для воздействий с целью предупреждения тромбообразования. Однако в настоящее время не вызывает сомнений значительно более широкий диапазон функциональных свойств тромбоцитов, их участие в воспалительных реакциях, как системных, так и протекающих непосредственно в стенке сосуда. При повреждении васкулярной стенки тромбоциты прикрепляются к ней, способствуют появлению моноцитарно-тромбоцитарных агрегатов, адгезии моноцитов и их трансэндотелиальной миграции [1]. Несмотря на то, что тромбоциты являются безъядерными клетками, с помощью посттрансляционных путей они могут синтезировать белки, в том числе и провоспалительные цитокины. Имеются данные, что взаимодействие тромбоцитов и моноцитов ускоряет ключевые этапы атерогенеза [2, 3]. Поэтому изучение моноцитарно-тромбоцитарных агрегатов, в частности их способности к продукции провоспалительных цитокинов, может раскрыть механизм их образования и прояснить их патогенетическую роль в сосудистых заболеваниях, что будет способствовать поиску адекватного лечения.

Целью данной работы стала оценка продукции интерлейкина 1β и фактора некроза опухоли α в моноцитарно-тромбоцитарных агрегатах периферической крови у пациентов с документированным атеросклерозом и его факторами риска (артериальной гипертензией, сахарным диабетом 2 типа).

Материалы и методы. Было обследовано 28 пациентов с документированным атеросклерозом и его факторами риска (артериаль-

ной гипертензией, сахарным диабетом 2 типа) и 20 здоровых добровольцев. Все пациенты были обследованы на фоне постоянной гипотензивной и сахароснижающей терапии. Проводилась оценка внутриклеточной цитокинопродукции в мононуклеарно-тромбоцитарной фракции клеток, выделенных на градиенте плотности (Histopaque 1077, Sigma), на приборе FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). Оценивалась спонтанная и стимулированная липополисахаридом (LPS) продукция фактора некроза опухоли α (TNF-α) и интерлейкина 1β (IL-1β). Клетки инкубировали с LPS *E. Coli* (10 мкг/мл) в полной среде RPMI 1640 при 37 °C и 5% CO_2 в течение 5 часов. После первого часа инкубации в среду для аккумуляции синтезирующихся белков в эндоплазматическом ретикулуме добавляли Брефельдин А. Фенотип клеток определяли с использованием анти-CD14-APC и анти-CD42b-FITC антител (Becton Dickinson, San Jose, CA). После поверхностного окрашивания клетки пермеабилизировали FACS-пермеабилизирующим раствором (Becton Dickinson, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Затем клетки инкубировали с анти-IL-1β-PE и анти-TNF-α-PE антителами (Becton Dickinson, San Jose, CA), после окрашивания клетки отмывали однократно и фиксировали 1% парафармальдегидом. Был использован IgG1 изотипический контроль, меченный PE. Экспрессия цитокинов регистрировалась с помощью последовательного гейтирования по параметрам светорассеяния, а также параметрам флуоресценции. По параметрам прямого и бокового светорассеяния, а также по флуоресценции нестимулированных клеток в общей фракции клеток выделяли регионы моноцитов и тромбоцитов. Клетки, положительные по экспрессии CD 42b и входящие в регион моноцитов, относили к моноцитарно-тромбоцитарным агрегатам (LPS вызывал шеддинг мембранных молекул CD 14 с моноцитов). Оценивали процент цитокинпродуцирующих клеток от общего количества клеток, а также среднюю интенсивность флуоресценции. Была проведена оценка степени активации клеток при стимуляции LPS, коэффициент которой рассчитывался как отношение показателей стимулированной продукции цитокинов к показателям спонтанной цитокинопродукции. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ SPSS 11.5 for Windows.

По результатам нашего исследования спонтанная продукция IL-1β и TNF-α моноцитарно-тромбоцитарными агрегатами не различалась в группе пациентов с атеросклерозом и контрольной группе. Наблюдалась тенденция к более высокой LPS стимулированной продукции IL-1β моноцитарно-тромбоцитарными агрегатами в группе пациентов по сравнению со здоровыми добровольцами. В группе пациентов коэффициент LPS активации продукции TNF-α клетками, входящими в состав моноцитарно-тромбоцитарных агрегатов, был достоверно выше (p=0,004) и его среднее значение по группе составило 13,67, в то время как в группе здоровых добровольцев он достигал лишь 4,08. Показано, что тромбоциты обладают высокой способностью к адгезии не только к эндотелиальным клеткам, но и к другим клеткам крови, в том числе и к моноцитам [4]. Оценка продукции цитокинов клетками, входящими в состав агрегатов может иметь большое значение, так как и моноциты, и тромбоциты, в данном случае находятся в активированном состоянии. Аккумуляция активированных моноцитарно-тромбоцитарных агрегатов в местах сосудистого повреждения, учитывая их способность к продукции биологически активных веществ, может способствовать хемотаксису моноцитов в субэндотелий и усиливать активацию самих тромбоцитов по принципу ауторегуляции. Высокая способность моноцитарно-тромбоцитарных агрегатов к синтезу провоспалительных цитокинов может оказывать существенное влияние на активацию процессов атерогенеза и, следовательно, увеличивать риск сердечно-сосудистых событий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Platelet-monocyte complexes support monocyte adhesion to endothelium by enhancing secondary tethering and cluster formation / P. C. Martins, N. van den Berk, L. H. Ulfman et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2004.– V. 24.– P. 193-199.
2. The uncoupling of monocyte–platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes [Электронный ресурс] / J. Stephen, J. Stephen, B. Emerson et al. // J. Immunol.– 2013.– Режим доступа: doi:10.4049/jimmunol.1301250.
3. Platelet interaction with innate immune cells / J. B. Kral, W. C. Schrottmaier, M. Salzmann et al. // Transfus. Med. Hemother.– 2016.– V. 43.– P. 78-88.
4. May A. E., Seizer P., Gawaz M. Platelets: Inflammatory Firebugs of Vascular Walls / A. E. May, P. Seizer, M. Gawaz // Atheroscler. Thrombosis, and Vascular Biology.– 2008.– V. 28.– P. 5-10.

INTRACELLULAR PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN MONOCYTE-PLATELET AGGREGATES IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS AND ITS RISK FACTORS

Suslova T. E., Kologrivova I. V., Kravchenko E. S., Koshelskaya O. A.

RI Cardiology, Tomsk, Russia

Monocyte-platelet aggregates in peripheral blood from patients with atherosclerosis and its risk factors. Spontaneous and LPS-induced intracellular production of IL-1β and TNF-α in monocyte-platelet aggregates was evaluated. Coefficient of LPS-induced activation of IL-1β and TNF-α production in monocyte-platelet aggregates was higher in patients than in the group of healthy volunteers.

Keywords: monocyte-platelet aggregates, proinflammatory cytokines, atherosclerosis.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА LEU 260PHE ГЕНА GLP-1R С УРОВНЕМ ГЛЮКОЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА ПРИ ОЖИРЕНИИ

Скуратовская Д. А.[1], Василенко М. А.[1], Кириенкова Е. В.[1], Фаттахов Н. С.[1], Миронюк Н. И.[2], Затолокин П. А.[2], Литвинова Л. С.[1]

[1]ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий; [2]Областная клиническая больница Калининградской области, Калининград, Россия

Изучена взаимосвязь полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R с повышенным риском развития сахарного диабета 2 типа при метаболическом ожирении; произведена оценка его взаимосвязи с сывороточным уровнем глюкозы.

Ключевые слова: Сахарный диабет 2 типа, инкретины, полиморфизм, глюкоза.

Введение. Метаболическое ожирение (МО) является основным фактором риска развития сахарного диабета 2 типа (СД 2 типа) [1]. На фоне МО формируется инсулинорезистентность, приводя к гиперинсулинемии и развитию СД 2 типа [2]. Гормон желудочно-кишечного тракта – глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) стимулирует пролиферацию β-клеток и усиливает их устойчивость к апоптозу, а также повышает секрецию инсулина, поддерживая уровень глюкозы в пределах референсных значений [3]. Некоторые полиморфизмы в генах, отвечающих за синтез рецепторов к инкретинам, приводят к нарушениям углеводного обмена [4]. В связи с вышесказанным, целью исследования явилось изучение ассоциации полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R с повышенным риском развития СД 2 типа при МО и с сывороточным уровнем глюкозы.

Материалы и методы. Исследуемая группа включала 283 человека в возрасте от 28 до 57 лет. Контрольная группа включала 103 условно здоровых донора с нормальными антропометрическими и биохимическими показателями. Группа больных МО с СД 2 типа включала 86 пациентов с диагнозом СД 2 типа (индекс массы тела (ИМТ)=44,9+10,1 кг/м^2, возраст 44,3±8,5 лет); 94 пациента с нормогликемией (ИМТ=35,1+6,8 кг/м^2, возраст 42,8±8,5 лет). Все лица, принимавшие участие в исследовании, относились к славянской популяции, со всеми было подписано информированное согласие.

Определение вариантов генного полиморфизма осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием амплификатора LightCycler 480 Instrument II ("Roche", Швейцария) и наборов для определения однонуклеотидного полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R (ЗАО «Синтол», Россия). Исследование уровня глюкозы в сыворотке крови проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Furuno CA-180 («Furuno Electric Company», Япония) с применением тест-систем DiaSys («DiaSys Diagnostic Systems», Германия). Статистическая обработка результатов осуществлена при помощи программы Statistica 10.

Результаты. В результате генотипирования полиморфного варианта Leu260Phe гена GLP-1R установлено соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга: в группе здоровых доноров (χ^2=3,96, p=0,05), больных МО с СД 2 типа (χ^2=0,19, p=0,67) и группе пациентов с МО без СД 2 типа (χ^2=0,15, p=0,7).

В контрольной группе распределение частот генотипов полиморфного варианта Leu260Phe гена GLP-1R было следующим: CC – 23,3 %, CA – 60,2 % и AA – 16,5 %. В группе больных МО с СД 2 типа распределение частот генотипов полиморфизма Leu260Phe составило: CC – 38,4%, CA – 45,3% и AA – 16,3%, у пациентов с МО без СД 2 типа оказалось CC – 28,7%, CA – 47,9% и AA – 23,4%.

Распределения частот аллелей полиморфизмам Leu260Phe гена GLP-1R были следующими: в контрольной группе для аллеля C – 54 % и аллеля A – 46 %; в группе больных МО с СД 2 типа для аллеля C – 61 % и аллеля A – 39 %, в группе пациентов с АО без СД 2 типа составило для аллеля C – 52,7 % аллеля A – 47,3 %.

В группе больных МО с СД 2 зарегистрирована наибольшая частота встречаемости генотипа CC полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R по сравнению с контролем. Установлена ассоциация генотипа CC с повышенным риском развития СД 2 типа (OR=1,99, 95 % CI:1,03-3,82, p=0,036), который чаще встречался в группе больных ожирением с СД 2 типа по сравнению с контролем. В группе пациентов с МО с СД 2 типа выявлена низкая частота генотипа CA полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R. Обнаружена взаимосвязь генотипа CA с пониженным риском развития СД 2 типа (OR=0,55, 95 % CI:0,30-1,00, p=0,049). При сравнении группы пациентов с МО без СД 2 типа с группой здоровых доноров не установлено различий в распределение частот генотипов полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R.

Исследование сывороточного уровня глюкозы в группе больных АО с СД 2 типа в зависимости от генотипа полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R выявило понижение данного показателя у пациентов с генотипом CC (6,51 (5,38-8,58) ммоль/л), по сравнению с носителями генотипа CA (7,43 (6,10-10,41) ммоль/л, p=0,044).

Функциональная роль полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R на данный момент неизвестна, положение полиморфизма в пределах 7 экзона гена GLP-1R показывает, что он может влиять на передачу сигнала от GLP-1 к своему рецептору и способствовать изменению продукции инсулина [5].

Выводы. Установлена ассоциация генотипа CC полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R с повышенным риском развития СД 2 типа при МО и ассоциация генотипа CA с пониженным риском развития СД 2 типа. В группе больных МО с СД 2 типа выявлена взаимосвязь генотипа CC полиморфизма Leu260Phe гена GLP-1R с пониженным уровнем глюкозы по сравнению с носителями генотипа CA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Polychronakos C., Alriyami M. Diabetes in the post-GWAS era / C. Polychronakos, M. Alriyami // Nat Genet.– 2015.– V. 1; 47(12).– P. 1373-1374.
2. The incretin effect in critically ill patients: a case-control study / S. T. Nielsen, S. Janum, R. Krogh-Madsen et al. // Crit Care.– 2015.– V. 16; 19(1).– P. 402.
3. Baggio, L.L., Drucker, D. J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP / L. L. Baggio, D. J. Drucker // Gastroenterology.– 2007.– V. 132(6).– P. 2131-2157.
4. Differential impact of amino acid substitutions on critical residues of the human glucagon-like peptide-1 receptor involved in peptide activity and small-molecule allostery / C. Koole, D. Wootten, J. Simms et al. // J Pharmacol Exp Ther.– 2015.– V. 353(1).– P. 52-63.
5. Glucagon-like peptide-1 receptor gene polymorphism (Leu260Phe) is associated with morning cortisol in preschoolers / H. I. Sheikh, L. R. Dougherty, E. P. Hayden et al. // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.– 2010 – V. 16; 34(6).– P. 980-983.

RESEARCH OF ASSOCIATION GENETIC POLYMORPHISM LEU 260PHE IN THE GLP-1R GENE WITH THE LEVEL OF C-PEPTIDE AND GLUCOSE IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES WITH OBESITY

Skuratovskaia D. A.[1], Vasilenko M. A.[1], Fattakhov N. S.[1], Kirienkova E. V.[1], Mironyuk N. I. [2], Zatolokin P. A.[2], Litvinova L. S.[1]

[1]Immanuel Kant Baltic Federal University, Laboratory immunology and cell biotechnology; [2]Kaliningrad Regional Hospital, Kaliningrad, Russia

Association study of Leu260Phe single nucleotide polymorphism of the GLP-1R gene with risk of developing type 2 diabetes mellitus with metabolic obesity; assessment the relationship of this polymorphic variant with serum levels of glucose.

Keywords: Diabetes mellitus type 2, incretins, polymorphism, glucose.

РОЛЬ ФАКТОРОВ ИММУНИТЕТА В ФОРМИРОВАНИИ АНГИОПАТИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У ПОДРОСТКОВ

Левкович М. А., Галкина Г. А., Воропай А. А.

ФГБУ «Ростовский НИИ акушерства и педиатрии» МЗ РФ, Ростов-на-Дону, Россия

В статье приведены новые данные о роли провоспалительных цитокинов и хемокинов в формировании сосудистых осложнений при СД1 у подростков. Выявлено, что повышение уровня TNF-α и фракталкина ассоциировано с риском развития микроангиопатий.

Ключевые слова: сахарный диабет у подростков, ангиапатия, цитокины, хемокины.

Инсулинзависимый сахарный диабет (СД1) – самое частое из эндокринных заболеваний подростков. Он составляет в целом от 10 до 20 % всех случаев диабета[1]. Всемирная Организация Здравоохранения характеризует СД1 как эпидемию неинфекционного заболевания. Средний годовой темп прироста заболеваемости у детей по РФ в последние 5 лет составляет 2,8 %, кроме того, наблюдается снижение возраста манифестации СД1. СД у подростков, особенно на фоне пубертата, так же, как и у детей младшего возраста, характеризуется чрезвычайно нестабильным течением и требует больших усилий при достижении компенсации заболевания, что связано как с наличием микрососудистых осложнений (нефропатия, нейропатия, ретинопатия), так и с ранним появлением атеросклеротического поражения сосудов[2]. Именно этим обоснована необходимость ранней диагностики и профилактики этих заболеваний. На сегодняшний день существуют только единичные работы, посвященные данной проблеме у детей. Основная же масса представленных работ проводилась на взрослых пациентах, несмотря на то, что формирование сосудистых осложнений начинается в детском возрасте, когда данные изменения еще обратимы и есть возможность предотвратить их прогрессирование. В последние годы активно обсуждается роль иммунных механизмов, в частности, хронического воспаления в развитии как СД1, так и его сосудистых осложнений. Показано, что иммуновоспалительные реакции участвуют в развитии аутоиммунной деструкции панкреатических островков при СД1 и в формировании ангиопатии. В развитии воспалительного процесса участвуют клетки иммунной системы: лимфоциты, моноциты, а также клетки эндотелия. Межклеточные взаимодействия при воспалении осуществляются с помощью молекул адгезии, цитокинов, факторов роста. При этом воспалительная теория дополняется данными об участии иммунных и метаболических факторов прежде всего липидной природы в раз-

витии поражения сосудистой стенки. Воспалительный процесс, возникающий в сосудистой стенке, является следствием ответной реакции эндотелия на повреждающее действие атерогенных факторов, к которым относятся, прежде всего, гипергликемия, дислипидемия, окислительный стресс, нарушения коагуляционной системы [3].

В этой связи, **целью** исследования явилось определение роли цитокинов и хемокинов в формировании микроангиопатии СД1.

В исследование был включен 61 подросток в возрасте от 14 до 18 лет, с декомпенсацией СД1 и дислипидемией, которые были подразделены на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия микроангиопатий. В первую – вошли 13 пациентов без признаков микроциркуляторных нарушений, во вторую – 48 пациентов с различными микроангиопатиями. Группу контроля сформировали 22 «условно здоровых» подростка того же возраста. Определение цитокинов в сыворотке крови пациентов проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Реакцию проводили согласно рекомендациям производителя. IL-1β, TNF-α, с использованием тест-систем фирмы Цитокин (С.-Петербург, Россия), фракталкин – с использованием тест-систем фирмы «RayBiotech, Inc.», (США). При определении статистической обоснованности различия исследуемых групп применялся критерий Манна-Уитни для независимых групп и критерий Вилкоксона для зависимых групп.

Среди микрососудистых осложнений СД1, обнаруженных у пациентов 2 группы, необходимо отметить преобладание диабетической нейропатии у 32 подростков (66,7 %), диабетической ретинопатии – у 30 человек (62,5 %), диабетической нефропатии – 18 (37,5 %).

Известно, что цитокины, которые являются основными межклеточными медиаторами иммунной системы, участвуя во многих физиологических и патологических реакциях организма, оказывают влияние на инсулинорезистентность и дисфункцию эндотелия, обычно связаных с СД1. Нарушение липидного обмена, в значительной мере зависит от баланса цитокинов. В частности IL-1 β рассматривается как ключевой медиатор, вызывающий торможение секреции инсулина и стимуляцию экспрессии гена, кодирующего синтетазу оксида азота NOS2, которая приводит к образованию NO и гибели β-клеток путем некроза и апоптоза. В нашем исследовании у пациентов обеих исследуемых групп было выявлено достоверное повышение уровня IL-1β в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой (8,8(6,2;10,6) пг/мл и 6,4(5,2;8,8) против 2,8(1,4;3,7) пг/мл, соответственно, $p<0,05$).

Уровень TNF-α у пациентов 2 группы превышал показатели контрольной и 1группы (44,2(34,3;54,2) пг/мл против 6,2(4,4;7,1) пг/мл и 7,9(6,1;28,9) пг/мл, соответственно, $p<0,05$). TNF-α являясь провоспалительным цитокином, индуцирует апоптоз инсулинпродуцирующих клеток, характеризуя раннюю стадию их деструкции, стимулирует в лейкоцитах и эндотелиальных клетках секрецию других цитокинов, усиливает экспрессию адгезивных молекул на поверхности клеток, обусловливая воспалительную инфильтрацию тканей, активирует метаболизм арахидоновой кислоты, продукцию простагландинов и тромбоксана, что в итоге приводит к повреждению сосудов и тромбообразованию.

Современные исследования демонстрируют, что хемокины, в частности, фракталкин, играют важную роль в патогенезе поражения сосудистого эндотелия при СД1, приводя к миграции воспалительных клеток через медиальную оболочку сосудов, вызывая сосудистую дисфункцию путем стимуляции продукции супероксидных анионов, что приводит к снижению биодоступности NO [4]. Уровень фракталкина у пациентов 2 группы статистически значимо превышал показатели 1 и контрольной группы (3,2(2,5;3,6) пг/мл против 0,8(0,2;0,8) пг/мл и 1,2(0,9;2,0) пг/мл, соответственно, $p<0,05$).

Таким образом, повышение уровня TNF-α и фракталкина у подростков с СД1 может рассматривается как предиктор развития микроангиопатии, а дальнейшее изучение иммунных механизмов наряду с метаболическими сдвигами позволит выявлять доклинические признаки поражения сосудов и своевременно использовать адекватные лечебные мероприятия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эндокринология: национальное руководство / Под ред. И. И. Дедова, Г. А. Мельниченко.– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008.– 1072 с.
2. Early signs of left ventricular dysfunction in adolescents with type 1 diabetes mellitus: the importance of impaired circadian modulation of blood pressure and heart rate / K. Karavanaki, G. Kazianis,

I. Konstantopoulos et al. // J Endocrinol Invest.– 2008.– V. 31 (4).– P. 289-296.
3. Шварц В. Жировая ткань как эндокринный орган / В. Шварц // Проблемы эндокринологии.– 2009.– Т. 55. N 1.– С. 38-44.
4. The CX3C chemokine fractalkine induces vascular dysfunction by generation of superoxide anions // A. SchKfer, C. Schulz, D. Fraccarollo et al. // ArteriosclerThromb Vasc Biol.– 2007.– V. 27 (1).– P. 55-62.

THE ROLE OF IMMUNE FACTORS IN THE FORMATION OF ANGIOPARTHY IN DIABETES MELLITUS IN ADOLESCENTS

Levkovich M.A., Galkina G.A, Voropai A.A.

Rostov research Institute of obstetrics and pediatrics, Rostov-on-Don, Russia

The article presents new data on the role of proinflammatory cytokines and chemokines in the formation of vascular complications in diabetes mellitus type 1 in.adolescents. It is revealed that increase of level TNF-α and fractalkine associated with risk of development of microvascular complications.

Keywords: diabetes mellitus in adolescents, angiopatia, cytokines, chemokines.

УРОВЕНЬ РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИЛ-1 и ИЛ-10 В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ И РЕАКТИВНЫМ АРТРИТОМ

Криволапова И. М.[1,2], Пашнина И. А.[1,2], Черешнев В. А.[2]

[1]Отдел клинической иммунологии, Областная детская клиническая больница № 1; [2]Лаборатория иммунологии воспаления, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Обследованы дети и подростки 6-17 лет с ЮИА (n=68), реактивным артритом (n=21) и условно здоровые дети соответствующего возраста (n=31, контроль). Спонтанную и ФГА-стимулированную концентрацию ИЛ-1ра, ИЛ-10 в супернатантах клеточных культур исследовали методом ИФА. Выявлено снижение уровня ИЛ-1ра после стимуляции клеток периферической крови митогеном у детей с ЮИА и реактивным артритом по сравнению с контролем. Обнаружена прямая корреляционная связь между спонтанным и ФГА-стимулированным уровнем ИЛ-1β и концентрацией ИЛ-1ра у больных с ЮИА.

Ключевые слова: цитокины, ювенильный идиопатический артрит, реактивный артрит.

Актуальной проблемой современной педиатрии является диагностика и лечение воспалительных заболеваний суставов. Одним из наиболее распространенных заболеваний в этой группе является аутоиммунно-аутовоспалительное поражение суставов – ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) [1]. В настоящее время активно исследуется цитокиновый профиль у детей с ЮИА. Согласно литературным данным наиболее часто уделяется внимание определению концентрации провоспалительных цитокинов, с целью определения их роли в патогенезе различных вариантов ЮИА, оценки активности заболевания, а также для мониторинга проводимой антицитокиновой терапии [2]. В то же время, определение уровня противоспалительных цитокинов при ЮИА, в частности рецепторного антагониста ИЛ-1 (ИЛ-1ра) и ИЛ-10, может иметь значение для оценки активности

заболевания [3]. Остаются малоизученными особенности цитокиновой продукции при реактивном артрите (РеА) – заболевании суставов, близком к ЮИА по клиническим проявлениям и имеющим в своем патогенезе инфекционную и аутоиммунную составляющие.

Целью нашей работы явилось определение спонтанного и стимулированного уровней ИЛ-1ра и ИЛ-10 в супернатантах культур клеток цельной крови у детей с ювенильным идиопатическим артритом и с реактивным артритом.

Обследованы дети 6-17 лет с ЮИА (n=68), РеА (n=21) и условно здоровые дети соответствующего возраста без признаков аутоиммунных заболеваний (n=31, контроль). Группу с ЮИА составили дети с полиартритом (n=23) и олигоартритом (n=45). Забор крови для исследований проводился в утренние часы строго натощак. Для определения содержания цитокинов в супернатантах клеточных культур цельную кровь разводили 1:9 глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия). Разведенную кровь инкубировали по 500 мкл в CO_2-инкубаторе при температуре 37 °С в течение 24 ч в присутствии фитогемагглютинина (ФГА) в конечной концентрации 20 мкг/мл и без стимулятора. Концентрацию ИЛ-1ра, ИЛ-10 в супернатантах исследовали методом ИФА (Вектор-Бест, Россия). Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, для оценки взаимосвязей между параметрами – метод ранговой корреляции по Спирмену. Статистическая обработка выполнена с использованием программы Statistica 6.0.

При определении спонтанного и стимулированного уровня ИЛ-1ра и ИЛ-10 у детей с олиго- и полиартикулярным вариантами ЮИА различий не обнаружено. Это послужило основанием для объединения всех больных с ювенильным идиопатическим артритом в одну группу.

В группе условно здоровых детей спонтанная концентрация ИЛ-1ра и ИЛ-10 составила 508 пг/мл и 1 пг/мл, у пациентов с ЮИА – 443 пг/мл и 0,4 пг/мл, в группе детей с РеА – 705 пг/мл и 1,0 пг/мл, соответственно, различий между группами не обнаружено.

При анализе уровня ИЛ-10 после стимуляции ФГА не было выявлено различий между больными с ЮИА, РеА и контрольной группой (243 пг/мл, 166 пг/мл и 276 пг/мл, соответственно). Концентрация ИЛ-1ра после стимуляции клеток крови митогеном у пациентов с ЮИА и РеА была достоверно ниже, чем у детей из контрольной группы (2676 пг/мл, $p<0,05$; 1937 пг/мл, $p<0,001$ и 3363 пг/мл, соответственно).

Известно, что ИЛ-1ра взаимодействует с рецепторами ИЛ-1, но не способен передавать в клетку сигнал, в результате ИЛ-1ра выступает в роли специфического антагониста ИЛ-1 [4]. Выработку ИЛ-1ра индуцируют те же факторы, что и выработку ИЛ-1, а его основными клетками-продуцентами являются моноциты и макрофаги, данные клетки также осуществляют продукцию и ИЛ-1 [4]. Нами ранее определена концентрация ИЛ-1β в супернатантах клеточных культур у пациентов с ЮИА, РеА и у здоровых детей; спонтанный уровень ИЛ-1β в данных группах составил 9 пг/мл, 8 пг/мл и 2 пг/мл, соответственно, стимулированный ФГА – 375 пг/мл, 241 пг/мл и 555 пг/мл, соответственно [5]. У детей с ЮИА была выявлена прямая корреляционная связь между концентрацией ИЛ-1β и ИЛ-1ра в спонтанном ($r=0,52$, $p<0,001$) и стимулированном ($r=0,31$ $p<0,05$) вариантах инкубации клеток периферической крови. В группах условно здоровых детей и пациентов с РеА такой взаимосвязи не обнаружено.

Таким образом, выявлено снижение ФГА-стимулированной продукции клетками крови ИЛ-1ра у больных с ЮИА и РеА по сравнению с условно здоровыми детьми. Сниженная продукция ИЛ-1ра после стимуляции ФГА у пациентов с заболеваниями суставов указывает на нарушение регуляции функционирования иммунной системы в условиях хронического воспаления. Это может быть свидетельством истощения резервов клеток-продуцентов ИЛ-1ра. Увеличение концентрации рецепторного антагониста ИЛ-1 при увеличении уровня ИЛ-1β в группе больных с ЮИА может иметь компенсаторный характер и ограничивать возрастающее токсическое действие ИЛ-1β на органы и ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Е. И., Литвицкий П. Ф. Ювенильный ревматоидный артрит: этиология, патогенез, клиника, алгоритмы диагностики и лечения / Е. И. Алексеева, П. Ф. Литвицкий.– Москва: ВЕДИ, 2007.– 368 с.

2. Федоров Е. С., Салугина С. О., Кузьмина, Н. Н. Роль цитокиновой сети в регуляции воспаления при различных вариантах ювенильного артрита / Е. С. Федоров, С. О. Салугина, Н. Н. Кузьмина // Научно-практическая ревматология.– 2009.– № 3.– С. 74-89.
3. Crawley E., Kon S., Woo P. Hereditary predisposition to low interleukin-10 production in children with extended oligiarticular juvenile idiopathic arthritis / E. Crawley, S. Kon, P. Woo // Reumatology.– 2001.– № 40.– P. 574-578.
4. Ярилин А. А. Иммунология / А. А. Ярилин.– Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010.– 752 с.
5. Криволапова И. М., Пашнина И. А., Черешнев В. А. Уровень ИЛ-1β и ФНОα в супернатантах клеточных культур у детей с ювенильным идиопатическим артритом и реактивным артритом / И. М. Криволапова, И. А. Пашнина, В. А. Черешнев // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9(18), № 2(1).– С. 267-269.

THE LEVELS OF IL-1 RECEPTOR ANTAGONIST AND IL-10 IN THE SUPERNATANTS OF THE CELL CULTURE IN CHILDREN WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS AND REACTIVE ARTHRITIS

Krivolapova I. M.[1,2], Pashnina I. A.[1,2], Chereshnev V. A.[2]

[1]Regional Child's Clinical Hospital № 1; [2]Institute of Immunology and Physiology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

Children with juvenile idiopathic arthritis (n=68), reactive arthritis (n=21) and healthy children (n=31) of 6-17 years old were examined. Spontaneous and FGA-stimulated concentration of IL-1ra and IL-10 in the supernatants of the cell culture were determined by ELISA. FGA-stimulated IL-1rα production by immunocompetent cells was significant decreased in children with juvenile idiopathic arthritis and reactive arthritis in comparison with control. The spontaneous and FGA-stimulated level of IL-1β correlated with spontaneous and FGA-stimulated level of IL-1ra in children with juvenile idiopathic arthritis.

Keywords: cytokines, juvenile idiopathic arthritis, reactive arthritis.

АНТИТЕЛА К ГЛИКОПРОТЕИНУ 2 – НОВЫЙ МАРКЕР ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ РОЛИ КИШЕЧНИКА ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Волкова М. В.[1], Роггенбук Д.[2], Кундер Е. В.[3], Петрович Д. М.[3]

[1]Республиканский центр медицинской реабилитации, Минск, Беларусь; [2]Бранденбургский технический университет, Зенфтенберг, Германия; [3]Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Широко обсуждается роль поврежденного кишечного барьера в индукции аутоиммунных процессов. Полученные в последнее время данные о роли гликопротеина 2 в формировании иммунного ответа и преобладание антител к гликопротеину 2 при воспалительных заболеваниях кишечника открывают новые перспективы использования антител к гликопротеину 2 в качестве новых иммунологических маркеров. Целью исследования стало определить частоту встречаемости антител к гликопротеину 2 у пациентов с аутоиммунными заболеваниями опорно-двигательного аппарата. В результате исследования антитела к гликопротеину 2 обнаружены у 37 % с аутоиммунными заболеваниями опорно-двигательного аппарата. Наиболее высокая частота встречаемости анти-ГП2 антител установлена при псориатическом артрите. Полученные данные открывают новые патогенетические взаимосвязи между эпителиальным барьером кишечника и аутоиммунными заболеваниями.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, гликопротеин 2, антитела.

Актуальность. Слизистые оболочки организма обеспечивают функционирование наибольшей части иммунной системы. Три четверти всех лимфоцитов и граммы секреторного IgA ежедневно защищают поверхность слизистых от патогенов. Для запуска иммунного ответа антигены с поверхности слизистой оболочки должны быть доставлены через эпителиальный барьер в организованные лимфоидные структуры, такие как Пейеровы бляшки. Этот процесс, называемый трансцитозом антигена, в кишечнике обеспечивается специализированными эпителиальными М-клетками. Молекулярные механизмы регулирующие захват антигена изучены не полностью. Однако известно, что гликопротеин 2 (ГП2), который специфически экспрессируется на апикальной мембране М-клеток среди энтероцитов, выступает в качестве трансцитолитического рецептора для антигенов на слизистой оболочке. Было доказано, что рекомбинантный ГП2 избирательно связывается с подгруппой комменсальных и патогенных энтеробактерий, включая *Escherichia coli* и *Salmonella enterica*, путем распознавания FimH компонента пилей I типа наружной бактериальной мембраны. Установлено, что бактерии колокализуются с эндогенным ГП2 как на апикальной мембране, так и в цитоплазматических везикулах М-клеток. Более того, оказалось, что дефицит бактериального FimH или ГП2 макроорганизма приводит к нарушению трансцитоза этих бактерий через М-клетки, что приводит к нарушению антигенспецифического иммунного ответа в Пейеровых бляшках [1]. В 2009 году Roggenbuck и соавторы идентифицировали гликопротеин 2 (ГП2) как главную аутоантигенную мишень панкретических аутоантител [2]. Антитела к ГП2 классом А и G были описаны как новые серологические параметры при болезни Крона [3]. Анти-ГП 2 антитела выявлены у 25-30 % пациентов с болезнью Крона и у 5-12 % пациентов с язвенным колитом.

Учитывая значимую роль кишечника в развитии системных аутоиммунных заболеваний, наличия поражения опорно-двигательного аппарата при воспалительных заболеваниях кишечника и наоборот, вовлечение желудочно-кишечного тракта у пациентов с ревматическими заболеваниями представляется целесообразным исследовать встречаемость антител к гликопротеину 2 у пациентов с аутоиммунными заболеваниями опорно-двигательного аппарата.

Цель исследования: определить частоту встречаемости антител к гликопротеину 2 классов А и G у пациентов с аутоиммунными заболеваниями опорно-двигательного аппарата.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 137 пациентов с аутоиммунными заболеваниями опорно-двигательного аппарата: 68 пациентов с анкилозирующим спондилитом (АС), 23 пациента с псориатическим артритом (ПсА) и 46 пациентов с ревматоидным артритом (РА). Все пациенты соответствовали соответствующим современным классификационным критериям. Контрольную группу составили 160 здоровых доноров.

Уровни анти-ГП антител (иммуноглобулины классов А и G) определяли методом иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного человеческого ГП2 ((Medipan GmbH, Германия). Положительными результатами считали уровень ≥ 20 единиц в миллилитре, согласно инструкции производителя.

Результаты. Частота встречаемости анти-ГП 2 IgA была выше у пациентов с аутоиммунными заболеваниями опорно-двигательного аппарата (52/137, 37,95 %) по сравнению с контрольной группой (6/160, 3,75 %) ($p < 0.001$). При сравнении уровней антител в подгруппах оказалось, что при ПсА наблюдалась более высокая частота встречаемости анти-ГП 2 IgA (13/23, 56,52 %) по сравнению с РА (12/46, 26,08 %, p=0,02). Однако частота встречаемости анти-ГП 2 IgA при АС (27/68, 39,2 %) не отличалась от частоты встречаемости этих антител при РА и ПсА (p>0,05).

Анти ГП 2 IgG чаще встречались у пациентов с аутоиммунными заболеваниями опорно-двигательного аппарата (26/137, 18,97 %) по сравнению с контрольной группой (4/160, 2,5 %) (p<0,001). В подгруппах при ПсА установлена более высокая частота встречаемости анти-ГП 2 IgG (10/23, 42,47 %) по сравнению с АС (8/68, 13,23 %; p=0,007) и РА (7/46, 15,21 %; p=0,028).

Также было проанализировано, как часто встречаются минимум 1 класс антител IgM или IgG. По этому показателю также наиболее высокие показатели наблюдались у пациентов с ПсА (16/23, 69,56 %) по сравнению с АС (30/68, 44,11 %) и РА (13/46, 28,2 %; ($p < 0,05$). При анализе частоты встречаемости обоих классов антител IgM и IgG оказалось, что наиболее высокий показатель демонстрируют пациенты с ПсА (6/23, 26,08 %) по сравнению

с пациентами с АС (4/68, 5,88 %; p < 0,05) и РА (6/46, 13,04 %)

Выводы. Анти-ГП 2 антитела являются новыми маркерами, которые специфичны для болезни Крона. Данные антитела были обнаружены нами приблизительно у 37 % пациентов с аутоиммунными заболеваниями опорно-двигательного аппарата. Наиболее высокая частота встречаемости анти-ГП 2 антител установлена при псориатическом артрите. Учитывая отсутствие специфических диагностических маркеров для спондилоартропатий, полученные результаты открывают новое направление для изучения иммунопатогенеза и усовершенствования диагностики данных заболеваний.

Полученные результаты указывают на существующие взаимосвязи между состоянием эпителиального барьера кишечника и развитием аутоиммунных заболеваний. Избирательное повышение уровней антител к гликопротеину 2 у части пациентов подтверждает современные представления о клинико-иммунологическом полиморфизме аутоиммунных заболеваний. Исследования в этом направлении в дальнейшем могут стать основой для формирования персонализированного подхода в лечении аутоиммунных заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response / K. Hase, K. Kawano, T. Nochi et al. // Nature.– 2009.– V.462.– P. 226-230.
2. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease / D. Roggenbuck, G. Hausdorf, L. Martinez-Gamboa et al. // Gut.– 2009.– V.58.– P. 1620-1628.
3. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease / D. Roggenbuck, D. Reinhold, T. Wex et al. // Clin. Chim. Acta.– 2011.– V.412.– P. 718-724.

ANTIBODIES TO GLYCOPROTEIN 2 AS A NEW MARKER OF PATHOGENIC ROLE OF GUT IN AUTOIMMUNE DISEASES

Volkova M. V.[1], Roggenbuck D.[2], Kundzer A. V.[3], Petrovich D. M.[3]

[1]Republican center of medical rehabilitation, Minsk, Belarus; [2]Brandenburg technical university, Senftenberg, Germany; [3]Belarusian medical academy of postgraduate education Minsk, Belarus

The role of the damaged intestinal barrier in the induction of autoimmune processes is widely discussed now. The recently obtained data on the role of glycoprotein 2 in the immune response and the prevalence of antibodies to glycoprotein 2 in inflammatory bowel disease open new perspectives using of antibodies to glycoprotein 2 as new immunological marker.The aim of the study was to determine the frequency of occurrence of antibodies to glycoprotein 2 in patients with autoimmune diseases of the musculoskeletal system. As a result of research antibodies to glycoprotein 2 were identified in 37 % patients with autoimmune diseases of the musculoskeletal system. The highest incidence of anti-GP 2 antibodies installed in psoriatic arthritis. These findings offer new pathogenetic relationships between the intestinal epithelial barrier and autoimmune diseases.

Keywords: autoimmune diseases, glycoprotein 2, antibodies.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *IL5 (C-703T)* С РАЗВИТИЕМ ТКАНЕВОЙ ЭОЗИНОФИЛИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Дмитриева А. И., Уразова О. И., Янкович К. И., Колобовникова Ю. В., Новицкий В. В., Пурлик И. Л.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер», Томск, Россия

Формирование опухолеассоциированной эозинофилии при раке толстой кишки детерминировано носительством генотипа *CC* и аллеля *C* полиморфизма *(C-703T)* гена *IL5*. Эозинофильная инфильтрация опухоли при раке толстой кишки чаще регистрируется в опухолях с высокой степенью дифференцировки клеток.

Ключевые слова: эозинофилия, рак толстой кишки, полиморфизм генов.

Рак толстой кишки, как и опухоли других локализаций, может сопровождаться эозинофилией крови и тканей. Разнонаправленные результаты эпидемиологических исследований не позволяют однозначно интерпретировать роль эозинофилов в канцерогенезе [1]. Механизмы развития эозинофилии при злокачественной трансформации клеток также малоизучены.

Ключевым медиатором созревания и активации эозинофилов является интерлейкин (IL) 5 [2]. В промоторной области гена *IL5* идентифицированы полиморфные сайты, замены единичных нуклеотидов в которых в значительной степени могут влиять на активность этого гена. По данным литературы, функциональный полиморфизм *C-703T* гена *IL5* ассоциирован с повышенным количеством эозинофилов в крови при аллергических и инфекционных заболеваниях [2, 3].

Целью настоящей работы явилась оценка ассоциативных связей полиморфных вариантов *C-703T* гена *IL5* с наличием эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани при раке толстой кишки.

Материалы и методы. Исследование проводилось на образцах тканей злокачественных новообразований толстой кишки, полученных при оперативном вмешательстве до начала проведения специфической лучевой и цитостатической терапии у больных, находившихся на лечении и состоящих на диспансерном учете в ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (ОГАУЗ «ТООД») (гл. врач – канд. мед. наук Л. А. Кудяков). В первую группу исследования вошли 42 пациента (62,3±9,6 года) с раком толстой кишки, сопровождающимся тканевой эозинофилией, вторую группу составили 54 пациента (57,6±6,2 лет) без эозинофилии.

Материалом для исследования служили образцы ДНК, выделенные из клеток морфологически неизмененной ткани толстой кишки (гистологически верифицированные участки нормальной ткани с границы резекции) у 96 пациентов с диагнозом рака толстой кишки. Для исследования использовали коммерческий набор «FFPET DNA – Extraction Kit» (Биолинк, Новосибирск) после предварительной депарафинизации образцов. Генотипирование образцов ДНК по полиморфизму *C703T* гена *IL5* осуществляли путем ПДРФ-анализа продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома, с последующей визуализацией в УФ-свете [2]. Выделение и генотипирование образцов ДНК проводились на базе клинико-диагностической лаборатории ОГАУЗ «ТООД» (заведующая – д-р мед. наук А. И. Дмитриева).

Гистологическую верификацию опухолей в образцах тканей осуществляли на базе патологоанатомического отделения ОГАУЗ «ТООД» (заведующий – д-р мед. наук И. Л. Пурлик).

Статистическую обработку результатов проводили с применением стандартного критерия χ^2 Пирсона и точного критерия Фишера. Подсчитывали отношение шансов (OR) для оценки ассоциации между определенными генотипами и риском развития эозинофилии. OR указан с 95 %-ным доверительным интервалом (CI).

Результаты. Известно, что IL-5 избирательно стимулирует образование эозинофильных гранулоцитов из их коммитированного предшественника, регулирует экспрессию рецепторов на клетках, активирует миграцию эозинофилов в ткани и реализацию ими цитотоксических эффектов [2]. В промоторной области гена *IL5* локализованы как минимум несколько областей с единичными нуклеотидными заменами цитозина на тимин (одна из которых в положении –703 (C→T)), влияющими на уровень секреции IL-5 [3].

В результате исследования полиморфизма *C-703T* гена *IL5* у больных раком толстой кишки в зависимости от наличия эозинофильной инфильтрации ткани были получены достоверные различия в распределении генотипов (χ^2=6,04; p<0,05) и аллелей (χ^2=7,22; p<0,05). Установлено увеличение частоты встречаемости генотипа *CC* (73,8 %) и аллеля *C* (84,5 %) у пациентов с раком толстой кишки, сопровождающимся эозинофильной инфильтрацией ткани, по сравнению с соответствующими показателями у пациентов без эозинофилии (50,0 % и 67,6 %, соответственно). Показана положительная ассоциация гомозиготного генотипа *CC* и аллеля C полиморфизма *C-703T* гена *IL5* с эозинофильной инфильтрацией ткани опухоли (OR=2,82 ($CI_{95\%}$ 1,18-6,72) и OR=2,62 ($CI_{95\%}$ 1,28-5,35) соответственно). Обращала на себя внимание взаимосвязь эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани с высокой степенью дифференцировки трансформированных клеток, в то время как в низкодифференцированных опухолях эозинофилия регистрировалась значительно реже.

Выводы. Носительство гомозиготного генотипа *CC* и аллеля *C* полиморфного варианта *C-703T* гена *IL5* детерминирует формирование опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при раке толстой кишки. Ассоциация тканевой эозинофилии с высокодифференцированными опухолями толстой кишки указывает на возможное вовлечение эозинофильных гранулоцитов в механизмы противоопухолевой резистентности организма.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации НШ-7906.2016.7 «Роль галектинов в патогенезе опухолевых заболеваний крови и других локализаций» (руководитель – академик РАН В. В. Новицкий).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response / S. Gatault, F. Legrand, M. Delbeke et al. // Cancer Immunol Immunother.– 2012.– V. 61, № 9.– P. 1527-1534.
2. Колобовникова Ю. В., Уразова О. И., Новицкий В. В. Эозинофил в норме и при патологии / Ю. В. Колобовникова, О. И. Уразова, В. В. Новицкий.– Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2014.– 124 с.
3. Полиморфизм генов интерлейкинов и их рецепторов: популяционная распространенность и связь с атопической бронхиальной астмой / М. Б. Фрейдин, В. П. Пузырев, Л. М. Огородова и др. // Генетика.– 2002.– Т. 38, № 12.– С. 1-9.

ASSOCIATION OF *IL5 (C-703T)* GENE POLYMORPHISM WITH THE DEVELOPMENT OF TISSUE EOSINOPHILIA IN PATIENTS WITH COLON CANCER

Dmitrieva A. I., Yankovich K. I., Kolobovnikova J. V., Urazova O. I., Novickiy V. V., Purlik I. L.

Siberian State Medical University; Tomsk Regional Oncology Center, Tomsk, Russia

The formation of tumor-associated eosinophilia in colon cancer is determined by the carriers of genotype *CC* and allele *C* of the polymorphism (*C-703T*) of the gene *IL5*. Eosinophilic infiltration of the tumour in colon cancer is recorded more often in tumors with a high degree of differentiation of the cells.

Keywords: eosinophilia, colon cancer, gene polymorphism.

РЕВМАТОИДНЫЙ АРТРИТ И ЛЕПРА КАК СИСТЕМНАЯ ИММУНОПАТОЛОГИЯ. КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ

Головизнин М. В.[1], Булдакова Ю. Р.[1], Тимофеев В. Т.[2], Лахонина Н. С.[1]

[1]МГМСУ имени А. И. Евдокимова; [2]РНИМУ имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Нами были изучены особенности сочетаемости системных проявлений двух вариантов РА: с наличием РУ и без таковых и проанализирован CD-фенотип пациентов. При РА без РУ выявлено повышение маркеров клеточной активации (HLA-DR, CD 38), тогда как при РА с наличием РУ отмечалось снижение уровня клеток $CD3^+$, коррелирующее с количеством РУ. При РА без РУ преобладали системные проявления общевоспалительного характера, тогда как при РА с наличием РУ: «иммунные» проявления (лимфаденопатия, синдром Шегрена, полиневрит, иридоциклит, узловатая эритема). Сходные с РА системные проявления (иридоциклит, полиневрит, кожный васкулит) типичны и для больных лепрой, также как и иммунокомплексный синовит, приводящий к ревмтоидоподобному типу деформации кистей рук.

Ключевые слова: ревматоидый артрит, лепра, ревматоидные узелки.

В последние годы вновь наметилась тенденция к поиску потенциальных инфекционных возбудителей ревматоидного артрита (РА). При РА в суставной полости и синовиальной жидкости обнаруживаются антитела и Т-клоны, реагирующие с микобактериальными белками без предварительной сенсибилизации. Вовлеченность различных органов и систем характерна как для РА, так и для системных микобактериозов. И при РА, и при лепре имеют место артрит, иридоциклит, кожный васкулит и пр. С другой стороны, одним из центральных морфологических элементов системных микобактериозов является гранулема [1] а к диагностическим критериям РА относятся т.н. ревматоидные узелки (РУ), морфология которых подобна инфекционной гранулеме с той лишь разницей, что микроорганизмы в РУ не обнаруживаются.

Цель работы: изучить соотношения ЭП при двух различных вариантах течения РА: РА с наличием РУ и РА без таковых, и дифференцировать иммунопатогенетические особенности этих двух групп больных.

Материалы и методы. Обследовано в динамике 120 больных достоверным РА (85 пациентов с наличием РУ и 35 больных без РУ), всем больным выполнено необходимое общеклиническое, лабораторное и рентгенологическое обследование, иммунограмма периферической крови с определением уровня сывороточных иммуноглобулинов (IgG, A, M), титра РФ, фенотипа лимфоцитов периферической крови (ЛПК) с оценкой антигенов Т-лимфоцитов CD3, CD4, CD8, с помощью моноклональных антител (ООО «Сорбент») методом иммунофлуоресценции (ИФ). В последующем нами проводилось исследование клеточного фенотипа больных РА методом проточной цитометрии с использованием проточного цитометра FC-500 (Beckman Culter, США). (группа РА с наличием РУ составила 14 человек, РА без РУ – 44 человека). В качестве пилотного исследования нами было проведено изучение у больных РА с наличием РУ (3 человека) и без РУ (6 человек) Т-клеток с фенотипом ранних тимических эмигрантов (РТЭ)

Результаты. Одновременное сочетание нескольких видов внесуставных проявлений нами отмечено примерно у половины больных РА с наличием РУ (51 %). В группе больных РА без РУ таких больных было большинство (более 70 % больных). Самым частым системным проявлением в группе РА без РУ по нашим на-

блюдениям была амиотрофия (у 26 из 35 больных – 74,2 %), далее по частоте встречаемости следовали анемия (у 24 из 35 больных– 68,59 %) и потеря массы тела (у 22 из 35 больных – 62,8 %). В группе РА с наличием РУ амиотрофия встречалась в 59 случаях из 85 наблюдений и составила 69,4 %, анемия регистрировалась в 45 случаях из 85 (52,9), потеря массы тела у 37 из 85 больных (43,5 %). У больных РА с наличием РУ среди внесуставных проявлений выявлены полинейропатия (3), лимфаденопатия (8), узловатая эритема (1), иридоциклит (1), эписклерит (1), кожный васкулит (7), практически не выявлявшиеся в предыдущей группе. Все эти проявления (суммарно 21) связаны с пролиферацией лимфоцитов, аутоиммунными и гранулематозными реакциями. В группе РА без РУ внесуставные проявления подобного рода выявлялись значительно реже (1 случай кожного васкулита и 2 случая синдрома Шегрена). В то же время, у больных РА без РУ отмечается преобладание внесуставных проявлений, связанных с системным воспалением (лихорадка, анемия, потеря массы тела) [2]. Высокие титры РФ (1:640 и выше) были в большей степени свойственны пациентам с РУ, однако, это различие не достигло статистической достоверности. Достоверно более высокий уровень Ig G был у больных РА без РУ ($p \leq 0,05$). У больных РА с наличием РУ с помощью ИФ мы отметили достоверное снижение уровня экспрессии CD 3 как по сравнению со здоровыми лицами, так и по сравнению с РА без РУ. Нами выявлена обратная корреляция между экспрессией CD3 и признаком множественности РУ при РА. Больший уровень экспрессии CD3 наблюдался при единичных РУ, меньший уровень – при множественных РУ. ($r = -0,029$). При исследовании методом проточной цитометрии уровень экспрессии CD3 у больных РА с наличием РУ (66,875±14,00) был также ниже, чем уровень CD3 у больных без РУ (74,90±13,34), но, на данный момент, различия были на уровне тенденции. Мы также обратили внимание, что у больных РА с наличием РУ (n=3) уровень $CD31^+$ составил 8,41±9,49 %, а у больных без РУ (n=6) он был существенно выше – 20,05±18,26 %.

Выводы. 1. Разным вариантам течения РА свойственны различные ЭП, а именно, преобладание аутоиммунных и лимфопролиферативных ЭП в группе РА с РУ и «общевоспалительные» ЭП в группе РА без РУ.

2. У больных РА с наличием РУ был более низкий уровень IgG.

3. У больных РА с РУ между уровнем CD3 и количеством РУ выявлена обратная корреляционная зависимость (наименьшая экспрессия CD3 определялась у пациентов с множественными РУ).

Снижение уровня клеток $CD3^+$ свойственно также системным микобактериозам. Обращает на себя внимание, что для РА с наличием РУ более характерны полинейропатия, эписклерит, узловатая эритема. Эти ЭП также патогномоничны для лепры. На момент начала настоящего исследования для нас оставался неясным вопрос о характере суставного синдрома у больных лепрой. В 2009 году одному из авторов настоящей статьи, М. В. Головизнину представилась возможность наблюдения больных лепрой во Всеафриканском Центре изучения лепры и туберкулеза (ALERT) в Аддис-Абебе (Эфиопия) [3]. Хронические формы проказы, наиболее доступные для наблюдения в ALERT чаще проявлялись гипопигментациями, трофическими нарушениями, системной и локальной амиотрофией, кожным васкулитом, что также типично для РА. Мутиляция фаланг пальцев, сходная с таковой при системной склеродермии, наиболее распространенное последствие лепрозного полиневрита. Но у ряда пациентов нам удалось увидеть симметричные деформации мелких суставов кисти, мало отличимые от РА. Ревматоидоподобный синовит при проказе описан в литературе. В крови больных лепрой выявляются повышенные титры РФ и антицитруллиновых антител, хотя и в меньшем количестве случаев, чем при РА. Есть данные о дебюте лепры в виде сакроилеита, дерматомиозита, тендосиновита. На наш взгляд пролить свет на проблему патогенетической общности РА и системных микобактериозов может изучение роли клеток Th17. Продуцируемый ими ИЛ-17 и другие цитокины участвуют и в аутоиммунных реакциях и в иммунном ответе против высокоорганизованных инфекционных агентов (микобактерий, спирохет, гельминтов). В ряде случаев поликлональная иммунная реакция на антигены возбудителя способна перерасти в аутоиммуноагрессию.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Всеафриканского реабилитационного и учебного центра лепры и туберкулеза (Аддис-Абеба, Эфиопия) за возможность на-

блюдения больных и продуктивные консультации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головизнин М. В. Инфекция как пусковой фактор аутоиммунных процессов, обусловленных патологией Т-клеточной селекции/ М. В. Головизнин // Иммунология.– 1996.– № 1.– С. 12-17
2. Clinical and immunological features of Rheumatoid arthritis with Rheumatoid nodules / Y. R. Buldakova, M. V. Goloviznin, V. T. Timofeev et al. // Ann Rheum Dis.– 2010.– V. 69 (Suppl3).– P. 670.
3. Timofeev T-cell selection defect as hypothetic immunological background of parallelism between Leprosy and Rheumatoid arthritis / M. V. Goloviznin, Y. R. Buldakova, V. T. Timofeev et al. // Ten Topics in Rheumatology-Asia.– 2009.– P. 104.

RHEUMATOID ARTHRITIS AND LEPROSY AS SYSTEMIC IMMUNE DISORDERS. CLINICAL AND PATHOGENETIC PARALLELISM

Goloviznin M. V.[1], Buldakova Yu.R.[1], Timofeev V. T.[2], Lakhonina N. S.[1]

[1]Moscow State University of Medicine and Dentistry; [2]Russian State Medical University, Moscow, Russia

The goal of work was to study extraarticular manifestations peculiarities and CD phenotype of peripheral blood lymphocytes (PBL) in RA patients with "nodular" variant (NVRA) and RA without nodules (RAwN). Results: Lymphadenopathy, cutaneous vasculitis, polyneuritis, Sjogren syndrome, erythema nodosum predominated in NVRA otherwise systemic amyotrophy, anaemia, weght loss took place in RAwN. There was strong negative correlation between $CD3^+$PBL decrease and rheumatoid nodules number in NVRA (p -0,029). Decrease of $CD3^+$PBL level in NVRA is also common in leprosy. At the same time iridocyclitis, cutaneous vasculatis, polyneuritis, skin and muscle atrophy typical for RA are also typical for leprosy.

Keywords: Rheumatoid arthritis, leprosy, Rheumatoid nodules.

КЛИНИЧЕСКИЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ

Калинина Н. М., Синельникова Н.А., Бычкова Н. В.

ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России; СПбГПМУ, Санкт-Петербург, Россия

Изложены результаты сравнительных исследований активации базофилов, субпопуляционного состава лимфоцитов, уровня общего IgE, пробы с аутосывороткой (ASST) в группах детей и взрослых с хроническим течением крапивницы и группах сравнения Субпопуляционный состав лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии в многоцветном анализе с использованием моноклональных антител для выявления активированных базофилов $CD3^-CRTh2^+CD203c^{++}$, и Т-хелперов 2 с фенотипом $CD3^+CD294^+$. В ходе исследования показана эффективность применения метода проточной цитометрии для диагностики хронической крапивницы.

Ключевые слова: крапивница, проточная цитометрия, активация базофилов.

Цель исследования: расширить возможности диагностики хронической крапивницы у детей и взрослых с привлечением дополнительных лабораторных показателей, полученных в том числе методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. Изложены результаты сравнительных исследований активации базофилов, субпопуляционного состава лимфоцитов, уровня IgE общего, пробы с аутосывороткой (ASST) в группах детей и взрослых с хроническим течением крапивницы и группах сравнения (здоровые дети и взрослые без проявлений аллергии и псевдоаллергии, дети с обострением атопического дерматита). Обследовано 50 детей от 9 месяцев до 18 лет (средний возраст 9,4±0,72 года) с хронической крапивницей, 15 здоровых детей от 10 месяцев до 18 лет (средний возраст 6,8±0,84 года), 30 здоровых взрослых от 18 до 60 лет (средний возраст 45±5 лет) без проявлений аллергии и псевдоаллергии и 70 детей от 1 года до 13 лет (средний возраст 4,3±3,5 лет) с атопическим дерматитом в стадии обострения с разной степенью тяжести заболевания. Кроме этого были обследованы 20 взрослых пациентов с хронической крапивницей Изучение активации базофилов проводили методом проточной цитометрии (FC 500, Beckman-Coulter) в цельной гепаринизированной крови с использованием набора Allerginicity kit (Cellular Analysis of Allergy, Beckman-Coulter) в соответствии с инструкцией к набору. В пробе каждого пациента было проанализировано 500 базофилов, для четкой идентификации которых были использованы параметры прямого и бокового светорассеяния, моноклональные антитела к CD294 и CD203c. Применяя многоэтапное гейтирование, в каждой пробе было оценено относительное количество активированных базофилов с фенотипом $CD3^-CRTh2^+CD203c^{++}$, а также Т-хелперов 2 с фенотипом $CD3^+CD294^+$. Субпопуляционный состав лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии в многоцветном анализе с использованием моноклональных антител линии IOTest (Beckman-Coulter). После подготовки проб по методике «окраска – лизис с фиксацией – отмывка» анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman-Coulter, США). Оценивали содержание В-лимфоцитов ($CD19^+$), Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), Т-цитотоксических ($CD3^+CD8^+$), NK-клеток ($CD3^-CD16^+CD56^+$), NKT-клеток ($CD3^+CD16^+CD56^+$), активированных NK-клеток ($CD3^-CD8^+$), $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ клеток. Определение концентрации IgE общего в сыворотке крови проводили методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (Хема, Россия). Детям с хронической крапивницей старшего возраста и взрослым проводили пробу с аутосывороткой (autologous serum skin test – ASST).

Статистический анализ осуществлялся с использованием непараметрических тестов (Wilcoxon-Mann-Whitney test), корреляционного анализа (Spearman rank correlation coefficient). Различия считали значимыми при $p<0,05$.

Результаты. При изучении спонтанной активации базофилов в группе пациентов с крапивницей было выявлено повышение этого показателя у 25 (47 %) детей, а у 9 (19 %) пациентов активация была более 16,5 % с максимальными значениями до 68 %, что по данным литературы расценивается как косвенный признак аутоиммунной крапивницы (референтный интервал спонтанной активации базофилов 0-8 %). В процессе исследования показано, что в группе пациентов с хронической крапивницей спонтанная активация базофилов была выше, чем у здоровых лиц ($p<0,05$), что определяется иммунными и неиммунными факторами в патогенезе заболевания. Результаты внутрикожного тестирования (ASST) и положительная корреляция со степенью выраженности активации базофилов ($r=0,6$) позволили у старших детей в 75 % случаев диагностировать аутоиммунную форму крапивницы.

При изучении корреляционных связей между показателями общего IgE и спонтанной активацией базофилов выявлена статистически достоверная положительная корреляция между этими показателями в группах пациентов с крапивницей и с обострением атопического дерматита, что указывает на общую направленность иммунного ответа. Показана меньшая положительная парная корреляция между уровнем IgE общего и относительным количеством Th2 в группе детей с хронической крапивницей ($r = 0,3$), по сравнению с группой пациентов с атопическим дерматитом ($r = 0,6$), что говорит о большем вкладе IgE-зависимых реакций в воспаление при атопическом дерматите.

У 25 детей с тяжёлым и среднетяжёлым течением хронической крапивницы изучали субпопуляционный состав лимфоцитов для исключения нарушений клеточного звена иммунитета, учитывая тяжесть и длительность заболевания. В группе пациентов с хронической крапивницей были выявлены следующие особенности: относительное количество

В-лимфоцитов у 22 (86 %) человек находилось в пределах нормы, абсолютное количество $CD19^+$ – снижено у 4 (13 %) человек; относительное количество Т-лимфоцитов умеренно повышено у 13 (53 %) человек, но при оценке средних значений данный показатель не отличался от группы сравнения и находился в пределах референтного интервала; относительное повышение Т-хелперов выявлено у 5 (20 %) человек; соотношение Т-хелперы / Т-цитотоксические повышено у 13 (53 %) человек, что может быть связано с миграцией $CD3^+CD8^+$ клеток в органы мишени. У детей с обострением атопического дерматита относительное количество Т-лимфоцитов было выше, чем в других группах, и выходило за рамки референтного интервала ($p<0,05$). При оценке относительного количества Th2 в группах детей и взрослых были выявлены следующие результаты: относительное количество Th2 у детей с хронической крапивницей не выходило за рамки референтного интервала у 42 (90 %) человек, у 8 (10 %) пациентов этот показатель колебался от 0,7 до 1,1 %; уровень Th2 в контрольных группах здоровых детей и взрослых находился в пределах нормы и составлял от 0,1 до 0,4 % в контрольной группе детей и от 0,5 до 0,7 % в контрольной группе взрослых; у пациентов с обострением атопического дерматита относительное количество Th2 было самым высоким и достоверно отличалось от данного показателя в группе здоровых детей, а также от количества Th2 в группе детей с хронической крапивницей ($p<0,05$).

Аналогичные результаты были получены при обследовании взрослых с хронической крапивницей (n=20)

Выводы. В ходе исследования показана эффективность применения метода проточной цитометрии для диагностики хронической крапивницы. Тесты на активацию базофилов и субпопуляционный состав лимфоцитов *in vitro* – доступные и перспективные методы исследования. Они подходит как для экспериментальных и фармакологических исследований, так и для диагностики в клинической практике с целью динамического наблюдения иммунологических нарушений, приводящих к персистированию хронической крапивницы в детском возрасте. Особенности активации базофилов, сочетание с другими иммунологическими показателями (уровень IgE и относительное количество Th2) и результаты пробы с аутосывороткой (ASST) указывают на промежуточное положение хронической крапивницы в ряду аллергических заболеваний, отличая иммунные механизмы от IgE-зависимых реакций. Представленные данные субпопуляционного состава лимфоцитов у детей с хронической крапивницей отражают дисбаланс между Т-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами. Отмечается преобладающая роль Т-клеточного звена с Th2 девиацией иммунного ответа. Полученные данные свидетельствуют о повышенном содержании активированных эффекторных Т-хелперов в периферической крови пациентов с хронической крапивницей, иммунный ответ у которых развивается преимущественно по Т-хелперному 2 типу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Basophil Markers for Identification and Activation in the Indirect Basophil Activation Test by Flow Cytometry for Diagnosis of Autoimmune Urticaria. / Z. Kim, B. S. Choi, D. I. Won et al. // Ann Lab Med.– 2016.– V. 36(1).– P. 28-35.
2. An individualized diagnostic approach based on guidelines for chronic urticaria (CU). / A. M. Giménez-Arnau, C. Grattan, T. Zuberbier et al. // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.– 2015 – V. 29(3).– P. 3-11.
3. Wu E. Y., Saini S. S. Chronic Idiopathic Urticaria. / E. Y. Wu, S. S. Saini // J Allergy Clin Immunol Pract.– 2015 – V. 3(6).– P. 1003-1004.

POSSIBILITY IMMUNE RESEARCH OF CHRONIC URTICARIA IN CHILDREN BY FLOW CYTOMETRY

Sinelnikova N. A., Bychkova N. V., Kalinina N. M.

SPbSPMU; ARCERM, EMERCOM of Russia, Saint-Petersburg, Russia

Contemporary investigation of basophils activation, lymphocytes subpopulation peculiarities, common IgE level, ASST in children and adults with chronic urticaria by multicolor flow cytometry revealed effective diagnostic value of these methods.

Keywords: urticaria, flow cytometry, basophil activation.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ, ДО И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ОПЕРАЦИЙ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Лабис В. В.[1], Базикян Э. А.[1], Хайдуков С. В.[2]

[1]Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова; [2]Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В настоящее время проточная цитометрия может быть использована в клинической практике для диагностики и мониторирования проведенной терапии пациентам с использованием метода дентальной имплантации. Как известно, любое оперативное вмешательство приводит к развитию иммунного ответа, направленного, в том числе, на регуляцию репаративных процессов в организме человека. Наличие красного и желтого костного мозга в губчатом слое челюстных костей, а также активация врожденных и адаптивных механизмов иммунной регуляции при повреждении тканей, позволило выдвинуть предположение о способности иммунной системы регулировать процесс репаративного остеогенеза, в частности при проведении операции дентальной имплантации. В связи с этим, представляется актуальной потребность в надежных методах исследования иммунокомпетентных клеток, их субпопуляционного состава и функционального состояния, которые позволили бы проводить раннюю диагностику возможных осложнений различного генеза при дентальной имплантации. Одним из таких методов, в практике хирурга-имплантолога, может стать проточная цитометрия, которая, в отличие от рутинных иммунологических исследований, проводимых в условиях клинико-диагностических лабораторий, позволяет проводить углубленный иммунологический анализ основных и малых субпопуляций иммунокомпетентных клеток, предоставляя, тем самым возможность наиболее точной оценки иммунореактивного состояния пациента на данный момент времени.

Ключевые слова: проточная цитометрия, профилактика периимплантита, репаративный остеогенез, иммунорегуляция.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке алгоритма иммунологического обследования пациентов до и после проведения операций дентальной имплантации и выявлении иммунологических маркеров неблагоприятного течения послеоперационного периода, связанных с возникновением осложнений воспалительного характера.

Материалы и методы. Было обследовано 40 человек, обратившихся с целью проведения операции дентальной имплантации с положительным анамнезом и удовлетворительными результатами общепринятого предоперационного обследования. Материалом исследования являлась периферическая кровь и капиллярная кровь пациентов, полученная после санации хронических очагов инфекции, непосредственно из лунок зубов после удаления, а также из сформированного под дентальный имплантат костного ложа, десневого края, и на втором хирургическом этапе при формировании декортикационных отверстий.

Идентификацию субпопуляций лимфоцитов проводили методом многоцветной проточной цитофлюориметрии. Для окрашивания клеток использованы мАТ производства компании Beckman Coulter (США) с последующей регистрацией на проточном цитофлюориметре Navios (США). Протокол для цитофлюориметрического исследования с выбором зоны анализа для моноцитов по CD45 и морфологическим параметрам готовили, в соответствии с рекомендациями Хайдуков С. В., и др. (2012). В каждой пробе анализировали не менее 5×10^3 лимфоцитов. Абсолютное и относительное количество лимфоцитов в исследуемых образцах

проводили на гематологическом анализаторе UniCel® DxH™ 800 (BeckmanCoulter, США).

Анализировали следующие субпопуляции лимфоцитов: Т-лимфоциты ($CD45^+CD3^+$), Th ($CD3^+CD4^+$), Tc ($CD3^+CD8^+$), Treg ($CD4^+CD25^{hight}CD127^-$), Thnaev($CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$; $CD4^+CCR7^+$); Th-эффекторы ($CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$); Thactiv ($CD3^+CD25^+$; $CD3^+HLA\text{-}DR^+$); В-лимфоциты ($CD45^+CD19^+$), B1 ($CD19^+CD5^+$), B 2 ($CD19^+CD5^-$), Bmem ($CD19^+CD27^+CD5^-$); Впролиф. ($CD19^+CD38^+CD27^-$); NK-клетки ($CD3^-CD16^+CD56^+$; $CD3^-CD8^+$), NKT ($CD3^+CD56^+$), NK-цитолитические ($CD3^-CD16^+CD56^{dim}$), NK-цитокинпродуцирующие ($CD3^-CD16^+CD56^{bright}$); NK-пролиф. ($CD56^+CD38^+$); NKreg ($CD56^{hight}CD127^+$). Помимо лимфоцитарных субпопуляций рассматривали популяции моноцитов ($CD14^+CD16^+$): провоспалительные моноциты ($CD14^{low}CD16^+$); активированные моноциты ($CD45RA^+$ $CD14^{low}CD16^+$; $CD14^{low}CD16^+HLA\text{-}DR^+$), а также дендритные клетки ($CD14^{low}$ $CD45RA^{hight1c+}$). В ходе проведения исследования рассчитывали соотношение Th/ Tc и контрольную сумму (Ткл+Вкл+NKкл).

Математическую обработку данных проводили при помощи программы Kaluza v. 1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Statistica 6.1 (StatSoft).

Результаты и обсуждение. Проведя стандартное обследование пациентов, подготовленных к дентальной имплантации и, не найдя противопоказаний к ее проведению, исходя из общепринятых норм, мы провели операции, дополнив предоперационное обследование интраоперационным. С помощью метода проточной цитометрии нами была изучена экспрессия определенных кластеров дифференцировки [3]: CD3; CD4; CD8; CD 1c; CD 14; CD16; CD19; CD25; CD62L; CD45Ra; CD45R 0; CD45; CD127; CD56; CCR 7; как местно, так и на периферии, по которым мы смогли судить о наличии и выраженности инфекционно-воспалительного процесса, происходящего непосредственно в костной ткани в корреляции с результатами, полученными в периферической крови. Исходя из полученных результатов анализа венозной крови, а также крови, выделенной непосредственно из костного ложа, нами были проанализированы клеточные и молекулярные параметры расширенного иммунного статуса пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов И. Г. Коллаген как фактор функционального микроокружения клеток иммунной системы // Дисс. на соискание уч. степ. д.м.н. Москва, 2000, 226.

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OBTAINED BY FLOW CYTOMETRY BEFORE AND AFTER OPERATIONS OF DENTAL IMPLANTOLOGY

Labis V. V.[1], Bazikyan E. A.[1], Khaidukov S. V.[2]

[1]Evdokimov Moscow State Medical Stomatological University; [2]Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

In the present study, flow cetometry can be used in clinical practice for the diagnosis and monitoring of patients with the therapy using dental implants. As you know, any surgical intervention leads to the development of an immune response directed, inter alia, on the regulation of reparative processes in the human body. Availability of red and yellow marrow in the spongy layer of the jaw bones, and also the activation of innate and adaptive immune regulation mechanisms is damaged tissues allowed to advance on the assumption of the immune system the ability to control the process of reparative osteogenesis, in particular during dental implant surgery. In this regard, it is urgent need for reliable methods of studying immune cell subpopulations and their functional state, which would allow early diagnosis of complications of various origins in dental implantation. One of such methods in practice of surgeon-implantologist can become flow cytometry, unlike the routine immunological studies conducted under clinical diagnostic laboratories, which allows for in-depth analysis of the basic immunological, small subpopulations, of immunocompetent cells, providing, thereby and allowing the most accurate assessing patient immunoreactive status in active time.

Keywords: flow cytometry, the prevention of peri-implantitis, reparative osteogenesis, immunoregulation

Раздел 5
ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ

АПОПТОЗ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ ТИМОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Логинова Н. П.[1], Орлова Е. Г.[2], Заморина С. А.[2], Ширшев С. В.[2], Четвертных В. А.[1]

[1]ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера Минздрава России; [2]Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Изучены функциональные особенности созревания тимоцитов у детей с разными типами врожденных пороков сердца (ВПС) на фоне разной степени выраженности гипоксии (белые ВПС (n=7) и синие ВПС (n=7). Установлено, что в группе с синим типом ВПС снижается процент тимоцитов, вступивших в позднюю необратимую стадию апоптоза по сравнению с группой с белым типом ВПС. В то же время, процент тимоцитов, находящихся в ранней обратимой стадии апоптоза и пролиферативная активность тимоцитов статистически значимо не отличались между группами детей с синим и белым типом ВПС. Таким образом, выраженное воздействие гипоксии у детей с синим типом ВПС делает тимоциты менее чувствительными к факторам, индуцирующим апоптоз.

Ключевые слова: тимус, врожденный порок сердца, апоптоз, пролиферация, тимоциты.

Врожденные пороки сердца (ВПС) являются одной из наиболее распространенных аномалий развития у детей. Известно, что дети с ВПС подвержены различным заболеваниям в связи с имеющимся у них иммунным дисбалансом. Большинство ВПС у детей раннего возраста сопровождается изменением системной гемодинамики вследствие нарушения эмбриогенеза сердца и развитием гипоксии на клеточном, тканевом, органном и системном уровнях. По клиническим проявлениям цианоза ВПС дифференцируют на две группы: белые (бледные) пороки, ассоциированные с лево-правым сбросом крови без смешивания артериальной и венозной крови и синие (цианоз), с право-левым сбросом крови со смешиванием артериальной и венозной крови [1]. Однако взаимосвязь изменений в тимусе при ВПС в зависимости от выраженности гипоксии с функциональными особенностями созревания тимоцитов у детей практически не исследована. В современной литературе сведения, касающиеся морфофункциональных особенностей созревания тимоцитов у детей с ВПС, довольно ограничены и не дают полного представления об их функциональных последствиях. Пролиферация тимоцитов, интенсивность которой наиболее высока в кортикальной зоне тимуса, это неотъемлемый процесс, связанный с внутритимическим созреванием Т-лимфоцитов. Апоптоз, в свою очередь, является ведущим механизмом селекции и элиминации клеток [2].

Цель работы – изучить процессы пролиферации и апоптоза тимоцитов у детей с ВПС в зависимости от степени выраженности порока.

Материал и методы. В работе использовали фрагменты тимусов, удаляемых у детей до года в ходе сердечно-сосудистых операций по поводу ВПС (ФГБУ «ФЦССХ» Минздрава России (г. Пермь)). Исследование проводилось согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. с письменного согласия родителей оперируемых детей. Исследуемые тимусы на основе анализа медицинских карт по степени выраженности цианоза (гипоксии) были разделены на две группы – белый тип (n=7) и синий тип (n=7) ВПС.

Для изучения функциональных особенностей созревания тимоциты выделяли из фрагментов удаляемых тимусов пипетированием.

Полученная клеточная суспензия на 85 % и более состояла из $CD4^+CD8^+$-тимоцитов. Выделенные тимоциты трижды отмывали в забуференном физрастворе (pH=7,4) и затем инкубировали в плоскодонном 96-луночном планшете (1×10^6 кл в пробе) в полной питательной среде (ППС) (среда RPMI-1640, содержащая 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мМ буфера HEPES, 2 мМ L-глутамина, 5×10^{-5}М2-меркаптоэтанола, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) в течение 48ч (апоптоз) или 72 ч (пролиферация) при 37°С в условиях 5 % CO_2. Пролиферация оценивалась по окрашиванию витальным красителем CFSE с использованием CellTracetm CFSE Cell proliferation Kit («Invitrogen», США) согласно инструкции производителя. Перед 72-часовой инкубацией тимоциты подвергались часовой преинкубации с ФГА (5 мкг/мл, «Sigma», США) и IL-2 (100 МЕ/мл, «Sigma», США) для индукции пролиферации. Количество делений клеток анализировали методом проточной цитометрии.

Апоптоз тимоцитов оценивали путем окрашивания проб аннексином-V (AnV-FITC) и йодистым пропидием (PI) с использованием коммерческого набора Annexin V – FITC Kit (IMMUNOTECH, Франция). Для индукции апоптоза использовали дексаметазон (10^{-6} М, «KRKA», Словения), после внесения которого клетки инкубировали 48ч, затем оценивали апоптоз методом проточной цитометрии. Используемый метод позволяет идентифицировать клетки, подвергшиеся раннему (обратимому) (AnV^+/PI^-) и позднему (необратимому) (AnV^+/PI^+) апоптозу. Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни ($p<0,05$).

Результаты и обсуждение. При оценке влияния степени выраженности гипоксии на пролиферативную активность тимоцитов *in vitro* при ВПС не обнаружено статистически достоверных различий между показателями пролиферации тимоцитов детей с белым типом ВПС по сравнению с синим типом ВПС (1-2 деления, белый тип 28,5±9,8; синий тип 30,3±7,2; 3-4 деления, белый тип 9,7±3,4; синий тип 6,4±2,1). Ранее методами иммуногистохимии было показано, что для ВПС характерно снижение экспрессии Ki-67 в тимоцитах, особенно при синих типах ВПС [3]. Однако тип ВПС не влиял на пролиферативную активность тимоцитов, оцениваемую по окрашиванию витальным красителем CFSE в модели *in vitro*. При оценке дексаметазон-индуцированного апоптоза тимоцитов установлено, что в группе с синим типом ВПС статистически значимо снижается процент тимоцитов, вступивших в необратимую (AnV^+/PI^+) стадию апоптоза по сравнению с белым типом ВПС (белый тип 39,13±3,09; синий тип 24,97±8,31; $p<0,05$ по U-критерию). В то же время, не выявлено достоверных различий по показателям раннего (AnV^+/PI^-) апоптоза (белый тип 48,35±8,08; синий тип 48,92±16,68; $p<0,05$ по U-критерию). По-видимому, выраженное воздействие гипоксии делает тимоциты менее чувствительными к факторам, индуцирующим апоптоз. Данное предположение подтверждается полученными нами ранее данными иммуногистологических исследований о повышенной экспрессии противоапоптотического маркера Bcl-2 тимоцитами детей с синим типом ВПС [3]. Устойчивость к апоптозу в данном случае связана с тем фактом, что Bcl-2 защищает клетку от перекисного окисления липидов, вызванного гипоксией. Кроме этого, ранее нами продемонстрировано, что у детей с синим типом ВПС при соответствующей стимуляции тимоциты отвечают интенсивным формированием субпопуляции Т-регуляторных тимоцитов (nTreg ($CD4^+FOXP3^+$)) [4]. Эти клетки являются апоптозоустойчивыми и интенсивно накапливающими в цитоплазме антиапоптический белок bcl-2. Известно, что гипоксия сопровождается повышенной экспрессией фактора-1α, индуцируемого гипоксией (HIF-1α). Относительно недавно показана положительная взаимосвязь экспрессии HIF-1α, Bcl-2 и FOXP3 [5], что согласуется с нашими результатами.

Таким образом, установлено, что тимоциты, полученные от детей с синим типом ВПС менее чувствительны к факторам, индуцирующим апоптоз, реализуя, вероятно, стратегию метаболической анергии для адаптации к действию стрессорного фактора гипоксии.

Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-96023 р_урал_а; 13-04-96035-р_урал_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зиньковский М. Ф. Врожденные пороки сердца / М. Ф. Зиньковский.– Киев: Книга плюс, 2009.– 1168 с.
2. Кветной И. М. Нейроиммуноэндокринология тимуса / И. М. Кветной, А. А. Ярилин, В. О. Полякова и др.– СПб.: ДЕАН, 2005.– 160 с.

3. Логинова Н. П., Четвертных В. А., Хромцова Г. А. Морфологические и иммуногистохимические особенности строения тимуса у новорожденных детей с врожденными пороками сердца / Н. П. Логинова, В. А. Четвертных, Г. А. Хромцова // Архив патологии.– 2013.– Т. 75, № 4.– С. 9-14.
4. Особенности экспрессии FOXP3 и RORγt CD4+-тимоцитами у детей в зависимости от сложности врожденных пороков сердца / Н. П. Логинова, С. А. Заморина, Е. Г. Орлова и др. // Биологические мембраны.– 2016.– Т. 33, № 1.– С. 98-104.
5. Effects of hypoxia and its relationship with apoptosis, stem cells, and angiogenesis on the thymus of children with congenital heart defects: a morphological and immunohistochemical study/ A. B. Ceyran, S. Şenol, F. Güzelmeriç et al. // Int. J. Clin. Exp. Pathol.– 2015.– V. 8 (№ 7).– P. 8038-8047.

APOPTOSIS AND PROLIFERATION OF THYMOCYTES IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DEFECTS

Loginova N. P.[1], Orlova E. G.[2], Zamorina S. A.[2], Shirshev S. V.[2], Chetvertnykh V. A.[1]

[1]Perm State Medical University named after Academician E. A. Vagner;
[2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

Studied functional features of the maturation of thymocytes in children with congenital heart defects (CHD) with varying severity of hypoxia (white CHD (n=7) and blue CHD (n=7). In the evaluation of dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes found that in the group with a blue CHD type reduces the percentage of thymocytes that have entered into irreversible (AnV^+/PI^+) stage of apoptosis in comparison with the white type of the CHD. At the same time, there were no significant differences in terms of early (AnV^+/PI^-) apoptotic. When assessing the proliferation of thymocytes by staining with the vital dye CFSE revealed no significant differences between groups of children with white and blue CHD type. Probably pronounced effect of hypoxia makes the thymocytes are less sensitive to factors inducing apoptosis.

Keywords: thymus, congenital heart disease, apoptosis, proliferation, thymocytes.

ОСОБЕННОСТИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ОЖОГОВОЙ ТРАВМОЙ

Хабирова Т. Г., Малышев М. Е., Арискина О. Б., Пивоварова Л. П., Осипова И. В., Орлова О. В.

ГБУ СПбНИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия

Проведено исследование фагоцитарной и адгезионной активности нейтрофильных гранулоцитов у 20 пострадавших с тяжелой ожоговой травмой. Отмечено усиление поглотительной и оксидантной активности нейтрофилов. При этом, при тяжелой ожоговой травме (с ИФ более 90) наблюдается снижение количества $CD11b^+$ НГ и Def^+ НГ по сравнению с пострадавшими со средней тяжестью ожога.

Ключевые слова: нейтрофилы, иммунитет, ожоговый шок.

Актуальность. Функциональное состояние нейтрофилов во многом определяет течение и прогноз исхода ожоговой болезни при термическом повреждении. Воспалительная реакция, вызываемая тяжелыми ожогами, характеризуется массивной миграцией нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в очаги повреждения и зоны нарушения микроциркуляции. Аккумуляция нейтрофилов в различных тканях в условиях шока приводит не только

к активации противобактериальной защиты, в частности, фагоцитоза, но и массивному выбросу активных форм кислорода, ферментных и неферментных белков НГ, что может приводить к острому повреждению тканей. Одной из стадий фагоцитоза является привлечение, или хемотаксис, фагоцитов в очаг проникновения патогенов, проявляющееся в целенаправленном движении фагоцитов против градиента концентрации хемоаттрактанта. Ключевую роль в этом процессе играют различные поверхностные рецепторы для хемоатрактантов и молекул адгезии. В свою очередь молекулы адгезии могут находиться как на поверхности фагоцита, так на клетках эндотелия сосудов микроциркуляторного русла [1].

Цель исследования. Изучение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов у пострадавших с тяжелой ожоговой травмой.

Материалы и методы. Обследовали 20 пострадавших с ожоговой травмой 22-56 лет. Пострадавшие были разделены на 2 группы в зависимости от величины индекса Франка (ИФ): 1 группа (ОТ средней степени) – ИФ менее 90 баллов, 2 группа (ОТ тяжелой степени) – ИФ более 90 баллов. Группа сравнения представлена 30 здоровыми волонтерами. Кровь пациентов исследовали на 1 сутки после поступления в центр по лечению термических поражений.

Исследовали уровень спонтанной и индуцированной зимозаном люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) НГ, поглотительную способность НГ с опсонизированным зимозаном, содержание в плазме эластазы НГ и растворимых дефензинов (sDef) методом ИФА (Hycult biotech, Нидерланды). Экспрессию CD11b, CD14, CD16, CD18, CD62L, CD88, CD128a, CD128b и дефензинов 1-3 типа исследовали иммуноцитохимическим методом (система визуализации Novocastra, Великобритания).

Результаты. Уже через 1 сутки после ожоговой травмы в крови пострадавших обеих групп отмечали нарастание абсолютного числа нейтрофилов (1 группа – 14,1(11,9;15,5)×10^9/л, 2 группа – 15,5(10,9;24,1)×10^9/л), что свидетельствует об усилении миграции нейтрофилов из депо костного мозга в кровоток, а в дальнейшем, в очаг воспаления. При этом отмечали усиление поглотительной активности НГ у пострадавших первой группы (фагоцитарный индекс (ФИ) – 89(85;92)%) по сравнению с пострадавшими 2 группы (ФИ – 71(61;81)%). Уровень бактерицидной активности, определяемой по данным хемилюминесценции НГ, был достоверно повышен в обеих группах пострадавших – ХЛ – 11,5(9,5;15,5) мВ в 1 группе и 18,2(8,4;22,5) мВ во 2 группе.

Как известно, миграция нейтрофилов из микрососудистого русла в область воспаления регулируется экспрессией на поверхности клеток молекул адгезии. L-селектин (CD62L) ответственен за инициацию адгезии лейкоцитов к эндотелию [2]. Количество $CD62L^+$ НГ не различалось в обеих группах пациентов с ожоговой травмой. Трансэндотелиальная миграция НГ в ткани опосредована β2-интегринами, такими как CD11b(CR3)/CD18. Таким образом, активация нейтрофилов ассоциирована с повышенной экспрессией этих молекул на мембране. При этом количество, клеток, экспрессирующих CD11b, у пострадавших со средней тяжестью ожоговой травмы (82(75;86)%) достоверно ($P<0,05$) превышало показатели у пострадавших 2 группы с ИФ более 90 баллов – 63(58;71)%. Количество НГ, экспрессирующих CD18, было сходно в обеих группах. Следовательно, более тяжелая ожоговая травма приводит к нарушению адгезивной способности нейтрофилов, что связано со снижением экспрессии части интегриновой молекулы – CD11b.

Направленное движение нейтрофилов в очаг воспаления обеспечивают хемоаттрактанты, такие как компоненты комплемента и ИЛ-8. Нейтрофил экспрессирует CD88 (C5aR) и CD128 (рецептор ИЛ-8) [2]. Количество $CD88^+$ гранулоцитов и НГ, экспрессирующих CD128, было достоверно повышено по сравнению с нормой у больных с ожоговой травмой вне зависимости от тяжести.

Важными эффекторными молекулами нейтрофильных гранулоцитов являются Fc-рецепторы. Так, антителозависимый фагоцитоз осуществляется посредством рецептора CD16 на фагоцитах. CD16 – низкоаффинный рецептор для иммуноглобулина G (FcγIII-рецептор), связывает агрегированные Ig. CD16 способствует освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо, дегрануляции гранулоцитов, активации оксидативного стресса и привлечению полиморфноядерных нейтрофилов в иммунные комплексы, участвующие в воспалении [1]. Количество $CD16^+$ НГ больных 1 группы (50(27;72)%) достоверно не отличалось от показателей 2 группы – 48(35;65)%, при этом достоверно превышало количество данных клеток у здоровых взрослых.

Дефензины 1-3 типа являются доминирующими белками азурофильных гранул НГ с широким спектром микробицидного действия [1]. Мы наблюдали достоверное повышение количества Def^+ НГ у пострадавших 1 группы (73(70;81)%) по сравнению с пострадавшими 2 группы – 48(25;70)%. При этом концентрация sDef в сыворотке крови пострадавших обеих групп превышала показатели нормы. Также было отмечено возрастание концентрации эластазы нейтрофилов в крови пострадавших вне зависимости от тяжести повреждения.

Выводы. Таким образом, в первые 24 часа после ожоговой травмы мы наблюдали активацию фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов, о чем свидетельствует усиление их поглотительной и оксидантной активности, увеличение концентрации в сыворотке пострадавших растворимых форм дефензинов и нейтрофильной эластазы. При этом, при тяжелой ожоговой травме (с ИФ более 90) наблюдается снижение количества $CD11b^+$ НГ и Def^+ НГпо сравнению с пострадавшими со средней тяжестью ожога.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пинегин Б. В., Маянский А. Н. Нейтрофилы: структура и функция / Б. В. Пинегин, А. Н. Маянский // Иммунология. – 2007. – № 6. – С. 374-387.
2. Современные методы оценки функций фагоцитов в экспериментальной биологии / И. В. Кудрявцев, А. В. Зурочка, С. В. Хайдуков и др. // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6(14), № 3(1). – С. 3-20.

FEATURES OF PHAGOCYTIC ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH BURN INJURIES

Habirova T. G., Malyshev M. E., Ariskina O. B., Pivovarova L. P., Osipova I. V., Orlova O. V.

Saint-Peterburg I. I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency, St. Petersburg, Russia

A study of adhesion and phagocytic activity of neutrophilic granulocytes in 20 patients with severe burn injury. Marked increase in the absorption and oxidative activity of neutrophils. At the same time, with severe burn injury (with Frank index of more than 90 points) observed a decrease in the number of $CD11b^+$ neutrophils and Def^+ neutrophils compared with patients with average degree of a burn injury.

Keywords: neutrophils, immune system, burn shock.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ТИМЭКТОМИИ, ПРОВЕДЕННОЙ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ВРОЖДЕННОГО ПОРОКА СЕРДЦА

Шмулевич С. А.[1], Шабалдин А. В.[2,3], Ровда Ю. И.[3], Сизова И. Н.[2]

[1]МАУЗ Кемеровский кардиологический диспансер; [2]НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; [3]ГБОУ ВПО Кемеровская государственная медицинская академия МЗ РФ, Кемерово, Россия

Продолжает изучаться роль тимэктомии в развитии иммунодефицитных состояний у детей, перенесших хирургическое лечение врожденного порока сердца (ВПС). Проведено клинико-иммунологическое обследование 28 детей с ВПС оперированных на первом году постнатальной жизни. Тимэктомия была выполнена у 14 детей. Частота острых респираторных инфекций в группе детей с тимэктомией была сопоставима с контролем. Дефицит Т-лимфоцитов, Т-хелперов, наивных Т-лимфоцитов хелперов и тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов в периферической крови был выявлен у детей с тимэктомией.

Ключевые слова: тимэктомия, врожденные пороки сердца, иммунодефицит.

Введение. Хирургическое лечение гемодинамически значимых врожденных пороков сердца (ВПС) связано с выполнением тимэктомии для улучшения визуализации структур сердца и присоединения аппарата искусственного кровообращения. Тимус является центральным органом иммунной системы, где происходят процессы созревания Т-лимфоцитов и формирование центральной толерантности [1]. Постнатально в тимусе синтезируются пептиды, обладающие активирующим действием на Т-лимфоциты периферических органов иммунной системы. Удаление тимуса в периоды новорожденности или младенчества, должно быть критичными для формирования и адаптации Т-клеточного звена иммунной системы ребенка в постнатальном периоде.

Противоречивость литературных данных о выраженности иммунопатологий у этих детей [2], определила **цель настоящего исследования:** изучить клинико-иммунологические особенности детей младшего школьного возраста, перенесших хирургическое лечение ВПС и тимэктомию в периоды новорожденности или младенчества.

Материалы и методы. Для выполнения поставленной задачи провели обследование 28 детей младшего школьного возраста с гемодинамически значимыми ВПС, имеющих в анамнезе (в период новорожденности и младенчества) этап хирургического лечения ВПС. Были выделены две группы по 14 детей в каждой. Первая группа – дети, перенесшие тимэктомию (операция с исскуственным кровообращением, средний возраст 8,44+0,66 лет), вторая – дети без тимэктомии (рентген-эндоваскулярное вмешательство, средний возраст 8,61+0,57 лет). Распределение детей по диагнозам международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ 10) было следующим: в первой группе у 28,6 % детей были ВПС Q21.1, у 21,4 % – Q21.0, у 14,3 % – а Q21.3, а ВПС Q20.9, Q22.0, Q22.8 и Q25.1 у 7,1 % детей соответственно; во второй группе у 71,4 % детей был ВПС Q25.0, а ВПС Q21.0, Q21.1, Q23.0 и Q25.1 у 7,1 % детей соответственно. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. Контрольная группа была представлена 13 условно-здоровыми детьми (не имеющих ВПС в анамнезе), сопоставимыми по полу и возрасту (средний возраст 8,23+1,14 лет). Всем детям проведено ультразвуковое исследование тимуса. На основе этих данных был рассчитан объем тимуса в $см^3$. В первой группе у всех детей тимус не лоцировался, объем тимуса во второй группе был 23,65+0,94 $см^3$, а в группе контроля – 24,25+1,22 $см^3$.

Проведена оценка частоты острых респираторных заболеваний за 1 год, а также временной интервал после перенесенной операции, через который у ребенка появился синдром рецидивирующих острых респираторных инфекций.

Оценку субпопуляций Т-лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 с программным обеспечением CXP (Beckman Coulter, USA) с помощью определения экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов (CD): CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD31 – которые выделяли из периферической крови. Для проведения иммунофенотипирования Т-лимфоцитов применяли четырехцветную комбинацию конъюгированных моноклональных антител в реакции прямой иммунофлуоресценции, используя антиCD3-PC7, антиCD4-PC5, антиCD8-APE, антиCD45RA-PE, антиCD31-FITC (Beckman coulter, USA). Рассчитывали относительное содержание $CD3^+$, $CD3^+/CD4^+$, $CD3^+/CD8^+$ лимфоцитов к общему числу лимфоцитов периферической крови, а $CD3^+/CD4^+/CD45RA^+$ и $CD3^+/CD4^+/CD45RA^+/CD31^+$ лимфоцитов к числу $CD3^+/CD4^+$ и $CD3^+/CD4^+/CD45RA^+$ мононуклеаров – соответственно. Проводили расчет абсолютного содержания клеток (тыс/мкл) каждой анализируемой субпопуляции. Анализ данных проводили с помощью стандартных медико-статистических методов, используя пакет прикладных программ «Statistica for Windows, 6.0» (StatSoft, USA, 1999). Результаты считали статистически значимыми при ошибке менее 5 %.

Результаты. Частота острых респираторных инфекций у детей первой группы была сопоставима с контрольной группой (2,57+0,31 ОРВИ/год, против 2,23+0,28 ОРВИ/год в контроле, $p>0,05$), и была достоверно ниже, чем во второй основной группе (2,57+0,31 ОРВИ/год, против 3,78+0,47 ОРВИ/год во второй основной группе, $p<0,05$). Популяционный состав лейкоцитов периферической крови у детей первой основной группы был сопоставим с контролем и со второй основной группой ($p>0,05$). Исключение составили моноциты, удельный вес которых в периферической крови был максимальным у детей второй основ-

ной группы (9,35+1,56 % во второй основной группе, 8,21+0,59 % в первой основной группе и 5,07+0,88 % в группе сравнения; для первой и второй основных групп p<0,05, по отношению к контролю). Исследование Т-лимфоцитов и их субпопуляционного состава показало различия между группами только по относительному содержанию клеток в периферической крови. Выявлено, что у детей первой основной группы относительное число Т-лимфоцитов ($CD3^+$) было достоверно ниже, как по отношению к группе контроля (55,51+3,62 % против 62,34+4,63 %, p<0,05), так и ко второй основной группе (55,51+3,62 % против 60,57+3,03 %, p<0,05). Удельный вес Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+/CD4^+$ был достоверно ниже в первой основной группе, как по отношению к контролю (32,57+1,61 % против 40,15+0,86 %, p<0,05), так и ко второй основной группе (32,57+1,61 % против 34,39+1,01 %, p<0,05). Показано, что относительное содержание Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+/CD8^+$ было повышенно во второй основной группе по отношению к контрольной группе (27,78+2,39 % против 22,38+1,05 %, p<0,05) и к первой основной группе (27,78+2,39 % против 22,64+3,53 %, p<0,05). Анализ уровня наивных Т-лимфоцитов хелперов ($CD3^+/CD4^+$/CD45Ra) и тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов ($CD3^+/CD4^+/CD45Ra/CD31^+$) показал достоверно значимое уменьшение этих субпопуляций у детей первой основной группы (ВПС с тимэктомией), как по отношению к группе контроля (для $CD3^+/CD4^+/CD45Ra$: 37,18+3,59 % против 49,57+2,84 %, p<0,05; для $CD3^+/CD4^+/CD45Ra/CD31^+$: 65,14+2,76 % против 81,61+1,71 %, p<0,05), так и ко второй основной группе (для $CD3^+/CD4^+/CD45Ra$: 37,18+3,59 % против 43,12+5,17 %, p<0,05; для $CD3^+/CD4^+/CD45Ra/CD31^+$: 65,14+2,76 % против 78,14+4,72 %, p<0,05).

Вывод. Тимэктомия у детей с ВПС в неонатальном и младенческом периодах приводит к компенсированному Т-клеточному иммунодефициту, проявляющемуся в относительном дефиците Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов хелперов, наивных Т-лимфоцитов хелперов и тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов в периферической крови. Эти данные надо учитывать при диспансеризации детей после хирургического лечения ВПС и тимэктомии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance / P. Peterson, Tõnis Org, A. Rebane et al. // Nature Reviews Immunology.– 2008.– № 8.– С. 948-957.
2. Neonatal thymectomy: does it affect immune function? / P.R. Wells, E. Smogorzewska, M. Barr et al. // J. Thorac. Cardiovasc. Surg.– 1998.– V. 115.– С. 1041-1046.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF CHILDREN AFTER THYMECTOMY, WHEN PERFORMED SURGICAL TREATMENT OF CONGENITAL HEART DISEASE

Shmulevich S.A.[1], Shabaldin A.V.[2,3], Rovda Y.I.[3], Sizova I.N.[2]

[1]Kemerovo cardiological dispensary; [2]Research Institute for Complex issues of cardiovascular diseases; [3]Kemerovo state medical Academy of MH of RF, Kemerovo, Russia

Continues to be studied the role of thymectomy in the development of immunodeficiency in children undergoing surgical treatment of congenital heart disease (CHD). Clinical and immunological study of 28 children with CHD operated in the first year of postnatal life. Thymectomy was performed in 14 children. The frequency of acute respiratory infections in children after thymectomy was comparable with the control. The deficit of T lymphocytes, T helper cells, naive T helper cells and thymic naive T helper cells in peripheral blood was detected in children after thymectomy.

Keywords: thymectomy, congenital heart defects, immunodeficiency.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ МАТРИКС МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-3 ПРИ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

Снимщикова И. А., Халилов М. А., Шохина М. Д., Снимщикова А. Д., Малая Н. С.

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», Медицинский институт, Орёл, Россия

В настоящее время большое внимание уделяется изучению матриксных металлопротеиназ как белков тканевого ремоделирования в развитии ряда патологических состояний. Однако их роль в регуляции процессов репаративной регенерации тканей исследована недостаточно. Проведено исследование по определению концентрации матрикс металлопртеиназы-3 у больных с раневой инфекцией. Установлено, что концентрация матрикс металлопротеиназы-3 может рассматриваться как один из важных прогностических маркеров течения раневого процесса при гнойных ранах.

Ключевые слова: матрикс металлопротеиназа-3, раневой экссудат, проколлагеназа.

Актуальность. В настоящее время большое внимание уделяется изучению матриксных металлопротеиназ как белков тканевого ремоделирования в развитии ряда патологических состояний. Однако их роль в регуляции процессов репаративной регенерации тканей исследована недостаточно. Известно, что матрикс металлопротеиназа-3 (ММР-3) катализирует деградацию многих компонентов соединительной ткани, включая протеогликаны, коллаген типов II, IV, IX, XI, Э ламинин и фибронектин, а также оказывает опосредованное действие на деградацию экстрацеллюлярного матрикса через активациию проколлагеназы-1.

Целью данной работы являлось изучение динамики изменений продукции матрикс металлопртеиназы-3 у больных с раневой инфекцией.

Используемые методы. Под нашим наблюдением находились 145 больных с различными причинами возникновения гнойных ран (средний возраст 42,7±3,5 лет), получавших традиционное лечение: 65 – с ранами после вскрытия абсцессов и флегмон мягких тканей; 20 – с послеоперационными ранами, 30 – с посттравматическими ранами; 30 – с флегмонозно-некротической формой рожи. Концентрацию ММР-3 в сыворотки крови и раневом экссудате (РЭ) определяли методом ИФА с использованием тест-систем (BioSource Europe S. A.).

Для получения РЭ использовали стерильные марлевые тампоны, которые помещали в рану с экспозицией на 20-30 секунд. После аппликации пропитанный тампон вносили в пробирку с 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на 30 минут с последующим его удалением после центрифугирования в течение 5 минут при 1500 об./мин.

Для определения иммунологических показателей, принимаемых за физиологическую норму, были обследованы 20 здоровых лиц (средний возраст 45,1±0,5 лет).

Результаты исследований. При анализе показателей ММР-3 до лечения в сыворотке крови и РЭ больных было выявлено повышение ее концентрации (до 28,4±7,8 нг/мл в РЭ и до 16,7±2,5 нг/мл – в сыворотке крови). Вероятно, данные изменения носят адаптивный характер и направлены на ликвидацию последствий повреждения и стабилизацию репарации. У здоровых лиц уровень ММР-3 составил 0,8±0,5 нг/мл.

Следует также отметить более высокий уровень ММР-3 в раневом экссудате на фоне затяжного течения патологического процесса в мягких тканях. При этом существенная разница в концентрации ММР-3 в РЭ больных с различными вариантами течения гнойных ран фиксировалось, как правило, между 5-ми и 7-ми сутками, а уровень ММР-3 в раневой

жидкости выше 15 нг/мл после 7 дня был характерен лишь для пациентов с затяжным и хроническим течением раневого процесса.

Анализ динамики ММР-3 у больных гнойными ранами в процессе лечения показал, что восстановление показателя матрикс металлопротеиназы-3 при неосложнённом течении раневого процесса начинается с 5-7 суток и завершается к 10-13 суткам лишь у 52 % больных при традиционном лечении гнойных ран.

Восстановление уровня ММР-3 у больных с неблагоприятным течением гнойной раны происходит не ранее 12-14 дня и является более продолжительным. Так, после традиционного лечения флегмонозно-некротической формы рожи и посттравматических ран (в среднем на 21,5±2,4 день) концентрация ММР-3 ниже 5 нг/мл в сыворотке крови и менее 10 нг/мл в РЭ регистрировались лишь у 21,2 % и 15,2 % больных, соответственно. Полученные результаты позволяют рассматривать показатель ММР-3 более 15 нг/мл в качестве одного из важных прогностических маркеров развития затяжного и хронического течения раневого процесса при гнойных ранах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Халилов М. А. Иммунокоррекция раневой инфекции: монография. / М. А. Халилов, И. А. Снимщикова.– Lambert Academic Pablishing, 2012 г.– 108 С.
2. Халилов М. А. Клинико-иммунологическая эффективность способов локальной иммунокоррекции с использованием миелопида и NO-терапии в комплексном лечении гнойных ран: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра. мед. наук (14.03.09) / Халилов Максуд Абдуразакович.– Курск, 2010.– 44 с.
3. Stančiūtė D., Girulytė A., Ulys A. Matrix metalloproteinase 3 and matrix metalloproteinase 9 expression and polymorphisms analysis in bladder cancer. / D. Stančiūtė, A. Girulytė, A. Ulys. // Acta medica lituanica.– 2007.– V.14., N.3.– P. 174-177.

DYNAMICS OF CHANGES IN CONCENTRATIONS OF MATRIX METALLOPROTEINASE-3 IN WOUND INFECTION

Snimshchikova I. A., Khalilov M. A., Shokhina M. D., Snimshchikova A. D., Malaya N. S.

Orel State University named after I. S. Turgenev, Medical Institute, Orel, Russia

Currently, much attention is paid to the study of matrix metalloproteinases as proteins of tissue remodeling in the development of a number of pathological states. However, their role in the regulation processes of reparative regeneration of tissues has not been adequately studied. There was a study conducted on determination of matrix metalloproteinase-3 concentration in patients with wound infection. It is ascertained that the concentration of matrix metalloproteinase-3 can be considered as one of the most important prognostic markers of wound process course in suppurative wounds.

Keywords: matrix metalloproteinase-3, wound exudates, procollagenase.

РОЛЬ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ РАНАХ И РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

Снимщикова И. А., Халилов М. А., Шохина М. Д., Снимщикова А. Д., Михайлова Е. Н.

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», Медицинский институт, Орёл, Россия

Toll-подобные рецепторы рассматриваются как ключевые рецепторы, опосредующие реализацию врождённого иммунитета на микробные патогены. Проведено исследование по определению экспрессии TLR2 клетками раневого экссудата и мононуклеарными фагоцитами крови больных с острой и хронической раневой инфекцией. Установлено, что нарушение TLR сигнальных взаимодействий может быть одной из причин иммунной дисфункции при гнойных ранах.

Ключевые слова: Toll-подобные рецепторы, раневой экссудат.

Актуальность. По современным представлениям одним из ключевых звеньев патогенеза гнойных ран является развитие иммунной дисфункции, что приводит к нарушению нормального заживления тканей на одной и более стадиях развития раневого процесса и замедляет репарацию. При этом закономерности дисрегуляции системных и локальных компонентов противоинфекционного иммунитета у больных гнойными ранами являются дискутабельными и нуждаются в уточнении.

На сегодняшний день достаточно полно охарактеризованы пути передачи сигналов через рецепторы, распознающие «патоген-ассоциированные молекулярные образы» (PRR – pattern-recognition receptors), и выполняющие интегрирующую функцию между врождённой и адаптивной иммунной системой. Среди PRR Toll-подобные рецепторы рассматриваются как ключевые рецепторы, опосредующие реализацию врождённого иммунитета на микробные патогены. Наиболее широким спектром специфичности среди всех идентифицированных TLR обладает TLR2, связывающий липопротеины грамположительных и грамотрицательных бактерий, пептидогликан и липотейхоевую кислоту грамположительных бактерий, грибковый зимозан. Предположив, что нарушение TLR сигнальных взаимодействий может быть одной из причин иммунной дисфункции при гнойных ранах, целью работы явилось изучение экспрессии TLR2 клетками раневого экссудата и мононуклеарными фагоцитами крови здоровых лиц и больных с данной патологией.

Используемые методы. Для определения роли TLR2 в течение раневого процесса были обследованы 145 больных с различными причинами возникновения гнойных ран (средний возраст 42,7±3,5 лет), получавших традиционное лечение: 65 – с ранами после вскрытия абсцессов и флегмон мягких тканей; 20 – с послеоперационными ранами, 30 – с посттравматическими ранами; 30 – с флегмонозно-некротической формой рожи.

Мононуклеары периферической крови здоровых лиц и больных с раневой инфекцией выделяли с использованием метода дифференциального центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографин. Разделение суммарной фракции мононуклеаров на моноциты и лимфоциты осуществляли посредством избирательной адгезии моноцитов к пластику.

Для получения раневого экссудата (РЭ) использовали стерильные марлевые тампоны, которые помещали в рану с экспозицией на 20-30 секунд. После аппликации пропитанный тампон вносили в пробирку с 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на 30 минут с последующим его удалением после центрифугирования в течение 5 минут при 1500 об./мин. Оценка экспрессии TOLL-2 рецепторов производилась путем подсчёта $CD282^{+}$ клеток с помощью моноклональных антител Hbt (Нидерланды) непрямым иммунопероксидазным методом.

Результаты исследований. Результаты проведенных исследований показали, что у 76 % больных с гнойными ранами в течение первых 6 суток, определялся более высокий уровень экспрессии TLR2 клетками раневого экссудата (повышение числа $CD282^+$ клеток до 74,5±1,5 %), по сравнению с мононуклеарными фагоцитами (МНФ) крови здоровых лиц и больных (42,5±2,5 % и 61,4±4,5 %, соответственно), что, вероятно, связано с повышенной концентрацией микробных патогенов в зоне инфекционно-воспалительного процесса. Вероятно, такой высокий уровень экспрессии TLR2 индуцирует выработку антимикробных пептидов, что согласуется с ранее полученными данными. При неосложнённом течении раневого процесса уровень экспрессии TLR 2 клеточных рецепторов, как правило, снижался к 9 суткам. Вместе с тем, у 24 % пациентов регистрировалось низкое (ниже 40 %) содержание в РЭ $CD282^+$ клеток, экспрессирующих TLR 2, что может быть связано, с одной стороны, со «сбрасыванием» этих иммунорегуляторных молекул гиперактивированными клетками очага воспаления, а с другой – с генетическими дефектами экспрессии TLR2 фагоцитами. Данная динамика была характерна лишь для больных с обширными и хроническими гнойными ранами. Наиболее часто из гнойных ран у этих пациентов «высевался» золотистый стафилококк (52 % случаев) или его ассоциации (41 %).

Следует отметить, что у здоровых лиц в 10 % случаев отмечалось исходное повышение экспрессии $CD282^+$ мононуклеарами крови, по-видимому, связанное с физиологической гетерогенностью в данной группе.

У большинства больных с затяжной и хронической раневой инфекцией (64,5 %) число $CD282^+$МНФ периферической крови соответствовало показателям здоровых лиц, т.е. было снижено по сравнению с количеством $CD282^+$ клеток при благоприятном течении раневого процесса, что, по-видимому, свидетельствует о неполноценности механизмов противомикробной защиты и снижении адаптационных возможностей у данной категории пациентов. При этом повышение числа $TLR2^+$ клеток периферической крови регистрировалось у 35,5 % пациентов с затяжными и хроническими гнойными ранами. Более неблагоприятные изменения динамики цитологических показателей имели место у больных с флегмонозно-некротической формой рожи. При этом более высокий «темп» прироста $CD282^+$ клеток сочетался с более благоприятной клинической динамикой раневого процесса.

Таким образом, нарушение TLR сигнальных взаимодействий может быть одной из причин иммунной дисфункции при гнойных ранах, что обосновывает актуальность их изучения при данной патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Халилов М. А., Снимщикова И. А. Роль факторов врождённого иммунитета в патогенезе и диагностике воспалительных заболеваний кожи. / М. А. Халилов, И.А Снимщикова // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. XVI, № 4.– С. 174-176.
2. Халилов М. А., Снимщикова И. А. Опыт использования локальной иммунокоррекции в лечении гнойных ран. / М. А. Халилов, И.А Снимщикова // Медицинская иммунология.– 2010.– Т. 12, № 3.– С. 227-234.
3. Снимщикова И. А., Халилов М. А., Плотникова М. О. Роль эндогенных антимикробных пептидов при инфекционно-воспалительных процессах. / И.А Снимщикова, М. А. Халилов, М. О. Плотникова // Российский иммунологический журнал.– 2014, Т. 8.– № 3 (17).– С. 401-404.

THE ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN WOUNDS AND WOUND INFECTION

Snimshchikova I. A., Khalilov M. A., Shokhina M. D., Snimshchikova A. D., Mikhailova E. N.

Orel state University named after I. S. Turgenev, Medical Institute, Orel, Russia

The toll-like receptors are considered as key receptors mediating the realization of innate immunity on microbial pathogens. There was a research conducted on determination the TLR2 expression by the cells of wound exudate and mononuclear blood phagocytes with patients with acute and chronic wound infection. It is ascertained that the violation of TLR signaling interactions may be one of the causes of immune dysfunction in septic wounds.

Keywords: TLR, wound exudates.

ВАРИАНТЫ ДЕФЕКТНОГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ С ВРОЖДЕННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ

Смерчинская Т. В.[1], Нестерова И. В.[2], Чудилова Г. А.[1], Ковалева С. В.[1], Ломтатидзе Л. В.[1], Клещенко Е. И.[1], Сапун О. И.[1]

[1]ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар; [2]ГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки России, Москва, Россия

Выявлены различные варианты нарушения функционирования иммунной системы (ИС) у новорожденных детей с врожденной пневмонией, характеризующиеся различной по выраженности дефектностью функционирования нейтрофильных гранулоцитов, Т, В, ЕК клеток, отсутствием в разной степени выраженности адекватного иммунного ответа на инфекционно-воспалительный процесс. Выявленные глубокие дефекты функционирования ИС, а также срыв иммунологической адаптации, обосновывают необходимость разработки новых подходов к проведению дифференцированной иммунотерапии.

Ключевые слова: врожденная пневмония, иммунная система, новорожденные.

Оптимизация диагностики и лечения внутриутробных инфекций, и в частности, врожденной пневмонии (ВП) – важная задача современной неонатологии. Новорожденные с ВП относятся к группе высокого риска, что определяется «стертостью» и неспецифичностью ранних клинических симптомов, повышенной восприимчивостью к инфекциям на фоне неэффективности традиционной терапии [1]. Показано, что при ВП имеют место различные нарушения иммунной системы (ИС), цитокинового статуса, функционирования нейтрофильных гранулоцитов (НГ) [2, 3]. Возрастание частоты возникновения ВП, тяжелое течение и негативные исходы болезни, неэффективность, в ряде случаев, проводимой терапии, диктуют необходимость проведения комплексного исследования особенностей состояния и функционирования ИС при ВП и разработки новых подходов к проведению иммунотерапии.

Цель исследования: уточнить особенности дефектного функционирования ИС при ВП, базируясь на данных сравнительного исследования состояния ИС здоровых доношенных новорожденных первых дней жизни и новорожденных с врожденной пневмонией тяжелого течения.

Материалы и методы. Исследованы 2 группы новорожденных. Группу № 1 составили 22 здоровых новорожденных с гестационным возрастом 38-40 недель, весом 2880-4370 г на 3-6 сутки жизни. В группу № 2 вошли 19 новорожденных (11 мальчиков, 8 девочек), со сроком гестации 38-40 недель, весом 2880-4370 г на 3-6 сутки жизни, поступивших в отделение реанимации и интенсивной терапии Детской краевой клинической больницы с диагнозом врожденная пневмония тяжелого течения (ВПтт). Исследования проведены на 2-3 сутки поступления в стационар. При анализе у новорожденных с ВПтт в группе № 2 был обнаружен разброс данных, обусловленный различным содержанием общего числа лейкоцитов и нейтрофилов (НГ) периферической крови, выделены 2 клинические группы. В группу № 2а вошли 14 новорожденных с количеством лейкоцитов и НГ, не отличающихся от здорового контроля, в группу № 2б – 5 детей с лейкопенией и нейтропенией. Тестировалось состояние Т-клеточного ($CD3^+CD19^-$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$), В-клеточного ($CD3^-CD19^+$), гуморального (IgA, IgG, IgM) звеньев, естественных киллерных клеток (ЕКК) ($CD3^-CD16^+CD56^+$). Проведено исследование фаго-

цитарной с оценкой степени завершенности (%ФАН, ФЧ, ФИ,%П, ИП) и микробицидной функции НГ(NADPH-оксидазы (NBTтест), миелопероксидазы (МП), катионных белков (КБ) в нагрузочных тестах в системе *in vitro* с *St.aureus*). В спонтанном и стимулированном тестах определялся средний цитохимический индекс – СЦИ, коэффициент мобилизации – СЦИст/СЦИсп для NADPH-оксидаз и МП и коэффициент реализации – для КБ.

Результаты. На основании полученных результатов было показано, что у новорожденных групп № 2а и № 2б с ВП имеется выраженная недостаточность клеточного и гуморального звеньев ИС по сравнению с группой № 1: снижено абсолютное и относительное содержание Т-лимфоцитов за счет снижения уровня $CD3^+CD8^+$ клеток, имеют место дефицит В – лимфоцитов и количества ЕКК. Выявленные нарушения были наиболее ярко выражены у новорожденных группы № 2б на фоне лейкопении и нейтропении. В обеих группах с ВПтт выявлена достоверно сниженная концентрация IgG (в 1,5 раза), на фоне увеличения концентрации IgM в 2 раза в группе № 2а и в 1,5 раза в группе № 2б по сравнению с величинами, характерными для здоровых новорожденных группы № 1 ($p1<0,05$; $p2<0,05$). Известно, что при стимуляции инфекционными агентами уже с 13-14-й недели внутриутробного развития может начаться синтез IgA, при этом сывороточный IgA часто определяется у детей с внутриутробной инфекцией. Нами было отмечено повышение концентрации IgA в 2 раза в группе № 2а по сравнению с группой № 1, тогда как в группе № 2б выявлены лишь тенденции к повышению концентрации IgA. При оценке системы НГ, выявлены два варианта дефектного функционирования НГ при ВПтт. В исследуемой группе № 2а имеют место: неадекватность количественного прироста НГ при острой бактериальной инфекции, снижение% ФАН, дефект активности МП, дефицит КБ, неадекватность ответа в нагрузочных тестах в системе *in vitro* (нарушена индуцированная активность NADPH-оксидаз, МП и реализация КБ при стимуляции бактериальным АГ). В исследуемой группе № 2б имеют место еще более выраженный глубокий дефицит НГ,%ФАН на фоне значительно сниженной активности NADPH-оксидаз и МП в спонтанных тестах и отсутствии ответа в нагрузочных тестах в системе *in vitro*. При этом в группе № 2б дефицит КБ был менее выражен по сравнению с группой № 2а.

Выводы:

1. Дефектное функционирование ИС новорожденных детей с ВПтт может развиваться по нескольким сценариям. С одной стороны, наблюдается отсутствие развития адекватного иммунного ответа на присутствующий патоген, с другой стороны, может иметь место нарушение гранулоцитопоэза, сопровождающееся лейкопенией и нейтропенией, что сопряжено с большей дефектностью функционирования ИС.

2. В обоих вариантах нарушений ИС ведущую роль играет дефектность функционирования первой линии защиты,– нейтрофильных гранулоцитов, более выраженная в группе № 2б с нейтропенией. Кроме того, низкий уровень Т-цитотоксических лимфоцитов, ЕКК, незрелость В-клеток, их низкая функциональная активность, более выраженные в группе № 2б, усугубляют нарушения возможности развития адекватного иммунного ответа, что проявляется более дефектной элиминацией патогенов и развитием более тяжелого инфекционно-воспалительного процесса – ВПтт.

3. Выявленные нарушения функционирования ИС у новорожденных с ВПтт, диктуют необходимость разработки дифференцированных подходов к проведению рациональной иммунотропной терапии, и подключению ее на ранних этапах лечения болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Camacho-Gonzalez A., Spearman P. W., Stoll B. J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis/ A. Camacho-Gonzalez, P. W. Spearman, B. J. Stoll // Pediatr. Clin. North Am.– 2013.– V.60 (2).– P. 367-389.
2. Особенности цитокинового профиля здоровых новорожденных / И. В. Нестерова, Е. И. Клешенко, Г. А. Чудилова и др. // Аллергология и иммунология.– 2011.– Т. 12, № 1.– С. 133.
3. Нарушения функционирования нейтрофильных гранулоцитов при врожденных пневмониях у новорожденных / И. В. Нестерова, Н. В. Колесникова, Е. И. Клешенко и др. // Российский иммунологический журнал.– 2012.– № 1.– С. 224-226.

VARIANTS OF DEFECTIVE FUNCTIONING OF IMMUNE SYSTEM IN INFANTS WITH SEVERE CONGENITAL PNEUMONIA

Smerchinskaya T. V.[1], Nesterova I. V.[2], Chudilova G. A.[1], Kovaleva S. V.[1], Lomtatidze L. V.[1], Kleschenko E. I.[1], Sapun O. I.[1]

[1]SBEI HPE Kuban State Medical University of Health Ministry of Russian Federation, Krasnodar;
[2]SBEI HPE Russian University of Peoples Friendship of Ministry of education and science of Russian Federation, Moscow, Russia

The immune system (IS) of newborns with severe congenital pneumonia characterized by different variants of defect functioning of neutrophilic granulocytes, T, B, NK cells. IS patients with severe congenital pneumonia was not able to realize adequately reaction to infectious-inflammatory process. Identified deep defects of functioning of innate immunity and disruption of immunological adaptation justify the need for different methods of immunotherapy.

Keywords: congenital pneumonia, immune system; infants.

СОВРЕМЕННЫЙ ПРОФИЛЬ КАЧЕСТВА, ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

Кудашева Э. Ю., Олефир Ю. В., Иванов В. Б., Борисевич И. В., Бондарев В. П.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

В статье представлена совокупность характеристик, составляющих современный профиль качества, эффективности и безопасности препаратов иммуноглобулина человека для внутривенного введения.

Ключевые слова: иммуноглобулин человека для внутривенного введения, характеристики профиля качества, эффективности и безопасности.

Препараты иммуноглобулина человека для внутривенного введения (ИГВВ) представляют собой иммунологически активную белковую фракцию, выделенную из плазмы крови человека, основным активным компонентом которой является иммуноглобулин G (IgG), обладающий активностью антител различной специфичности в отношении различных антигенов [1].

Профиль качества, эффективности и безопасности препаратов ИГВВ – это совокупность характеристик, присущих данной группе иммунобиологических лекарственных препаратов крови человека.

Характеристиками современных препаратов ИГВВ являются биологическая, иммунологическая, токсикологическая, специфическая безопасность, соответствие установленным критериям для данной группы препаратов по физико-химическим и иммунохимическим показателям, наличие биологической (специфической) активности.

Профиль качества, эффективности и безопасности препаратов ИГВВ подтверждается комплексно, с учетом биологического происхождения субстанции, состава лекарственного препарата, остаточного содержания вспомогательных веществ и всех вносимых компонентов, участвующих в процессе производства, лекарственной формы, технологии производства, выбора первичной и вторичной упаковки.

Препараты ИГВВ выпускают в жидкой или лиофилизированной формах с использова-

нием первичной упаковки, которая обеспечивает сохранение заявленных свойств препарата в течение регламентированного срока годности. Жидкие препараты представляют собой бесцветные или со светло-желтой окраской, прозрачные или слабо опалесцирующие растворы. Препараты ИГВВ соответствуют установленным критериям для данной группы по физико-химическим и иммунохимическим показателям: прозрачность, цветность, pH, содержание белка, фракционный состав, электрофоретический состав, осмоляльность, механические включения (видимые и невидимые), извлекаемый объем, термостабильность (для жидких препаратов) и др.

Использование для производства препаратов ИГВВ пула плазмы не менее чем от 1000 здоровых доноров является фундаментом обеспечения их специфической (антибактериальной и противовирусной) активности в связи с потенциальным присутствием антител различной специфичности в отношении разных антигенов. Метод, выбранный для выделения фракции иммуноглобулина (фракционирования, хроматографической очистки, концентрирования, фильтрации, адсорбции и др.), гарантирует не только требуемую степень концентрации антител в процессе производства не менее чем в 3 раза при содержании белка в препарате 4,5-5,5 %, и не менее чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9,0-11,0 % [1], но и вирусную и специфическую безопасность получаемых препаратов ИГВВ. В процессе фармацевтической разработки препаратов ИГВВ подтверждается их функциональная активность определением уровня сохранности активности Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG и распределение его подклассов. Для обеспечения вирусной безопасности препаратов ИГВВ предусмотрено введение в технологию производства нескольких стадий вирусной инактивации и/или элиминации вирусов, для которых доказано снижение концентрации модельных вирусов [2]. Производственный процесс препаратов ИГВВ обязательно включает и стадии эффективного удаления или нейтрализации тромбинообразующих агентов, активированных факторов свертывания и их проэнзимов [3], что обеспечивает их специфическую безопасность.

Потенциальная биологическая опасность препаратов ИГВВ связана и с другими ее видами – микробиологической, опасностью содержания пирогенных веществ и бактериальных эндотоксинов. Современные лекарственные препараты ИГВВ стерильны, апирогенны, содержат бактериальные эндотоксины в допустимых количествах, установленных для данной группы препаратов [4].

Токсикологическая безопасность рассматриваемой группы препаратов подтверждается количественным определением остаточного содержания вирусинактивирующих агентов (например, три-н-бутилфосфата, тритона Х-100, октоксинола, полиэтиленгликоля, натрия холата, полисорбата-80, β-пропиолактона и др.) и стабилизаторов (например, натрия хлорида, глицина, глюкозы, мальтозы, пролина, натрия каприлата). Препараты ИГВВ не обладают аномальной токсичностью, не содержат консервантов и антибиотиков.

Профиль качества, эффективности и безопасности препаратов ИГВВ динамично меняется с учетом мониторинга характера возникших нежелательных реакций при клиническом применении после их регистрации. Зарегистрированные случаи развития аллергических и анафилактических реакций при введении высоких доз препаратов ИГВВ вызвали необходимость организации мер по обеспечению их иммунологической безопасности. Обязательно определение их подлинности (видоспецифичности) для подтверждения гомологичности сырья, используемого для производства, установлены допустимые пределы содержания IgA. Профиль качества препаратов ИГВВ подтверждается по показателям биологической активности. Препараты ИГВВ обладают специфической активностью, что позволяет прогнозировать их эффективность при терапевтическом использовании. Количественное определение содержания антибактериальных антител (минимум против одного возбудителя) и противовирусных антител (минимум против одного возбудителя) – обязательное требование для препаратов рассматриваемой группы. Спектр тестируемых противовирусных и антибактериальных антител представлен определением антител к парвовирусу В19, стафилококковому экзотоксину, вирусу кори и краснухи, полиомиелиту, вирусу гепатита В, столбнячному токсину, к типоспецифическим пневмококковым полисахаридным антигенам и др.

Методы, используемые для оценки профиля качества, эффективности и безопасности современных препаратов ИГВВ, научно обоснованы, информативны, объективны и адекват-

ны. Спектр используемых методов обширен и включает физико-химические, иммунохимические, иммунологические, биологические, микробиологические, коагулометрические, молекулярно-генетические и др. Предусмотрена обязательная стандартизация методов оценки характеристик препаратов ИГВВ с использованием стандартных образцов (СО), аттестованных по отношению к Международным СО (при наличии последних).

Совокупность характеристик препаратов ИГВВ, составляющих профиль их качества, эффективности и безопасности, закреплена законодательно на государственном уровне фармакопейными требованиями, которые разработаны и периодически пересматриваются с учетом современных законодательных актов, государственных стандартов, научных разработок и международного опыта в области производства, контроля качества и применения лекарственных препаратов крови человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения: ФС.3.3.2.0008.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации.– XIII изд-е.– Т. III [Электронный ресурс]. URL: http://193.232.7.107/feml (дата обращения: 15.03.2016).
2. Современные технологические подходы к обеспечению вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов человека / Э.Ю. Кудашева, И.В. Борисевич, В.И. Климов и др. // Успехи современного естествознания.– 2015.– № 5.– С. 132-138.
3. Human normal immunoglobulin for intravenous administration 01/2012:0918 // European Pharmacopoeia online 8.5 [Электронный ресурс]. URL: http://online6.edqm.eu/ep805/# (дата обращения: 15.03.2016).
4. Препараты крови человека и животных в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности / М.В. Супотницкий, А.А. Елапов, И.В. Борисевич и др. // Биопрепараты.– 2015.– № 3.– С. 33-48.

MODERN PROFILE OF THE QUALITY, EFFECTIVENESS AND SAFETY OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN PREPARATIONS FOR INTRAVENOUS ADMINISTRATION

Kudasheva E. Yu., Olefir Yu.V., Ivanov V.B., Borisevich I.V., Bondarev V.P.

FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» under the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The set of characteristics of the modern profile of the quality, effectiveness and safety of human immunoglobulin preparations are presented in the article.

Keywords: human immunoglobulin for intravenous administration, characteristics of the profile of the quality, effectiveness and safety.

ЭКСПЕРТНАЯ ОЦЕНКА ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНОГО

Иванов В. Б., Бондарев В. П., Кудашева Э. Ю., Мосягин В. Д., Борисевич И. В., Меркулов В. А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Представлены экспертные подходы к оценке материалов доклинических и клинических исследований препаратов иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения.

Ключевые слова: иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения, экспертиза, доклинические исследования, клинические исследования.

В Российской Федерации (РФ) зарегистрированы 14 препаратов иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения (ВВИГ), из них 9 зарубежного производства. ВВИГ являются основными по клинической значимости в лечении пациентов с первичными иммунодефицитами (ПИД) с нарушенной продукцией антител (врожденные агаммоглобулинемия и гипогаммаглобулинемия, общая вариабельная иммунная недостаточность, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, синдром Вискотта-Олдрича), а также вторичными иммунодефицитами (при множественной миеломе с тяжелой формой вторичной гипогаммаглобулинемии и рецидивирующими бактериальными инфекциями при неэффективности вакцинации пневмококковой вакциной, при хроническом лимфоцитарном лейкозе с тяжелой формой вторичной гипогаммаглобулинемии и рецидивирующими бактериальными инфекциями при неэффективности профилактической антибактериальной терапии, при врожденном синдроме приобретенного иммунодефицита человека у детей при наличии рецидивирующих инфекций, при гипогаммаглобулинемии у пациентов с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток). Эти показания к применению ВВИГ являются общепринятыми как в РФ, так и в мировой практике и отражены в инструкциях по применению практически всех ВВИГ, зарегистрированных в РФ [1, 2].

Использование ВВИГ в качестве иммуномодулирующего средства при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре (ИТП) у детей или у взрослых при высоком риске кровотечений или перед хирургическими вмешательствами с целью коррекции количества тромбоцитов, при синдроме Гийена-Барре, при болезни Кавасаки отражено в показаниях к применению не всех отечественных ВВИГ, так как большинство из них ранее регистрировались без проведения собственных клинических исследований.

При экспертизе эффективности и безопасности ВВИГ широко используются подходы руководств Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) [3, 4]. В руководствах EMA предъявляются следующие требования к объему представления материалов доклинических и клинических исследований: для новых препаратов ВВИГ при их соответствии по качеству требованиям Европейской фармакопеи, а производства – правилам производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) – токсикологические исследования проводятся только при изменении вспомогательных веществ в лекарственной форме, введении стадий химической инактивации вирусов, введении новых стабилизаторов в растворитель для лиофилизированных форм, а также в случае изменения технологии и состава лекарственной формы; клинические исследования начинаются фактически с III

фазы и проводятся одновременно на взрослых и детях с ПИД и ИТП. Положительные результаты клинических исследований являются основанием для применения ВВИГ по указанным выше показаниям.

Для других аутоиммунных заболеваний (мультифокальная моторная невропатия, хроническая воспалительная демиелинизирующая полирадикулоневропатия, миастения гравис и др.) требуются отдельные подтверждающие собственные клинические исследования [3]. Приблизительно в 33 % случаев препараты ИГЧН применяются не по показаниям (off-label) при более чем 50 заболеваниях [4].

До 01.01.2016 результаты собственных клинических исследований заявители при регистрации иммуноглобулинов, разрешенных для медицинского применения в РФ более 20 лет, могли не представлять. В Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» внесены изменения, предусматривающие при регистрации биологических препаратов, разрешенных для медицинского применения в РФ более 20 лет, необходимость представления с 01.01.2016 отчетов о результатах собственных доклинических (фармакодинамических, фармакокинетических, токсикологических) и собственных клинических (фармакокинетических, фармакодинамических, эффективности и безопасности, опыте пострегистрационного применения (при наличии)) исследований [5]. Подходы EMA к доклиническим и клиническим исследованиям ВВИГ существенно отличаются от последних требований Федерального закона № 61-ФЗ, но, безусловно, их следует использовать в части, не ему противоречащей. Состав и показатели качества препарата при проведении доклинических исследований должны соответствовать конечному продукту, представляемому на регистрацию. Качество препарата должно отвечать требованиям фармакопейной статьи «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения» (ФС.3.3.2.0008.15).

В доклинические исследования рекомендуется включить изучение острой и субхронической токсичности при однократном (мыши, крысы) и многократном (крысы) внутривенном введении в течение 30 дней, местнораздражающего действия в патоморфологических исследованиях места введения препарата (макроскопическое описание хвостовой вены), аллергенности. В качестве препарата сравнения может быть использован препарат ВВИГ, зарегистрированный в РФ.

Разработка и обоснование программы клинической разработки лекарственного препарата входит в компетенцию заявителя. Заявитель определяет и обосновывает цели, задачи, первичные и вторичные точки эффективности и безопасности протокола клинического исследования.

Учитывая состояние фармацевтических производств в РФ, считаем необходимым проведение при регистрации новых ВВИГ клинических исследований I фазы на здоровых добровольцах в целях установления безопасности и переносимости. При разработке протоколов клинических исследований III фазы рекомендуется использовать подходы, указанные в руководстве EMA [3], с учетом требований законодательства РФ.

В программу предрегистрационного клинического изучения препарата рекомендуется также включить: открытое клиническое исследование III фазы у взрослых пациентов с первичным иммунодефицитом в течение 12 месяцев с оценкой эффективности, безопасности, фармакокинетических параметров; открытое клиническое исследование III фазы у детей с первичным иммунодефицитом; открытое сравнительное рандомизированное клиническое исследование III фазы у взрослых пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой.

До выхода специальных руководств по экспертизе препаратов крови заявителям при регистрации ВВИГ и внесении изменений в регистрационное досье рекомендуется руководствоваться подходами, изложенными в настоящей статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Препараты иммуноглобулина человека нормального: эволюция взглядов на показания к применению / Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов, В. Д. Мосягин и др. // Фарматека.– 2015.– № 20.– С. 8-13.
2. Препараты крови человека и животных в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности / М. В. Супотницкий, А. А. Елапов, И. В. Борисевич и др. // Биопрепараты.– 2015.– № 3.– С. 33-48.
3. Guideline on the clinical investigation of human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg): EMA/CHMP/BPWP/94033/2007 rev. 2.

4. Concept paper on Guidline on the clinical investigation of human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg) and Core SmPC: EMA/CHMP/BPWP/572805/2013.
5. О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств»: Федеральный закон от 22.12.2014 N 429-ФЗ.

EXPERT EVALUATION OF PRECLINICAL AND CLINICAL INVESTIGATIONS OF DRUGS HUMAN NORMAL IMMUNOGLOBULIN

Ivanov V. B., Bondarev V. P., Kudasheva E. Yu., Mosyagin V. D., Borisevich I. V., Merkulov V. A.

FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» under the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Presents expert approaches to the evaluation of materials of preclinical and clinical investigations of drugs human normal immunoglobulin for intravenous administration.

Keywords: human normal immunoglobulin for intravenous administration, expert examination, preclinical investigations, clinical investigations.

Раздел 6
ИНФЕКЦИОННАЯ ИММУНОЛОГИЯ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФАГОЦИТАРНЫХ РЕАКЦИЙ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ С РАЗЛИЧНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Бердюгина О. В.[1,2], Ершова А. В.[1]

[1]ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ; [2]ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

Целью работы стало изучение функционально-метаболической активности моноцитов крови при инфильтративном туберкулезе легких, вызванном лекарственно устойчивыми и лекарственно чувствительными изолятами *M.tuberculosis* у представителей обоего пола. В работе представлены результаты обследования 54 человек, из них – 29 пациентов с инфильтративным туберкулезом легких и 25 здоровых доноров. Средний возраст больных составил 35,6 года. 42,2 % пациентов группы были мужчины, 57,8 % – женщины. Методом проточной цитофлюориметрии оценивались поглотительная функция моноцитов, их способность к окислительному взрыву, уровень экспрессии на них маркеров адгезии CD11b и CD11c. Использованы реагенты и оборудование фирмы Beckman Coulter, USA. Статистическая обработка результатов проведена с использованием программ «Microsoft Office Excel 2007» и «STATISTICA v.6.0». Установлено, что у пациентов с устойчивыми к терапии изолятами *M.tuberculosis* при инфильтративном туберкулезе легких отмечалось увеличение экспрессии CD11b и CD11c, у больных с чувствительными к лечению изолятами повышение абсолютного количества моноцитов, фагоцитирующих бактерии. У мужчин с инфильтративным туберкулезом активируется поглотительная функция клеток.

Ключевые слова: моноциты, инфильтративный туберкулез, проточная цитофлюориметрия

Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя в настоящее время составляет от 20 % до 77 % от общего числа больных инфекционным заболеванием в разных странах [2, 3]. По прогнозам в ближайшие годы доля этих пациентов будет только увеличиваться [4]. Патогенез туберкулеза, в том числе вызванного возбудителем с МЛУ, характеризуется изменением функционирования иммунной системы, и, прежде всего, фагоцитарного звена, что приводит к существенному снижению способности организма к отграничению инфильтративно-альтеративного поражения тканей инфицированного легкого. Изучение нарушения механизмов резистентности у больных при инфицировании их лекарственно устойчивыми или лекарственно чувствительными изолятами *Mycobactérium tuberculósis* представляет для исследователей большой интерес. Кроме того, в проведенных ранее исследованиях выявлено отличие заболеваемости туберкулезом среди мужчин и женщин, одной из причин которого является уровень половых гормонов. Исследований, оценивающих функциональную активность моноцитов больных туберкулезом легких, вызванных возбудителем с различной лекарственной чувствительностью немного [1, 5].

Целью данной работы стало изучение функционально-метаболической активности моноцитов крови при инфильтративном туберкулезе легких, вызванном лекарственно устойчивыми и лекарственно чувствительными изолятами *M.tuberculósis* у представителей обоего пола.

Материал и методы. Работа выполнена в соответствии с положениями Хельсинкской декларацией и одобрена этическим комитетом ФГБУ «УНИИФ» Минздрава России. Она включила клинико-лабораторное обследование 54 человек, из которых 29 находились на лечении в учреждении с 2011 по 2013 годы с диагнозом «инфильтративный туберкулез легких» распространенность процесса от 1 до 3 долей легкого и 25 практически здоровых людей, доноров крови. Средний возраст больных составил 35,6 года, из них 42,2 % были мужчины, 57,8 % – женщины. Больных туберкулезом, вызванным лекарственно чувствительными изолятами *M.tuberculósis* было 12 (1 группа) и вызванным лекарственно устойчивыми изолятами 17 (2 группа) с равным гендерным представительством. Доноры имели близкий возрастной и половой состав. Критериями включения в исследование были отрицательные результаты лабораторного обследования на маркеры вирусных гепатитов, вирус иммунодефицита человека, отсутствие участия в других клинических исследованиях.

Кровь у обследуемых забиралась натощак утром до начала лечения и приема физиотерапевтических процедур из локтевой вены однократно. Для оценки уровня экспрессии на поверхности моноцитов молекул адгезии (CD11b, CD11c) и HLA-Dr антигена использовалась цельная кровь с антикоагулянтом (этилендиаминтетрауксусная кислота), для определения фагоцитарной активности клеток – с гепарином лития. Оценка поглотительной и метаболической активности моноцитов, экспрессии молекул адгезии и HLA-Dr антигена осуществлялась методом проточной цитофлюориметрии на приборе COULTER®Epics®XL (Beckman Coulter, USA) с использованием моноклональных антител той же фирмы. Лизис эритроцитов осуществляли с помощью автоматической станции пробоподготовки Coulter® Q-Prep (BeckmanCoulter, USA) и реагентов Immunoprep производства компании Beckman Coulter, USA. Фагоцитарную активность клеток оценивали, используя реагенты Phagotest (Glycotope Biotechnology, Germany), метаболическую активность – BurstTest (Glycotope Biotechnology, Germany). Статистическая обработка результатов проведена с применением программ «Microsoft Office Excel 2007» и «STATISTICA v.6.0». Вычисляли основные статистические константы, показатели больных сравнивали с данными контрольной группы. Дополнительно устанавливали гендерные различия. Ввиду наличия небольшой выборки в исследовании, проверку статистических гипотез осуществляли с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение. Сравнительное изучение результатов обследования групп больных с инфильтративным туберкулезом, вызванным *M.tuberculosis* с лекарственной чувствительностью и МЛУ, показало следующее. Пациенты с чувствительными к лечению изолятами *M.tuberculósis* имели выраженную лейкоцитарную реакцию – разница с показателем контрольной группы составляла 23,4 %, больные, имевшие лекарственно устойчивые изоляты *M.tuberculósis,* отличались небольшим лейкоцитозом. Изучение численности популяции моноцитов показало сходную закономерность. В 1 группе число моноцитов было в 1,5 раза выше ($p<0,05$), чем в контрольной группе, тогда как у пациентов с устойчивыми изолятами возбудителя – оно возрастало на 7-20 %.

Для оценки поглотительной функции моноцитов нами был использован метод проточной цитофлюориметрии, с применением экзогенного стимулятора – опсонизированных бактерий *E.coli*. Установлено, что абсолютное число фагоцитирующих моноцитов незначительно увеличивалось в группе больных с лекарственно чувствительными изолятами *M.tuberculósis* (на 15,2 %), но оставалось практически неизменным во 2 группе в сравнении со здоровыми людьми. Доля этих клеток от общего числа моноцитов достоверно снижалась в обеих группах больных в сравнении с донорами: на 23 % у пациентов с лекарственно чувствительными и на 38,8 % у больных с лекарственно устойчивыми изолятами возбудителя заболевания. Таким образом, наибольшее количество фагоцитирующих моноцитов наблюдалось у больных с лекарственно чувствительными изолятами *M.tuberculosis*. Разница между показателями больных этой группы и показателями больных с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя составила 23,7 %.

Сходным образом изменялась и метаболическая активность исследованных клеток. Доля моноцитов, продуцирующих активные формы кислорода, от общего числа этих клеток достоверно снижалась независимо от лекарственной чувствительности возбудителя по сравнению

с группой доноров: на 21,8 % и 17,2 % в 1 и 2 группах больных соответственно.

Изучение экспрессии молекул адгезии – CD11b и CD11c на моноцитах показало, что при инфильтративном туберкулезе, вызванном лекарственно чувствительными изолятами *M.tuberculosis*, количество моноцитов, экспрессирующих на своей поверхности молекулу CD11b, практически не отличается от уровня группы здоровых лиц. При туберкулезе, вызванном МЛУ *M.tuberculósis*, абсолютное количество $CD11b^+$ моноцитов превышало этот показатель и в контрольной группе и в группе больных инфильтративным туберкулезом, вызванным лекарственно чувствительными изолятами *M.tuberculosis* в 1,3-1,4 раза. Экспрессия молекулы CD11c на моноцитах коррелировала с результатами изучения CD11b. В среднем в 1 группе она составляла $0,27\times10^9$ кл/литр (у здоровых добровольцев – $0,31\times10^9$ кл/литр), во 2 группе – $0,38\times10^9$ кл/литр.

Уровень экспрессии HLA-Dr-антигена на моноцитах у больных с лекарственно чувствительными изолятами на 51,7 % превосходил значения доноров, при изолятах *M.tuberculósis* с МЛУ – на 105,6 %. Это позволило утверждать, что при инфильтративном туберкулезе легких антигенпрезентирующая функция моноцитов остается выраженной, независимо от лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза.

Другой задачей исследования стало уточнение функционально-метаболических особенностей моноцитов крови у больных с инфильтративным туберкулезом с учетом гендерных отличий. В первую очередь обратило на себя внимание то, что у мужчин, независимо от лекарственной чувствительности возбудителя, наблюдалось резкое увеличение количества лейкоцитов и моноцитов: в сравнении с показателями контрольной группы повышение составило 1,5-2 раза. У женщин, напротив, эти показатели оставались практически сходными с результатами контрольной группы. Абсолютное количество фагоцитирующих моноцитов было несколько увеличено у мужчин. У женщин отмечалось уменьшение популяции данных клеток, при этом достоверный характер этих различий наблюдался только у женщин с туберкулезом, вызванным возбудителем с МЛУ. Бактерицидный потенциал моноцитов у женщин в сравнении с контролем снижался на 14 %, в то время как у мужчин он увеличивался в 1,7 раза, создавая разрыв с женщинами более, чем в 1,7 раза.

Заключение. Установлено, что у пациентов с устойчивыми к терапии изолятами *M.tuberculosis* при инфильтративном туберкулезе легких отмечается увеличение экспрессии CD11b и CD11c, у больных с чувствительными к лечению изолятами – повышение абсолютного количества моноцитов, фагоцитирующих бактерии. У мужчин с инфильтративным туберкулезом активируется поглотительная функция клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Активность фагоцитирующих клеток периферической крови у больных туберкулезом легких до и в процессе противотуберкулезной терапии / Н. А. Земляная, О. В. Филинюк, О. И. Уразова и др. // Медицинская иммунология.– 2006.– Т. 8.– № 2-3.– С. 266-267.
2. Кибраева З. Ю. Проблема и профилактика туберкулеза на современном этапе / З. Ю. Кибраева // Наука и мир.– 2014.– № 7(11).– С. 89-91.
3. Маркелов Ю. М. Особенности туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью и приоритетные мероприятия по ограничению его распространения в Карелии / Ю. М. Маркелов // Вестник современной клинической медицины.– 2011.– Т. 4.– № 3.– С. 50-56.
4. Нечаева, О. Б. Перспективы и возможности выполнения индикаторов госпрограммы развития здравоохранения Российской Федерации до 2020 года по туберкулезу / О. Б. Нечаева // Медицинский альянс.– 2013.– № 4.– С. 19-26.
5. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in hu-pbl-scid mice / S. M. Santini, C. Lapenta, M. Logozzi et al. // J. Exp.Med.– 2000.– V. 191.– № 10.– P. 1777-1788.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF PHAGOCYTOSIS MONOCYTES PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS FROM DIFFERENT DRUG SENSITIVITY OF PATHOGENS

Berdyugina O. V.[1,2], Ershova A. V.[1]

[1]Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, [2]Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

The plan of the work is the study of functional and metabolic changes in the activity of blood monocytes in infiltrative pulmonary tuberculosis, which is caused by drug-resistant and drug-susceptible isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in men and women. The results of a survey of 54 people. There were 29 patients with infiltrative pulmonary tuberculosis and 25 healthy donors. The average age of patients was 35.6 years. 42.2 % of the patients group were men, 57.8 % – women. The method of flow cytometry were evaluated absorbing function of monocytes, their ability to oxidative explosion, the expression level of adhesion markers CD11b and CD11c. Use reagents and equipment of the company Beckman Coulter, USA. Program «Microsoft Office Excel 2007" and «STATISTICA v.6.0» used for statistical processing of research. It was found that patients with therapy-resistant isolates of *M.tuberculosis* noted an increase in the expression of CD11b and CD11c, in patients with sensitive isolates to treatment – increasing the absolute number of monocytes phagocytic bacteria. Men with infiltrative tuberculosis activated absorption cell function.

Keywords: monocytes, infiltrative tuberculosis, flow cytometry.

ИНТЕРЛЕЙКИН-18 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ РИНОСИНУСИТА

Федин А. В., Баранова Н. И., Шкурова Н. А.

ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей МЗ РФ», Пенза, Россия

Изучали показатели IL-18 у 80 пациентов с острым бактериальным риносинуситом (ОБРС), 12 пациентов с хроническим риносинуситом (ХРС), 14 пациентов с хроническим риносинуситом с полипозом носа (ХРСПН). В качестве контрольной группы обследовано 30 практически здоровых людей. У пациентов с ОБРС и контрольной группы достоверно значимых отклонений не выявлено, однако у пациентов с ХРС отмечено достоверно низкие показатели по сравнению с ОБРС, а у пациентов с ХРСПН достоверно повышены показатели как с группой ОБРС, ХРС и контрольной группой. Полученные результаты по IL-18 в сыворотке крови у больных изучаемых групп можно использовать в диагностике и прогнозировании исхода заболевания.

Ключевые слова: острый бактериальный риносинусит, хронический риносинусит, хронический риносинусит с полипозом носа, интерлейкин-18.

Риносинусит (РС) является одним из самых распространенных заболеваний человека [2]. Так, по данным Европейского соглашения по риносинуситу и полипозу носа в редакции 2012 г (EPOS) заболеваемость острым риносинуситом (ОРС) в странах Европы составляет 6-15 % [5]. На фоне растущей резистентности к антибактериальным препаратам распространенность хронического риносинусита (ХРС) за последнее десятилетие выросла более чем в 2 раза [1]. Эпидемиологические исследования, проведенные в России выявили хронический риносинусит с полипозом носа (ХРСПН) у 1-1,3 % обследованных, этим заболеванием в нашей стране может страдать до 1,5 млн. человек. [3]. Интерлейкин-18 (IL-18), относится

к семейству IL-1, и является провоспалительным цитокином, который играет важную роль в защите организма от вирусов и бактерий, а также осуществляет связь между иммунной, эндокринной и нервной системами. Последние исследования показали контрастность функций данного цитокина: в синергизме с IL-12 и IFNα/β он вызывает усиленную продукцию цитокинов Th1-типа, а в синергизме с IL-2 индуцирует продукцию цитокинов Th2-типа. Поэтому в настоящее время преобладает мнение, что IL-18 реализует свои эффекты преимущественно через усиление активности других цитокинов. В доступной литературе мы не обнаружили работ, содержащих сравнительную оценку уровня IL-18 при остром и хроническом риносинусите.

Цель исследования: изучить показатели IL-18 сыворотке крови у пациентов с ОБРС, ХРС, ХРСПН.

Материалы и методы. В исследование было включено 92 пациента с ОБРС и 14 пациентов с ХРСПН. У 80 пациентов с ОБРС заболевание закончилось полным выздоровлением. У 12 пациентов ОБРС перешел в хроническую форму. Возраст пациентов составил от 22 до 62 лет. Все пациенты находились на стационарном лечении в отделении оториноларингологии ГБУЗ «Клиническая больница № 6 имени Г. А. Захарьина» (Пенза, Россия). Группу сравнения составили 30 здоровых человек того же возраста. Всем пациентам проводилось клиническое обследование, включавшее: общий осмотр ЛОР-органов, эндоскопическую риноскопию, радиологическое исследование (рентгенография или компьютерная томография околоносовых пазух). Определение уровня IL-18 в сыворотке крови проводилось методом ИФА (Вектор-Бест) в день поступления в стационар. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6,0 на персональном компьютере. При обработке полученных результатов исследований использовались методы параметрической и непараметрической статистики.

Результаты и обсуждение. При сравнительном анализе показателей IL-18 у больных с ОБРС 88,00 [69,30-141,30] пг/мл и контрольной группы 111,05[60,00-121,30] пг/мл достоверно значимых отклонений не было получено (Mann-Whitney test, p = 0,6513). Тем не менее, показатели IL-18 в сыворотке крови больных с ХРС 48,90 [38,60-55,00] пг/мл были достоверно ниже по сравнению с пациентами ОБРС 88,00 [69,30-141,30] пг/мл (Mann-Whitney test, p = 0,0013) и контрольной группой 111,05[60,00-121,30] пг/мл (Mann-Whitney test, p = 0,0001). Однако при исследовании уровня IL-18 в сыворотке крови больных ХРСПН 207,60 [166,30-303,60] пг/мл было выявлено достоверное повышение показателя как с группой ОБРС 88,00 [69,30-141,30] пг/мл, ХРС 48,90 [38,60-55,00] пг/мл так и контрольной группой 111,05[60,00-121,30] пг/мл (p<0,05).

Полученные данные свидетельствуют о наличии дефекта продукции IL-18 у больных с ХРС как основного цитокина, обладающего противобактериальной защитой. Повышенный уровень IL-18 в сыворотке больных ХРСПН является проявлением избыточной воспалительной реакции, приводящей к необратимому повреждению собственных тканей, что полностью согласуется с данными Okano M. и соавт., 2013 г, которые исследовали экспрессию IL-18 в тканях крючковидного отростка и носовых полипах у больных хроническим риносинуситом. В данном исследовании была обнаружена прямая корреляция уровня экспрессии данного цитокина с тяжестью риносинусита по данным рентгенологической картины и уровнем локальной эозинофилии [4].

Таким образом, уровень интерлейкина-18 в сыворотке крови имеет достоверные различия при различных формах риносинусита, что можно использовать для диагностики и прогнозирования исхода заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин А. С., Гамов В. П. Острый и хронический риносинусит: этиология, патогенез, клиника, диагностика и принципы лечения / А. С. Лопатин, В. П. Гамов.– М: Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, 2013.– 91 с. № 52.
2. Лопатин А. С., Свистушкин В. М. Острый риносинусит: Этиология, патогенез, диагностика и принципы лечения. Клинические рекомендации / А. С. Лопатин, В. М. Свистушкин.– М., 2008.– 26 с.
3. Клинические рекомендации «Полипозный риносинусит» / С. В. Рязанцев, А. С. Лопатин, Г. З. Пискунов и др. // Москва-Санкт-Петербург, 2014.
4. Characterization of IL-18 expression and release in the pathogenesis of chronic rhinosinusis / M. Okano, T. Fujiwara, S. Makihara et al. // Int Arch Allergy Immunol.– 2013.– № 160 (3).– P. 275-286.
5. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012 / Fokkens W. J., Lund V. J., Mullol J. et al. // Rhinol Suppl – 2012.– T. 23.– C. 9-42.

INTERLEUKIN-18 IN DIFFERENT FORMS RHINOSINUSITIS

Fedin A. V, Baranova N.I, Shkurova N.A.

Government Education Institution of Additional Professional Education of Federal Agency of Public Health Services and Social Development Penza Institution of Advanced Medical Studies, Penza, Russia

We studied the IL-18 indices in 80 acute bacterial rhinosinusitis (ABRS) patients, 12 patients with chronic rhinosinusitis (CRS), 14 patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRwNP). As a control group were examined 30 healthy people. Patients with ARS and the control group was significantly significant deviations have been identified, however, in patients with CRS was significantly low compared with ARS, and in patients with significantly elevated CRwNP performance as a group ARS, CRS and the control group. The results on serum IL-18 in patients studied groups can be used in the diagnosis and prognosis of the outcome of disease.

Keywords: acute bacterial rhinosinusitis, chronic rhinosinusitis, chronic rhinosinusitis with nasal polyps, interleukin-18.

КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ И КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ У ЖЕНЩИН И МУЖЧИН ИЗ СЕМЕЙНЫХ ПАР ИНФИЦИРОВАННЫХ ВПЧ ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА

Лысенко О. В., Маркеева Д. А.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Челябинск, Россия

Проведен анализ корреляционных связей между вирусной нагрузкой ВПЧ высокого онкогенного риска и показателями местного иммунитета у женщин и мужчин из семейных пар с различной выраженностью клинических проявлений ПВИ. В группе женщин с клинической формой выявлено 5 взаимосвязей. При субклинической форме одна связь регистрировалась у женщин, две – у мужчин. При латентной форме ПВИ корреляционных взаимосвязей ни у мужчин, ни у женщин не выявлено.

Ключевые слова: папилломавирусная инфекция, вирусная нагрузка, семейные пары.

Опубликованные данные относительно корреляционной связи между вирусной нагрузкой и клиническими проявлениями папилломавирусной инфекции (ПВИ) неоднозначны. Некоторые авторы утверждают, что тяжесть поражения прямо пропорциональна величине вирусной нагрузки, в то время как другие полагают, что вирусная нагрузка может оказаться чувствительным, но не специфичным маркером при ПВИ [1-3]. В свою очередь, иммунные реакции организма могут оказать влияние, как на величину вирусной нагрузки, так и на клинические проявления ВПЧ-ассоциированной инфекции [4, 5].

Цель настоящего исследования – изучение корреляционных связей между вирусной нагрузкой онкогенных типов вируса папилломы человека (ВПЧ), клиническими проявлениями и показателями местного иммунитета у женщин и мужчин из семейных пар с различными формами заболевания ПВИ.

Материалы и методы. В результате обследования 190 пар, в которых оба партнера были инфицированы онкогенными типами ВПЧ, мы выбрали 38 супружеских пар, являющихся постоянными половыми партнерами в течение 3х и более лет, у которых были исключены другие, кроме ВПЧ, инфекции мочеполовых органов.

Для обнаружения и количественного определения онкогенных штаммов ДНК ВПЧ в клиническом материале использовался метод ПЦР в режиме реального времени и параллельное включение в реакцию амплификации ДНК-калибраторов для последующего построения калибровочной кривой и подсчета концентрации ДНК ВПЧ. Полученные результаты ДНК ВПЧ выражались в lg (ВПЧ на 100 тыс. клеток человека) и трактовались следующим образом: менее 3 lg – малозначимая, от 3 до 5 lg – значимая и более 5 lg – повышенная вирусная нагрузка. Для оценки иммунологических показателей локального иммунитета исследовались цервикальная слизь у женщин, эякулят у мужчин. Анализ взаимосвязей проводили по методу ранговой корреляции Спирмена.

С целью определения клинической формы ПВИ кроме стандартного клинического осмотра, у женщин осуществлялась простая и расширенная кольпоскопия, у мужчин производилась пенископия кожи головки и венечной борозды.

Статистическую обработку полученных результатов производили на ПК с помощью операционной системы Windows XP пакета статистических программ «Statistica for Windows 8.0».

Результаты и обсуждение. Генотипы ВПЧ высокого онкогенного риска совпали у 100 % партнеров из супружеских пар. В большинстве случаев у мужчин и женщин из семейных пар выявлялись генотипы ВПЧ-16 (28,9 % и 52,6 % соответственно) и ВПЧ-51 (28,9 % инфицированных мужчин и 36,8 % женщин).

Клинически манифестная форма ПВИ при осмотре нами выявлена только у 4 женщин (10,53 %) и не выявлена ни у одного мужчины, но субклиническая форма инфекции у женщин и мужчин обнаруживалась с частотами, достоверно друг от друга не отличающимися. Латентная форма ПВИ встречалась одинаково часто как среди женщин (63,15 % случаев), так и среди мужчин (65,8 % случаев).

В результате анализа концентраций ВПЧ в цервикальных соскобах у женщин из семейных пар установлено, что у пациенток с латентной формой показатель вирусной нагрузки был значимым и составил в среднем 3,67±0,34 lg на 100 тыс. клеток человека. При клинической и субклинической форме вирусная нагрузка чаще была повышенной и составила 5,32±1,14 и 5,65±0,43 lg соответственно. У мужчин при субклинической форме вирусная нагрузка была повышенной (5,71±0,34 lg), при латентной форме – малозначимой (2,99±0,31 lg).

В результате анализа корреляционных связей между концентрацией ВПЧ и иммунологическими показателями цервикальной слизи у женщин с субклинической формой регистрировалась одна положительная связь между вирусной нагрузкой и интенсивностью индуцированного НСТ-теста нейтрофилов. В группе больных с клинической формой определилось 5 обратных взаимосвязей вирусной нагрузки с фагоцитарным числом, лизосомальной активностью и количеством жизнеспособных нейтрофилов, а также с активностью как индуцированного, так и спонтанного НСТ-теста нейтрофилов.

При исследовании корреляционных связей между концентрацией ВПЧ и иммунологическими показателями эякулята у мужчин с субклинической формой определилась корреляция в виде 2 обратных взаимосвязей вирусной нагрузки с активным спонтанным НСТ-тестом нейтрофилов и лизосомальной активностью. При латентной форме ПВИ ни у мужчин, ни у женщин взаимосвязей между концентрацией ВПЧ и показателями местного иммунитета не выявлено.

Таким образом, корреляционные взаимосвязи вирусной нагрузки и показателей местного иммунитета у женщин и мужчин из семейных пар, инфицированных высоко онкогенными типами ВПЧ, определяются при клинической и субклинической формах заболевания, что может свидетельствовать о нарушении функций иммунной системы под влиянием ВПЧ-инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соловьев А. М., Логвинова Д. В. Лечение и профилактика прогрессирования заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека / А. М. Соловьев, Д.В Логвинова // Лечащий врач.– 2013.– № 3.– С. 37.
2. Андосова Л. Д., Конторщикова К. Н., Качалина О. В. Количественный подход в диагностике папилломавирусной инфекции у пациенток с впч-ассоциированной патологией шейки матки / Л. Д. Андосова, К. Н. Конторщикова, О. В. Качалина // Медицинский альманах.– 2013.– № 2 (26).– С. 172-174.
3. Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening / C. J. Meijer, H. Berkhof, D. A. Heideman et al. // J Clin Virol.– 2009.– V. 46(3).– P. 1-4.
4. Ziganshin O. R. Status of local reproductive tract immunity in men with inflammatory diseases of the reproductive system / O. R. Ziganshin // Журнал

микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.– 2001.– № 1.– С. 36-39.
5. Лысенко О. В., Телешева Л. Ф., Троянова А. В. Папилломавирусная инфекция у семейных пар: заметки к теме / О. В. Лысенко, Л. Ф. Телешева, А. В. Троянова // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии.– 2013.– Т. 8. № 3 (26).– С. 49-55.

CORRELATION OF VIRAL LOAD AND CLINICAL MANIFESTATIONS IN WOMEN AND MEN FROM COUPLES WITH HPV OF A HIGH CARCINOGENIC RISK

Lysenko O. V., Markeeva D. A.

South Ural state medical University of Ministry of healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

The analysis of correlation between viral load of HPV high-risk types and indicators of local immunity was conducted in women and men from couples with different severity of clinical manifestations of HPV infection. Five relationships were identified with clinical form in the group of women. One relation was registered in the subclinical form of in women; two relations were registered in men. The correlation relationships are not revealed in men or in women with latent form of HPV infection.

Keywords: HPV infection, the viral load, couples.

НОРМАЛИЗУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА НЕЙТРОФИЛОВ ЭЯКУЛЯТА И КИНЕТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Гизингер О. А., Францева О. В.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Челябинск, Россия

Проведено исследование эффективности НИЛИ в отношении функционально-метаболического статуса нейтрофилов семенной жидкости и кинетических возможностей сперматозоидов у пациентов с хламидийной инфекцией в условиях *in vivo* (средний возраст 31±8,5 лет). Было установлено, что НИЛИ отличается избирательным иммунокорригирующим и выраженным протективным действием в отношении функций нейтрофильных гранулоцитов. Действие НИЛИ способствует статистически значимому изменению функциональной активности сперматозоидов, улучшению физико-химических свойств эякулята у пациентов с хламидийной инфекцией.

Ключевые слова: репродуктивный тракт мужчин, низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ), хламидийная инфекция, эякулят, нейтрофилы эякулята.

Ежегодно около миллиона мужчин заражаются ИППП, в том числе и *Ch.trahomatis*, что в дальнейшем приводит к мужскому бесплодию, вызванному кинетическими дисфункциями сперматозоидов [3]. Отрицательное действие инфекций на мочеполовую систему мужчин определяет не только медицинскую, но и социальную значимость. Течение и исход

заболеваний, вызванных хламидиями, эффективность проводимой терапии во многом определяются состоянием иммунной реактивности организма и, прежде всего, эффективностью локальной антимикробной защиты репродуктивного тракта [1]. Исследование клеточного иммунитета репродуктивного тракта мужчин, инфицированных хламидийной инфекцией, свидетельствует о наличии нарушений в системе инфекционной резистентности репродуктивного тракта. Основными требованиями к лечебным воздействиям в дерматовенерологии, на сегодняшний момент, является комплексный подход, позволяющий эффективно сочетать методы этиотропной и патогенетической терапии, уменьшение количества инвазивных процедур в пользу неинвазивных методов, снижение стоимости лечения, иммуномодулирующая эффективность [4]. К методам патогенетической терапии, отвечающим всем вышеперечисленным условиям относится, лазерное излучение низкой интенсивности [2, 5].

Цель работы – оценить эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в отношении повышения функционально-метаболического статуса нейтрофилов эякулята и кинетических возможностей сперматозоидов у пациентов с хламидийной инфекцией

Материалы и методы. Для решения цели работы была получена семенная жидкость от 40 мужчин с хламидийной инфекцией в возрасте от 24 до 40 лет, собранная с учетом требований преаналитического этапа лабораторной диагностики. Для удаления веществ семенной плазмы, подавляющих активность сперматозоидов, добавлялся физиологический раствор, нагретый до 37 °С после чего проводили двукратное центрифугирование по 10 минут при 1500 оборотах в минуту. При исследовании семенной жидкости были определены следующие лабораторные показатели: подвижность сперматозоидов (кинезиограмма); физико-химические свойства; функциональную активность нейтрофилов. Для оценки подвижности сперматозоидов и подсчета нейтрофилов эякулята нативный эякулят в количестве 20 мкл разводили в 400 мкл подогретого до 37 °С физиологического раствора. Полученной смесью заполняли камеру Горяева и производили подсчёт в 5 больших квадратах, расположенных по диагонали. Цифровой материал обрабатывался методом вариационной статистики с помощью пакета прикладных программ «Statistica for Windows». О достоверности различий средних величин судили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Для оценки влияния лазерного излучения низкой интенсивности в условиях *in vivo* путем чрескожного воздействия на простату в зоне промежности или надлобковой области подействовали лазерным излучением, генерируемым полупроводниковым лазером с длиной волны 632 нм, модулирующий переменную генерацию импульса, длительностью 2 нс, частотой 100 Гц, дозой излучения 0,56 Дж/см^2.

Результаты. При исследовании семенной жидкости у пациентов с хламидийной инфекцией до использования НИЛИ было установлено: физико-химические свойства – pH – 6,3±0,3, вязкость – 3,5±0,3 см, объем – 1,4± 0,5 мл; значительное снижение функционально-метаболического статуса нейтрофилов в семенной жидкости; кинезиограмма – нормокинезис – 13,1±0,4 %, акинезис – 61,5±0,8 %, гипокинезис – 25,4±0,5 %.

При исследовании семенной жидкости у пациентов с хламидийной инфекцией после использования НИЛИ было установлено: физико-химические свойства – pH – 7,1±0,4, вязкость – 2,2±0,2 см, объем – 2,1±0,3 мл; под воздействием НИЛИ значительно усилились функционально-метаболические возможности нейтрофилов в семенной жидкости; кинезиограмма – нормокинезис – 33,6±0,6 %, акинезис – 34,4±0,8 %, гипокинезис – 32,4±0,9 %. Таким образом, данное исследование свидетельствует о стимулирующем влиянии лазера низкой интенсивности, выбранных для исследования характеристик в отношении усиления кинетических возможностей сперматозоидов и функционально-метаболического статуса нейтрофилов эякулята у пациентов с хламидийной инфекцией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бехало В. А., Лосева О.К., Сысолятина Е. В. Репродуктивное здоровье и сексуальное поведение подростков / В. А. Бехало, О. К. Лосева, Е. В. Сысолятина // Репродуктивное здоровье детей и подростков.– 2007.– № 5 (16).– С. 73-79.
2. Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на состояние местного иммунитета репродуктивной системы у женщин с хламидийной инфекцией / О. А. Гизингер // диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Челябинск – 2004.

3. Оценка активности сперматозоидов в эякуляте больных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта / О. А. Гизингер, К. В. Никушкина, И. Л. Батурина и др. // В сборнике: Актуальные вопросы дерматовенерологии и косметологии. Юбилейная научно-практическая конференция дерматовенерологов и косметологов, посвященная 75-летию дерматовенерологической службы Челябинской области: Тезисы научных работ. Координаторы издания: Кубанов А. А., Зиганшин О. Р.– 2012.– С. 98-99.
4. Летяева О. И., Гизингер О. А. Иммуномодулирующая терапия как способ коррекции иммуно-микробиологических нарушений урогенитального тракта при хламидийной инфекции, осложненной бактериальным вагинозом / О. И. Летяева, О. А. Гизингер // Гинекология. 2011.– Т. 13. № 1.– С. 16-21.
5. Влияние ультразвуковых воздействий на факторы антимикробной резистентности при микоплазменной инфекции генитального тракта у женщин репродуктивного возраста /
6. И. В. Семенова, О. А. Гизингер, Т. А. Зиганшина и др. // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2012.– Т. 89. № 2.– С. 23-27.

NORMALIZING THE EFFECTS OF LOW-INTENSITY LASER RADIATION IN RELATION TO THE FUNCTIONAL AND METABOLIC STATUS OF NEUTROPHILS IN SEMEN AND KINETIC FEATURES OF SPERM IN PATIENTS WITH CHLAMYDIAL INFECTION

Gizinger O. A., Frantseva O. V.

South Ural state medical University of Ministry of healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

Investigated the effectiveness of LILR in relation to the functional and metabolic status of neutrophils in semen and kinetic features of sperm in patients with chlamydial infection *in vivo* (mean age 31±8.5 years). It was found that LILR is different electoral and immune correction a pronounced protective action on the functions of neutrophil granulocytes. The effect of LILR promotes a statistically significant change in the functional activity of sperm, improvement of the physico-chemical properties of the ejaculate of patients with chlamydial infection.

Keywords: reproductive tract of men, low-intensity laser radiation, chlamydia infection, ejaculate, ejaculate neutrophils.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОКИНОВОГО СПЕКТРА ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕТАБОЛИТОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Иванова Е. В., Бондаренко Т. А., Перунова Н. Б., Чайникова И. Н., Челпаченко О. Е., Андрющенко С. В., Сидорова О. И., Бухарин О. В.

ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН», Оренбург, Россия

Метаболиты пробиотических культур *L. plantarum* 8P-A3, L. fermentum 90T-C4, *L. acidophilus* $К_3Ш_{24}$, *L. acidophilus* NK_1, *L. acidophilus* 100АШ, *B. bifidum* № 791, *B. adolescentis* МС-42, *E. coli* М-17, М-18 значительно подавляли *in vitro* секрецию мононуклеарами человека провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-6, IL-8 и противовоспалительных- IL-10, в меньшей степени- IL-1Ra. Негативное влияние на продукцию IL-10, IL-1Ra может ограничивать антивоспалительный эффект данных пробиотиков.

Ключевые слова: метаболиты, пробиотики, цитокины.

Одним из факторов, определяющих клиническую эффективность пробиотиков, является их иммуномодулирующая активность [1], связанная, в том числе, со способностью штаммов микроорганизмов, входящих в состав пробиотика, индуцировать/супрессировать продукцию цитокинов.

Цель. Изучить профиль и уровень цитокинов, секретируемых мононуклеарами периферической крови человека под влиянием метаболитов пробиотических культур бифидо-, лактобактерий и кишечной палочки.

Материалы и методы. В работе использовали следующие пробиотические штаммы: *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3 (№ 900811 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), *Lactobacillus fermentum* 90Т-С4 (№ 900812 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), *Lactobacillus acidophilus* $К_3Ш_{24}$ (№ 42 в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора), *Lactobacillus acidophilus* NK_1 (ГНИИ «Генетика»), *Lactobacillus acidophilus* 100АШ (ГНИИ «Генетика»), *Bifidobacterium bifidum* № 791 (№ АС-1247 в коллекции промышленных микроорганизмов ГНЦ РФ ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов), *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, *Escherichia coli* М-17, *Escherichia coli* М-18 (ГИСК им. Л. А. Тарасевича). Микробные метаболиты получали из бульонных культур бактерий двукратным центрифугированием при 3200 об/мин с последующей фильтрацией (мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, «Millipore», USA). Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400g) в градиенте плотности фиколл-верографин («Pharmacia», Швеция) плотностью 1,077г/см^3. Продукция про-(IFN-γ, TNF-α, IL-8, IL-6) и противовоспалительных (IL-10, IL-1Ra) цитокинов исследовалась в культуре мононуклеаров, сокультивируемых с метаболитами бактерий (опыт) и без добавления метаболитов (контроль) после 24-часовой инкубации клеток (2×10^6) при 37°С в атмосфере 5 % CO_2 в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки («Sigma», США) и 80 мкг/мл гентамицина. Исследования проводили в 9 дублях для каждого штамма и каждого вида цитокинов. Уровень спонтанной продукции цитокинов после сокультивирования мононуклеаров с метаболитами бактерий исследовали ИФА (“Цитокин“, СП-6, Россия). Регистрация результатов проводилась на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия), длина волны 492 нм. Уровни статистической значимости различий показателей, выраженных медианой (Me), нижним (Q25) и верхним (Q75) квартилями, определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p<0,05$.

Результаты. Установлено, что все исследуемые штаммы микроорганизмов не влияли на спонтанную продукцию мононуклеарами IFN-γ и, напротив, по сравнению с контролем значительно ингибировали секрецию TNF-α (все исследуемые культуры), IL-10 (исключая *L. acidophilus* 100 АШ, *B. bifidum* № 791), IL-1Ra (исключая *B. bifidum* № 791), IL-8 (кроме *B. bifidum* № 791, *L. acidophilus* 100 АШ и обоих штаммов *E. coli*). Выраженность супрессивного эффекта на секрецию цитокинов для TNF-α составляла у 4 из 9 исследованных штаммов 100 %, у 5 штаммов – в среднем 97,9±15,14 % по отношению к контролю; для IL-1Ra в среднем на 52,98± 9,13 %, для IL-10 от 100 % (у 4 из 6 штаммов, подавляющих продукцию цитокина) до 94,4 %. Три штамма лактобактерий и культура *B. adolescentis* МС-42 ингибировали продукцию IL-6 (в контроле уровень цитокина составлял 184 [179;194] пг/мл, в опытных пробах трех штаммов – 83,3 [62,5;103] пг/мл, $p<0,05$). Напротив, стимулировали секрецию IL-6 штамм *B. bifidum* № 791, штамм *L. acidophilus* 100 АШ и культура *E. coli* М-17. Уровень IL-6 в опытных пробах составил соответственно 251 [245; 286] пг/мл; 208 [201; 226] пг/мл и 237 [211; 246] пг/мл против 184 [179;194] в контроле ($p<0,05$). Не влияли на секрецию IL-6 штамм *E. coli* М-18 и *L. acidophilus* $К_3Ш_{24}$. В отношении IL-8 у штамма *B. adolescentis* МС-42 и 4-х штаммов лактобактерий (кроме *L. acidophilus* 100 АШ) выявлен ингибирующий эффект по сравнению с контролем в диапазоне 97,6-64,0 %.

Обсуждение. Очевидно, что клинический эффект пробиотиков связан со способностью штаммов микроорганизмов к адгезии, колонизации слизистой оболочки, а также обусловлен спектром их антагонистической активности и взаимодействием с Toll-подобными рецепто-

рами (TLR) с последующей активацией врожденного и адаптивного иммунитета через регуляцию продукции цитокинов определенного профиля (Th-1, Th-2 тип, про-, противовоспалительные) [2]. Подобными свойствами обладают не только компоненты микробных клеток штаммов пробиотиков, но и их метаболиты, включающие широкий набор различных биологически активных веществ (экзополисахариды, карбоновые кислоты, лактат, ацетат, секретируемые пептидогликаны, белки, ферменты углеводного, белкового обмена, обеспечивающие окислительно-восстановительные реакции и др.) [3, 4, 5]. В настоящей работе было показано, что метаболиты всех исследуемых 9 штаммов пробиотических бактерий интенсивно подавляли *in vitro* секрецию системного флогогенного цитокина TNF-α, у трех из пяти штаммов лактобактерий антивоспалительный эффект усиливался ингибирующим влиянием на продукцию провоспалительного цитокина IL-6 и хемокина IL-8. Вместе с тем следует отметить обнаружение супрессивного эффекта и в отношении противовоспалительных цитокинов IL-10, IL-1Ra у метаболитов исследуемых пробиотических культур, что может существенно ограничивать антивоспалительные свойства пробиотиков, в которые входят данные штаммы. Полученные результаты обосновывают необходимость дальнейшего поиска производственных культур среди клинических образцов, обладающих выраженным противовоспалительным действием.

Авторы выражают искреннюю благодарность начальнику отделения препаратов бактериотерапии ФГУП «НПО Микроген» (Пермь), д.м.н. Валерию Александровичу Несчисляеву за предоставленные штаммы микроорганизмов.

«Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Оренбургской области в рамках научного проекта № 16-44-560553 «р_а» и фонда РГНФ – проект № 16-16-56004.»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kang H. J., Im S. H. Probiotics as an Immune Modulator/ H. J. Kang, S. H. Im // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).– 2015.– V.61 (Suppl.).– P. 103-105.
2. Differential Toll-like receptor recognition and induction of cytokine profile by Bifidobacterium breve and Lactobacillus strains of probiotics / T. S. Plantinga, W.W.C.van Maren, J.van Bergenhenegouwen et al. // Clin. Vaccine Immunol.– 2011.– V.18.– № 4.– P. 621-628.
3. Geng Q., Zhao H. Influences of exogenous probiotics and tea polyphenols on the production of three acids during the simulated colonic fermentation of maize resistant starch / Q. Geng, H. Zhao // J. Food Sci. Technol.– 2015.– V. 52.– № 9.– P. 5874-5881.
4. Bifidobacteria exhibit social behavior through carbohydrate resource sharing in the gut/ C. Milani, G. A. Lugli, S. Duranti et al. // Sci. Rep. 2015.– V. 28.– № 5. doi: 10.1038/srep15782.
5. Glycan cross-feeding activities between bifidobacteria under in vitro conditions/ F. Turroni, E. Özcan, C. Milani et al. // Front Microbiol.– 2015.– V. 24.– № 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01030.

CYTOKINE SPECTRUM CHARACTERISTICS UNDER THE INFLUENCE OF PROBIOTIC STRAIN METABOLITES OF MICROORGANISMS

Ivanova E. V., Bondarenko T. A., Perunova N. B., Chainikova I. N., Chelpachenko O. E., Andryuschenko S. V., Sidorova O. I., Bukharin O. V.

«Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis», Orenburg, Russia

Metabolites of *L. plantarum* 8P-A3, *L.fermentum* 90T-C4, *L. acidophilus* K_3Sh_{24}, *L. acidophilus* NK_1, *L. acidophilus* 100ASh, *B.bifidum* № 791, *B. adolescentis* MC-42, *E. coli* M-17, M-18 cultures, used as probiotics, significantly inhibited in vitro the secretion of pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-6, IL-8 and anti-inflammatory cytokines IL-10, IL-1Ra (last – in lesser degree) by human mononuclear cells and to a lesser degree IL-1Ra. Negative influence on IL-10 production and IL-1Ra can limit the antiinflammatory activity of these probiotics.

Keywords: metabolites, probiotics, cytokines.

ВЛИЯНИЕ МИЛИАЦИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ

Смолягин А. И.[1], Фролов Б. А.[1], Филиппова Ю. В.[1], Чайникова И. Н.[1,2], Панфилова Т. В.[1], Железнова А. Д.[1], Сарычева Ю. А.[1]

[1]Оренбургский государственный медицинский университет; [2]Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Тритерпеноид милиацин, вводимый трехкратно внутрибрюшинно мышам $(CBAxC_{57}Bl_6)F_1$ за 9, 5 и 1 сутки до забора перитонеальных макрофагов (МФ) усиливал у них спонтанную генерацию активных форм кислорода (НСТ-тест), а также повышал спонтанную и ЛПС-индуцированную продукцию ИЛ-12. Вместе с тем милиацин значимо уменьшал продукцию NO, индуцируемую ЛПС у МФ контрольной группы мышей и не влиял на показатели фагоцитарной активности (ФО и ФИ). Сделано заключение, что тритерпеноид способствует формированию смешанного M1/M2 функционального фенотипа МФ, сочетающего признаки как классической, так и альтернативной активации.

Ключевые слова: перитонеальные макрофаги, тритерпеноид милиацин.

Установленный ранее мембранотропный эффект милиацина [1] может составлять существенный механизм его влияния на функциональную активность клеток. Среди последних особый интерес представляют макрофаги как в силу своей высокой пластичности, так и биологической значимости как центральные участники воспаления и иммуногенеза. Вместе с тем влияние милиацина на особенности функциональной активности макрофагов не исследовалось.

Цель. Изучение данного вопроса составило цель настоящей работы.

Материалы и методы. Донорами перитонеальных макрофагов (МФ) служили 30 мышей $(CBAxC_{57}Bl_6)F_1$, разделенных на 3 группы: 1) интактные – группа сравнения; 2) получавшие внутрибрюшинно за 9, 5 и 1 сутки до забора МФ растворитель для милиацина: твин 21 ($1{,}6\times10^{-7}$ моль/кг) – контроль или 3) милиации (2 мг/кг) – опыт. Клетки перитонеального экссудата, извлеченные в холодной среде 199 с гепарином (10 ед/мл) через разрез в паховой области после эвтаназии, переносили в силиконированные пробирки и после отмывки (1000 об/мин; 5 мин) взвешивали в теплой полной культуральной среде 199 с 10 % фетальной сывороткой. Концентрацию клеток доводили до 2×10^6/мл и стандартизированную суспензию инкубировали 1 час при 37 °С в пластиковых чашках Петри (Д=350мм; 2,0 мл). Неприлипающую фракцию удаляли двукратной отмывкой теплой полной культуральной средой. Интенсивность фагоцитоза оценивали по фагоцитарному показателю (ФП) и фагоцитарному индексу (ФИ) в отношении живой тест культуры ($2{,}2\times10^8$ КОЕ/мл) стафилококка (штамм 209-П) через 30 минут инкубации при 37 °С. Метаболическую активность МФ определяли в НСТ-тесте в спонтанном и стимулированном (зимозан) вариантах. Продукцию NO исследовали после 48-часовой инкубации МФ в присутствии ЛПС (10 мкг/мл) с использованием тест-системы Total NO/Nitrite/Nitrate Assay по уровню его стабильного метаболита – нитрита. Спонтанную и стимулированную (в присутствии ЛПС) продукцию ИЛ-12 регистрировали в супернатантах двухсуточных культур МФ методом ИФА (тест-система Bender MedSystems, Австрия). Статистическую обработку данных проводили методами вариационной статистики с оценкой различий между средними величинами по t-критерию Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при $p<0{,}05$.

Результаты. Исследование влияния милиацина на фагоцитарную активность МФ не выявило достоверных различий ФП и ФИ у мышей опытной группы (соответственно

59,9±2,0 % и 2,7±0,1), животных группы сравнения (54,9±4,2 % и 3,16±0,3) и контрольной группы (44,5±2,8 % и 2,5±0,3). Значения спонтанного НСТ-теста были наиболее высокими (5,83±0,7 %) у мышей опытной группы, достоверно превышая аналогичный параметр в группах сравнения (3,31±0,5 %) и контроля (3,63±0,6 %). Стимулированная активность значимо не изменялась: опыт (9,18±0,6 %), группа сравнения (8,58±0,7 %) и контроля (8,13±0,8 %). Продукция оксида азота (мкмоль/л) в опытной группе (507,9±26,0) хотя и превышала показатель в группе сравнения (283,2±29,8) была достоверно ниже, чем в группе контроля (1223,2±59,9). Установлено стимулирующее влияние милиацина на спонтанную и ЛПС-индуцированную продукцию ИЛ-12: соответственно 858,2±137,0 и 7476,4±1581,6 пг/мл, что достоверно выше значений в контрольной группе (441,7±54,1 и 1255,4±114,4 пг/мл) и в группе сравнения (48,8±4,5 и 78,1±3,5 пг/мл).

Обсуждение. Активация МФ проявляется формированием различных функциональных групп этих клеток, крайние варианты которых охарактеризованы как М1 (классический) и М2 (альтернативный) фенотипы. Указанные варианты различаются продукцией цитокинов и других активных веществ, и, соответственно, направленностью биологических эффектов. В частности, если М1 МФ характеризуются выработкой провоспалительных цитокинов и участием в формировании Th1-зависимого иммунного ответа, то М2-клетки связаны с развитием Th2-опосредованных иммунных реакций, а также с регуляцией процессов репарации [2]. Результаты работы не позволяют придти к однозначному выводу о репрограммирующем влиянии милиацина на перитонеальные МФ в пользу одного из этих фенотипов. С одной стороны, стимуляция фитостеролом генерации АФК (НСТ-тест), а также его активирующий эффект в отношении продукции ИЛ-12 свидетельствует о направленности дифференцировки МФ в сторону М1-фенотипа. Вместе с тем подобная трактовка не согласуется с ингибирующим (по отношению к контролю) воздействием милиацина на продукцию NO – другого референтного фактора такой дифференцировки. Отсутствие влияния милиацина на ФИ и ФЧ не позволило использовать эти показатели активности МФ в качестве критериев их поляризации. Неоднозначный характер влияния милиацина мог быть обусловлен особенностями функционирования сигнальных путей, включающих разнообразные варианты ответа МФ. Так, стабилизация мембран под действием тритерпеноида способна повысить устойчивость мембраносвязанного фосфатидилинозитол-3, 4,5-трифосфата (PIP3) к гидролизующему действию SH2 (Src homology)-содержащей инозитол-5-фосфатазы (SHIP) – одному из ключевых факторов созревания и поляризации МФ. В свою очередь, снижение расщепления PIP3 способствует возрастанию рекрутирования и активации Akt/PKB-киназ (kinase autologous tumor killing/protein kinase B) путем их высокоаффинного связывания. С учетом данных об ингибирующем влиянии тритерпеноидов на активность PKA (цАМФ-зависимой протеинкиназы), такой путь активации Akt/PKB приобретает доминирующее значение, а ее результатом служит мобилизация процессов, направленных на выживание клеток, в том числе путем ограничения продукции ими провоспалительных цитокинов. Таким образом, функциональная несостоятельность SHIP способна оказывать поляризующий эффект (М2) тождественный тому, который наблюдается при отсутствии самого фермента [3]. Эти регуляторные пути однако не исключают и другие варианты трансдукции сигналов, связанные, например, со стабилизацией милиацином G-белков и поддержанием опосредованных ими сигнальных путей (γИНФ; CD40), запускающих механизмы М1 поляризации.

Полученные результаты не противоречат современным представлениям о дифференцировке и активации МФ как о динамическом континууме переходных функциональных состояний этих клеток [4], в рамках которого признается существование промежуточных и смешанных функциональных фенотипов, сочетающих в себе признаки как классической, так и альтернативной активации МФ [5]. Эти результаты позволяют предполагать, что милиацин способствует формированию одного из таких М1/М2 фенотипов с возможностью перепрограммирования в необходимом направлении при реализации защитных и регуляторных механизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панфилова Т. В. Тритерпеноид милиацин снижает индуцируемое стрессом ПОЛ / Т. В. Панфилова, А. А. Штиль, Б. А. Фролов // Бюллетень

экспериментальной биологии и медицины – 2006.– Т. 141.– № 6.– С. 633-635.
2. Шварц Я. Ш., Свистельник А. В. Функциональные фенотипы макрофагов и концепция М1-М2-поляризации. Ч. 1. Провоспалительный фенотип. Обзор / Я. Ш. Шварц, А. В. Свистельник // Биохимия.– 2012.– Том 77.– Вып. 3.– С. 312-329.
3. Role of Src homology 2-confaining-inositol-5`-phosphatase (SHIP) in mast cells and macrophages / M. Rauh, J. Kalesnikoff, M. Hughes et al. // Biochem.Soc.Trans.– 2003.– V.31 (Pt1).– P. 286-291.
4. The mononuclear phagocyte system – revisited / D. A. Hume, I. L. Ross, S. R. Himes et al. // J. Leukoc. Biol.– 2002.– V. 72.– P. 621-627.
5. Лямина С. В.,Малышев И. Ю.Поляризациямакрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа / С. В. Лямина, И. Ю. Малышев // Фунд. исследования.– 2014.– № 10.– С. 930-935.

MILIACIN INFLUENCE ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES

Smolyagin A. I.[1], Frolov B. A.[1], Filippova Y. V.[1], Chainikova I. N.[1,2], Panfilova T. V.[1], Zheleznova A. D.[1], Sarycheva Y. A.[1]

[1]Orenburg State Medical University; [2]Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Triterpenoid miliacin triple injected intraperitoneally into mice $(CBAxC_{57}BL_6)F_1$ 9, 5 and 1 days before collection of peritoneal macrophages (MP) enhanced it¢s spontaneous generation of active oxygen forms (HCT-test), also increased then spontaneous and LPS-induced production of IL-12. Along with that miliacin significantly decreased NO production induced by LPS in MP of mice controls and hadn¢t influence the indexes of phagocytic activity (PO and PI). It was made the conclusion, that triterpenoid promotes the formation of mixed M1/M2 functional phenotype of MP which combines signs of both classical and alternative activation.

Keywords: peritoneal macrophages, triterpenoid miliacin.

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В ЦЕРВИКАЛЬНОМ ОТДЕЛЯЕМОМ ЖЕНЩИН ПОСЛЕ КУРСА ГИПОБАРОТЕРАПИИ

Михайлова Е. А.[1], Махалова Г. О.[1], Жеребятьева О. О.[1], Миронов А. Ю.[2], Кшнясева С. К.[1], Константинова О. Д.[1], Киргизова С. Б.[1], Фомина М. В.[1]

[1]ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Оренбург, Россия; [2]ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

В клинической медицине широко применяются различные методы гипоксической адаптации в качестве немедикаментозного средства коррекции функционального состояния. Авторами было оценено влияние гипобарической гипокситерапии в комплексной прегравидарной подготовке на нормализацию уровней цитокинов в цервикальном отделяемом у женщин с привычным невынашиванием плода и была отработана методика гипобарической гипокситерапии, подходящая для лечения этой группы пациенток.

Ключевые слова: цитокины, гипобаротерапия, невынашивание плода.

Актуальность. Несмотря на успехи, достигнутые в области профилактики и лечения, привычная потеря беременности остается одной из приоритетных проблем акушерства и гинекологии [1]. В России на долю привычного невынашивания беременности (ПНБ) приходит-

ся 10-25 % от всех желанных беременностей. В настоящее время широко изучаются генетические, эндокринные нарушения при ПНБ, которые составляют в среднем 17 %. Не вызывает сомнения важная роль персистирующих урогенитальных микробных агентов в генезе невынашивания беременности, способных вызывать вторичное иммунодефицитное состояние [2]. Длительный инфекционный процесс, имевший место до наступления беременности дисбиоз, способствуют нарушению местного иммунитета и облегчают проникновение микроорганизмов в амниотическую жидкость. Хронические процессы сопровождаются дисбалансом в функционировании цитокиновой системы, формирующей и регулирующей весь комплекс защитных реакций как на системном, так и на местном уровнях. В связи с этим, особый интерес представляет изучение спектра цитокинов в слизистом секрете цервикального канала. Известно, что высокие уровни провоспалительных цитокинов в слизи цервикального канала у беременных коррелируют с преждевременными родами, внутриутробной инфекцией [2]. Нами ранее было показано, что у пациенток перенесших урогенитальную инфекцию или имеющих таковую при формирующемся вторичном микробно обусловленным бесплодии, но не имеющих первичного, эндокринного, аутоиммунного или травматического бесплодия, изменяется уровень провоспалительных интерлейкинов в секретах урогенитального тракта по сравнению со здоровыми фертильными обследуемыми [3].

Предположено, что у беременных с синдромом привычной потери плода инфекционного генеза имеет место снижение уровня компенсаторных реакций иммунитета слизистой цервикального канала. В клинической медицине, в том числе в гинекологии, в качестве немедикаментозного средства коррекции функционального состояния, повышения физиологических резервов, реабилитации и лечения широко применяются различные методы гипоксической адаптации.

Цель работы: оценить влияние гипобарогипокситерапии в комплексной прегравидарной подготовке на уровни цитокинов в цервикальном отделяемом женщин с привычным невынашиванием плода.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе ГАУЗ ООКБ № 2 в женской консультации областного перинатального центра. В исследование вошло 87 женщин: 35 пациенток получали стандартную прегравидарную подготовку согласно приказа № 572 от 2012 года и 42 женщины, у которых стандартная подготовка была дополнена курсом гипобарической гипокситерапии.

Отбор пациенток для проведения курса гипобарической гипокситерапии осуществляли согласно методическим рекомендациям МЗ РСФСР (1989). Гипобарическая гипокситерапия (ГПГ) проводилась с помощью отечественной медицинской вакуумной установки – барокамеры «Урал-1». Критериями включения были: репродуктивная потеря в анамнезе, возраст от 18 до 45 лет, наличие в анамнезе вылеченных урогенитальных инфекций, отсутствие тяжелой экстрагенитальной и генитальной патологии, являющейся противопоказанием к вынашиванию беременности, отсутствие противопоказаний к ГПГ, согласие пациентов на участие в исследовании. Критерии исключения: тяжелые соматические, психические и инфекционные заболевания.

Исследование уровней ИЛ-1β и γ-IFN проводилось методом твердофазного ИФА, с использованием наборов реагентов фирмы «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия) в соответствии с инструкцией по применению реактивов. Все образцы исследовались в дубликатах. Учет результатов проводили измерением оптической плотности проб на планшетном вертикальном фотометре Multiskan Labsystems (Финляндия) при длине волны 450 нм. Тестируемым материалом являлось отделяемое шейки матки, взятое на 10 день цикла ложкой Фолькмана вместимостью 0,025 мл и разведенное 1:200 в 0,9 % растворе хлорида натрия. Статистическая обработка данных выполнена с использованием методов вариационной статистики в программе Statistica 10.0 Statsoft incorp.

Результаты и их обсуждение. Учитывая, что до настоящего времени не изучено влияние ГПГ на состояние врожденного иммунитета при прегравидарной подготовке нами было решено провести подбор оптимальной методики с оценкой динамики уровней провоспалительного ИЛ-1β и γ-IFN. Пациентки, получавшие ГПГ воздействие были поделены на три подгруппы. Первая подгруппа (14 женщин) получили 22 ежедневных 2-х часовых сеанса гипобаротерапии на высоте 3,5 тыс. метров; вторая подгруппа (16 женщин) – 22 еже-

дневных 3-х часовых сеанса на высоте 3,5 тыс. метров; и третья 3 подгруппа (12 женщин) получили 22 ежедневных 1 часовых сеанса на высоте 3,5 тыс. метров.

У пациенток, получавших стандартную подготовку перед планируемой беременностью уровень ИЛ-1β составил в среднем 41,1±3,0 пг/мл, а концентрация INF-γ – 46,3±2,4 пг/мл, что превышает аналогичные показатели у здоровых женщин. При оценке этих показателей в группе больных, которые получали ГПГ в течение часа на протяжении 22 дней было установлено сохранение сравнительно высокого содержания ИЛ-1β и INF-γ в шеечном секрете. У пациенток двух других подгрупп, лечившихся в условиях барокамеры, отмечено снижение уровня провоспалительных цитокинов. Во второй группе ИЛ-1β определялся в среднем в концентрации 18,4±3,4 пг/мл, а в третьей группе – 16,8± 3,1 пг/мл. Сходные изменения были выявлены в отношении динамики концентрации INF-γ, уровень которого достоверно снижался после гипобаротерапии и составил во второй группе 6,2±1,4 пг/мл, а в третьей – 7,1±1,1 пг/мл.

Заключение. Таким образом, применение 22-х сеансов ГПГ в течение 2-х или 3-х часов ежедневно в комплексной прегравидарной подготовке приводит к снижению уровней провоспалительных цитокинов, приближая их к уровню здоровых женщин. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования гипобаротерапии для нормализации местного цитокинового статуса и перспективах данного метода немедикаментозной терапии в комплексной подготовке женщин к планируемой беременности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Подготовка женщин с сахарным диабетом к беременности / Э.К. Айламазян, Н.В. Боровик, В.В. Потин и др. // Доктор. Ру. 2014.– № 12 (100).– С. 34-38.
2. Иммунные маркеры внутриматочной инфекции у беременных с хроническим эндометритом в анамнезе / И.В. Курносенко, К.С. Спиридонова, В.Ф. Долгушина и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9.– № 1(1) (18).– С. 121-123.
3. Способ прогнозирования развития репродуктивных нарушений // Е.А. Михайлова, Н.П. Сетко, О.О. Жеребятьева и др. / Патент РФ на изобретение № 2 495 431 от 05.07.2012 г.

CYTOKINE LEVELS IN CERVICAL SECRETION IN WOMEN AFTER A COURSE OF HYPOBAROTHERAPY

Mikhailova E.A.[1], Makhalova G.O.[1], Zherebyateva O.O.[1], Mironov A. Yu.[2], Kshnyaseva S.K.[1], Konstantinova O.D.[1], Kirgizova S.B.[1], Fomina M.V.[1]

[1]SEI HPE «Orenburg State Medical University» Ministry of Health RF, Orenburg, Russia;
[2]FBIS MSRIEM G.N. Gabrichevsky of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

The various methods of hypoxic adaptation is widely used in clinical medicine as a non-drug means the correction of functional state. The authors evaluated the effect of hypobaric hypoxia in the complex pregravid preparation for normalization of the levels of cytokines in cervical discharge of women with recurrent miscarriage and the fetus was tested method of hypobaric hypoxic suitable for treating this group of patients.

Keywords: cytokines, hypobarotherapy, the miscarriage of the fetus.

ПАРАМЕТРЫ МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПОЛОВЫХ ПУТЕЙ ПРИ УРОГЕНИТАЛЬНОМ МИКРОБНОМ ВОСПАЛЕНИИ У МУЖЧИН РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Жеребятьева О. О.[1], Михайлова Е. А.[1], Миронов А. Ю.[2], Сетко Н. П.[1], Ляшенко И. Э.[1], Азнабаева Л. М.[1], Желтова В. И.[1], Махалов В. Ю.[1], Паньков А. С.[1]

[1]ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Оренбург; [2]ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Оценен иммуноцитокиновый статус репродуктивного тракта мужчин разных возрастных групп с гонококковым и неспецифическим урогенитальным воспалением. Показано, что гонококковая инфекция и неспецифическое воспаление, сопровождаются снижением в эякуляте уровня лизоцима, ИЛ-10 и повышением уровня провоспалительного цитокина ИЛ-1β. Выявлены разнонаправленные изменения IFNγ у пациентов разного возраста. Отмечено, что у мужчин в возрасте 41-60 лет уровень провоспалительного цитокина был ниже, чем в младших возрастных группах.

Ключевые слова: инфекция, мужчины, местный иммунитет.

Актуальность. Микробное воспаление урогенитального тракта является одной из основных причин негативных симптомов в интимной сфере мужчин. Учащенное мочеиспускание, боли в промежности, трудности в половой жизни – все это приводит к снижению сексуального и репродуктивного здоровья [1, 2]. Даже после проведенного антимикробного лечения сформировавшийся дисбактериоз и вторичный местный иммунодефицит не приводят к полному восстановлению функций половых органов [3, 4]. Применение медикаментозных и немедикаментозных средств реабилитации должно базироваться на знании иммунологических сдвигов в мукозальном звене защиты. Учитывая, что репаративные особенности организма в значительной степени зависят от возраста, параметры факторов антиинфекционной защиты могут служить индикаторами восстановительных способностей тканей.

Цель – оценить уровень факторов местного иммунитета мочеполовых путей мужчин разного возраста с неспецифическим и гонококковым уретритом.

Материалы и методы. Местный иммунитет, включая цитокиновый профиль, был изучен у 98 мужчин, в частности у 30 мужчин с гонококковой инфекцией (ГИ), из которых 15 в возрасте от 18 до 40 лет (1 группа) и 15 в возрасте от 41-60 лет (2 группа). Также в исследование вошли 40 пациентов с неспецифическим уретритом (НУ): 22 в возрасте от 18 до 40 лет (3 группа) и 18 в возрасте от 41-60 лет (4 группа). Группы сравнения по 14 здоровых мужчин соответствующих возрастов (5 и 6 группы). Клинический диагноз, был установлен в соответствии с приказом МЗ РФ № 415 от 2003 г. В исследование не включались пациенты с тяжелыми соматическими патологиями и другими инфекциями, передаваемыми половым путем.

Для лабораторного исследования использовался эякулят мужчин, который был получен после воздержания пациентами от половой жизни не менее трех дней. Эякулят центрифугировали (6000 об/мин, 4 °С), делили на аликвоты, замораживали и хранили при минус 20 °С. Перед определением показателей местного иммунитета пробы эякулята размо-

раживали при комнатной температуре. Исследовали уровень лизоцима (ЛЦ), ИЛ-1β, ИЛ-10 и IFN-γ в эякуляте методом иммуноферментного анализа с использованием ИФА-наборов («ВЕКТОР-БЕСТ», Новосибирск). Регистрация результатов осуществлялась на фотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия). Статистическая обработка данных выполнена с использованием методов вариационной статистики в программе Statistica 10.0 Statsoft incorp.

Результаты. Результаты показали, что у здоровых мужчин уровень ЛЦ был одинаковым в обеих возрастных группах, а именно в 5 группе составлял 5,80 ± 0,20 мкг/мл, а в 6 группе – 6,04 ± 0,23 мкг/мл. При ГИ в обеих возрастных группах отмечался значительно повышенный уровень ЛЦ, причем в старшей возрастной группе отмечалось повышение уровня почти в два раза (11,10 ± 2,50 мкг/мл). У мужчин с НУ, напротив, мурамидаза истощалась и в 3 группе определялась в концентрации 3,72 ± 0,04 мкг/мл, а в 4 группе дефицит ЛЦ был еще больше – 2,68 ± 0,13 мкг/мл. В отношении IFN-γ было выявлено следующее. Здоровые мужчины имели содержание этого фактора врожденного иммунитета в среднем на уровне 7,2 ± 0,4 пг/мл в 5-й группе и 7,9 ± 0,7 пг/мл – в 6-й группе. При гонорее происходило резкое снижение данного показателя, причем пациенты старшей возрастной категории обладали более низкими уровнями, колебавшимися в диапазоне 2,4 ± 0,3 пг/мл. При неспецифическом воспалении в 4-й группе также отмечалось снижение IFN-γ до уровня 5,9 ± 0,7 пг/мл, но в 3-й группе наблюдалось повышение этого параметра по сравнению со здоровыми, которое было достоверным (10,4 ± 0,4 пг/мл). Провоспалительный ИЛ-1β в группе здоровых у лиц младшего возраста составлял 20,1 ± 2,8 пг/мл, а в старшей возрастной группе был ниже – 11,8 ± 2,1 пг/л. При воспалении он был повышенным и при гонококковом, и при неспецифическом этиологическом агенте. Однако повышение концентрации ИЛ-1β у пациентов 18-40 лет было выражено намного сильнее, чем у мужчин старшего возраста. Наибольшие показатели выявлены у мужчин 1-й группы (ГИ) – 57,9 ± 7,0 пг/мл, в 3-й группе также отмечен высокий уровень ИЛ-1β, который был равен 28,3 ± 9,0 пг/мл. Более возрастные обследованные имели хотя и высокие показатели ИЛ-1β, но они были достоверно ниже, чем у лиц молодого возраста. Так, материал пациентов 2-й группы содержал этот цитокин в средней концентрации 36,8 ± 7,0 пг/мл, а 4-й всего лишь – 18,4 ± 5,0 пг/мл. Противовоспалительный ИЛ-10, напротив, испытывал депрессорное воздействие при гонококковом уретрите и его содержание у молодых мужчин было в два раза ниже, чем у здоровых (51,7 ± 9,9 пг/мл и 102 ± 27,9 пг/мл соответственно). Пациенты старшего возраста имели сходные показатели.

Заключение. Выявленные отличия иммуноцитокинового профиля могут способствовать раскрытию механизмов формирования различных форм инфекции, а также определять методологические и тактические подходы к терапии и реабилитации пациентов с нарушением сексуального и репродуктивного здоровья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белькова Ю. А. Реальная практика терапии бактериальных инфекций, передаваемых половым путем, в России: результаты многоцентрового фармакоэпидемиологического исследования / Ю. А. Белькова, А. В. Дехнич, Р. С. Козлов // Вестн. дерматол. и венерол.– 2011.– № 1.– С. 41-53.
2. Указ Президента РФ № 1351 от 9 октября 2007 г «Об утверждении Концепции демографической политики Российской Федерации на период до 2025 года»
3. Иммунологические критерии прогнозирования вторичного бесплодия / О. О. Жеребятьева, Н. П. Сетко, Е. А. Михайлова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9.– № 2(1) (18).– С. 378-379.
4. Плахова К. И. Иммунные и генетические факторы нарушения репродуктивной функции, ассоциированные с урогенитальной хламидийной инфекцией у человека / К. И. Плахова и др. // Вестн. дерматол. и венерол. 2010.– № 6.– С. 39-45.

THE PARAMETERS OF MUCOSAL IMMUNITY IN THE GENITAL TRACT UROGENITAL MICROBIAL INFLAMMATION IN MEN OF DIFFERENT AGE GROUPS

Zherebyateva O. O.[1], Mihaylova E. A.[1], Mironov A. Yu.[2], Setko N. P.[1], Lyashenko I. E.[1], Aznabaeva L. M.[1], Zheltova V. I.[1], Makhalov V. Yu.[1], Pankov A. S.[1]

[1]SEI HPE «Orenburg State Medical University» Ministry of Health RF, Orenburg, Russia;
[2]FBIS MSRIEM G. N. Gabrichevsky of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

Immunocytokines the status of the reproductive tract of males of different age groups with urogenital gonococcal and nonspecific inflammation was evaluated. It is shown that gonococcal infection and nonspecific inflammation, accompanied by a decrease in ejaculate levels of lysozyme, IL-10 and increased levels of pro-inflammatory cytokine IL-1β. Revealed opposite changes IFNγ patients of different age. It is noted that in men aged 41-60 years, the level of proinflammatory cytokines was lower than in the younger age groups.

Keywords: infection, men, local immunity.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСНОВЫ ЗАРАЗНОСТИ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Малышкин А. П., Лившиц Н. М.

Оренбургский Государственный Медицинский Университет, Оренбург, Россия

Причины заразности микробов продолжают оставаться непонятыми. В связи с этим предпринята попытка анализа имеющихся данных на основе аналогии с заразностью нормальной флоры, которая в силу пользы необходима хозяину. Поскольку между нормальной флорой и патогенной заразной флорой по принципиальным позициям (заразность, патогенность, здоровое носительство, выполнение полезных функций, хронические формы) обнаруживается принципиальное сходство, делается вывод, что причиной заразности любой заразной флоры является её необходимость для хозяина.

Ключевые слова: зараженность, патогенности, здоровое носительство, инфекционные заболевания, профилактика, лечение

Факторы патогенности микробов широко обсуждаются, но причины заразности микробов не совсем понятны. Однако уже понятно, что заразность определяется не ассортиментом питательных веществ организма хозяина, а чем-то другим. Например, в организме коров, из мяса которых готовятся питательные среды для холеры, есть все необходимые вещества для жизни холерных вибрионов, но для крупного рогатого скота холера не заразна. Для попытки понимания сути заразности необходимо обратить внимание на самую заразную нормальную флору. Заразность нормальной флоры определяется не патогенностью, а ее необходимостью для организма хозяина. Другими словами, мы заражаемся нормальной флорой, а не микробы заражают нас. При этом между заразной «нормальной» флорой и «патогенной» заразной флорой обнаруживается принципиальное сходство: и те и другие заразны, как и те и другие могут вызывать болезни или быть участниками здорового носительства. В связи с этим следует предположить, что заразность любой флоры определяется активностью хозяина, а не микроба в связи с необходимостью заразной флоры для

организма хозяина. В исследованиях, проведенных на линейных мышах, было показано, что микобактерии, вирус лимфоцитарного хориоменингита, филярии и шистосомы могут предотвращать развитие у животных сахарного диабета. Аналогичный защитный эффект достигался и при введении животным экстрактов из стрептококков, клебсиелл и полного адьюванта Фрейнда. Кроме этого, микобактерии могут защищать экспериментальных животных от развития у них аллергического энцефаломиелита [1, 2, 3]. Блокада генов эндогенных ретровирусов в плаценте овец приводит к нарушению репродуктивной функции. То есть, если по примеру природы, нам удастся трансплантировать определённые гены микробов в геном растения или животного, то это должно привести к исчезновению активной восприимчивости к данной инфекции [4, 5]. Этот же принцип можно использовать и для лечения острых и хронических инфекций. Формирование очагов хронической инфекции и сложность их лечения обычно связывают с антибиотикорезистентностью флоры и несостоятельностью иммунной системы. При этом известно, что даже при чувствительности флоры к антибиотикам и компетентности иммунной системы часто формируются хронические инфекции. Поскольку самый распространенный в мире очаг хронической инфекции сформирован «нормальной» флорой по причине его необходимости для хозяина и поскольку «патогенная» заразная флора тоже может выполнять для хозяина полезные функции, следует предположить, что сложности лечения хронических инфекций тоже определяются их необходимостью. Поэтому, если мы обеспечим хозяина тем, что ему дает очаг хронической инфекции в норме, то необходимость в нем исчезнет, что будет способствовать его ликвидации антимикробной терапией.

Принцип внедрения микробных генов в геном восприимчивых видов или использования их продуктов может быть полезным для снижения восприимчивости к заразным инфекциям в популяции, предупреждению эпидемий и для прекращения массовых вспышек заразных инфекций. Не меньший практический интерес представляет выведение устойчивых к инфекциям сортов растений. От различных болезней растений мировое сельское хозяйство ежегодно теряет от 1/4 до 1/3 мирового урожая сельскохозяйственных растений. Выведение устойчивых сортов традиционными методами, то есть скрещиванием неустойчивых сортов растений с устойчивыми, даёт кратковременный эффект. Устойчивые гибриды очень быстро приобретают восприимчивость к новым штаммам возбудителей, и, значит, к новым инфекционным болезням. Надо думать, что причины появления новых инфекционных болезней и человека связаны не с появлением в природе новых микробов, а с появлением восприимчивости к неизвестным для нас микробам, которые, возможно, существовали параллельно с человеком многие тысячи лет, но стали известны нам по причине появления восприимчивости к ним нашего организма. Поэтому появление новых инфекционных болезней человека (СПИД, легионеллёзы, нанобактериозы, птичьи, свиные и прочие гриппы) может являться следствием непродуманного широкомасштабного применения вакцинаций, то есть искусственного прерывания отношений восприимчивых видов, и в частности человека, с необходимыми заразными микробами.

Таким образом, сделав ставку на вакцинации, мы подвергаем и себя и наших ещё не родившихся потомков большой опасности – встрече с новыми инфекциями. Разработка предлагаемых альтернативных способов профилактики инфекционных болезней позволит избежать такой опасности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Infection with Schistosoma mansoni prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice / A. Cooke, P. Tonks, F. M. Jones et al. // Parasite Immunol.– 1999.– V. 21.– P. 169-176.
2. Lehmann D., Ben-Nun A. Bacterial agents protect against autoimmune disease. I. Mice pre-exposed to Bordetella pertussis or Mycobacterium tuberculosis are highly refractory to induction of experimental autoimmune encephalomyelitis / D. Lehmann, A. Ben-Nun // J. Autoimmun.– 1992.– V. 5.– P. 675-690.
3. Weinstock J. V. Helminths and mucosal immune modulation / J. V. Weinstock // Ann N Y Acad Sci.– 2006.– V. 1072.– P. 356-364.
4. Malyshkin A. P. Method for prevention of infection diseases in plants, animals, and humans. WO2011/084090.
5. Malyshkin A. P. Prospects of prevention of infectious diseases in plants, animals, and humans / A. P. Malyshkin // In: Sridhar KR (Ed.). Aquatic Plants and Plant Diseases. New York: Nova Science Publishers.– 2012.– P. 173-192.

THE POSSIBLE CAUSES OF INFECTIVITY AND UNCONVENTIONAL APPROACHES TO TREATMENT AND PREVENTION OF INFECTIOUS DISEASES

Malyshkin A. P., Livshits N. M.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

The underlying cause of infectivity of microorganisms still remains unclear. Here, an attempt is made at analyzing available data in terms of analogy between pathogenic microorganisms and the normal microflora, which is necessary for the host due to its useful functions in the host body.It is demonstrated that the normal microflora and pathogenic microorganisms are similar in their essential characteristics: infectivity, pathogenicity, healthy carriage, fulfillment of useful functions in the host body, and the capacity for forming chronic infection. Hence, it is concluded that the necessity for the host is the cause of infectivity of any infective bacterium or virus.

Keywords: infectiousness, pathogenicity, healthy carrier, infectious diseases, prevention, treatment.

ТРИТЕРПЕНОИД МИЛИАЦИН НЕ ОКАЗЫВАЕТ ЗАЩИТНОГОДЕЙСТВИЯ ПРИ ОСТРОЙ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ $(СВАХС_{57}BL_6)F_1$, ВЫЗВАННОЙ *K. PNEUMONIAE*

Фролов Б. А., Полякова В. С., Смолягин А. И., Панфилова Т. В., Железнова А. Д., Сарычева Ю. А., Филиппова Ю. В.

Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия

Использованы 6 групп животных: зараженные (группа сравнения); зараженные и получавшие через 2 ч после заражения растворитель для милиацина (контроль), или милиацин (4 опытные группы) в дозах 2, 10, 20 и 40 мг/кг. Заражение (2×10^6 КОЕ, внутрибрюшинно) вызывало гибель 85,7 % мышей в течение 48 ч при морфологической картине токсико-септического шока. Милиацин не влиял на показатели гибели животных во всех концентрациях. Высказано мнение, что для ослабления гипервоспалительной фазы патологического процесса более перспективным является подход, направленный на формирование эндотоксиновой толерантности.

Ключевые слова: тритерпеноид милиацин, инфекция *K. pneumonia.*

Токсико-септические состояния (ТСС) характеризуются избыточной продукцией провоспалительных цитокинов и других медиаторов, отвечающих за мультиорганные поражения в гипервоспалительную фазу процесса и последующее формирование иммунопаралича как главной причины прогрессирующего развития патологии. Успешная борьба с ТСС представляет собой не только сложную, но и трудноразрешимую проблему. Ранее было показано, что пентациклический тритерпеноид милиацин обладает широким спектром биологических свойств, включая антиоксидантную активность [1], способность уменьшать выраженность патологической эндотоксинемии [2], а также реализовывать протекцию в отношении системы иммунитета при токсическом действии на организм ксенобиотика [3].

Целью настоящей работы являлась оценка возможности защитного влияния милиацина при экспериментальной генерализованной инфекции, вызванной летальной дозой заражения *K. pneumoniae.*

Материалы и методы. Милиацин получен из кристаллов просяного масла, выпадающих при его отстаивании на холоду.

Воспроизведение модели генерализованной инфекции проводилось путем внутрибрюшинного заражения животных диким штаммом *K. pneumoniae* в дозе (2×10^6 КОЕ) в объеме 0,5 мл. В работе использованы 64 особи мышей ($CBAxC_{57}Bl_6)F_1$, массой 22,0-24,0 г, разделенных на 6 групп. Первую из них (группа сравнения) составили 14 животных, подвергнутых только заражению. Вторая (контрольная группа) включала 10 зараженных особей, которым через 2 часа после заражения внутрибрюшинно вводился растворитель для милиацина: твин 21 на физрастворе (0,5 мл) в конечной концентрации $1,6\times10^{-7}$ моль/кг. 3, 4, 5 и 6 группы животных (опытные группы) подвергались через 2 часа после заражения внутрибрюшинному введению 0,5 мл милиацина в конечных концентрациях, соответственно, 2 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг. Верификацию патологического процесса осуществляли на основании показателей гибели животных в течение первых трех дней после заражения и характеристики структурной реорганизации внутренних органов. С этой целью исследуемые органы, полученные на 2-3 сутки от 6 зараженных животных, фиксировали в 10 % нейтральном формалине с последующим приготовлением гистологических препаратов и их окраской гематоксилином-эозином по стандартной методике. Анализ препаратов проводили световой микроскопией.

Результаты. Установлено, что внутрибрюшинное заражение мышей группы сравнения приводило к гибели 85,70 % животных в течение 48 часов. Морфологический анализ свидетельствует о развитии генерализованного процесса характерного для токсико-септического шока в виде ДВС-синдрома, деструктивных и некробиотических изменений, затрагивающего все внутренние органы животных. В клетках печени регистрируется преимущественно гидропическая дистрофия, а также очаговые некрозы гепатоцитов в сочетании с тромбозом печеночных венул. В центральных венах и синусоидах печеночных долек присутствуют свободнолежащие нити фибрина. В зоне некрозов наблюдается декомплементация печеночных балок. Изменения в легких характеризуются значительным расширением сосудов микроциркуляторного русла, сладжированием и агглютинацией эритроцитов с наличием множественных фибриновых и гиалиновых тромбов, отеком интерстиция, его инфильтрацией эритроцитами, скоплением бактерий вокруг сосудов и в перибронхиальной соединительной ткани. В бронхиальных сосудах наблюдается картина острого васкулита с повреждением интимы и медии вплоть до их некроза и выраженным отеком адвентициальной оболочки. В почках обнаруживаются гиалино-капельная гидропическая дистрофия и локальные некрозы извитых канальцев с наличием бактерий в зонах некроза и повышенным кровенаполнением на границе коркового и мозгового вещества органа. В сердечной мышце выявляется полнокровие венул, сладжирование эритроцитов в капиллярах в сочетании с субэндокардиальными и эндокардиальными зонами микронекрозов, в которых регистрируются скопления бактерий. Изменения со стороны систем нейроэндокринной регуляции отражают их истощение. Об этом свидетельствует преобладание хромофобных клеток в аденогипофизе, обнаружение в нем гиалиновых тромбов в синусоидных капиллярах, окружающих аденоциты, и очагов некроза. В надпочечниках выявляется существенное снижение окраски цитоплазмы клеток, преимущественно пучковой зоны коркового слоя органа. Среди клеток этой зоны выявляются локальные некрозы. В мозговом веществе присутствуют очаги кровоизлияний. В целом, эти изменения отражают картину острой надпочечниковой недостаточности.

Использование растворителя (контроль) не повлияло на показатели гибели животных, которые на протяжении 48 часов составили 80 %. Что касается милиацина (опыт), то его введение зараженным мышам не оказало защитного эффекта. Показатели гибели в течение 48 часов при дозах тритерпеноида 2, 10, 20 и 40 мг/кг не отличались от контроля и группы сравнения, составляя, соответственно, 90 %, 70 %, 100 % и 90 %.

Обсуждение. Неудачи коррекции сформировавшегося септического процесса, в том числе с помощью подходов, направленных на нейтрализацию определенных провоспа-

лительных агентов (специфические антитела к ФНОα / ИЛ-1β, растворимые рецепторы к ФНО, антагонисты рецепторов к ИЛ-1) отмечались и в ранее выполненных исследованиях [4]. Известно, что центральная роль в патогенезе генерализованной инфекции принадлежит цитокиновой экспансии, индуцируемой сигнальным каскадом при участии TLR-4, адапторного белка MyD 88 и фактора транскрипции NF-kB, отвечающего за экспрессию генов большинства провоспалительных цитокинов. Положение усугубляется способностью секретируемых цитокинов (ФНОα) самим выступать в роли индукторов NF-kB, придавая этой секреции лавинообразный характер, а также вовлекать в патологический процесс другие медиаторы воспаления. Тем самым включаются регуляторные механизмы, формирующие системный воспалительный процесс, индуцируемый не только комплексом токсических соединений бактериального происхождения, но и громадным числом образующихся биологически активных веществ, обусловливающих полиморфизм проявлений патологии и тяжесть ее исхода. Соответственно, с большой вероятностью следует полагать, что эффективная коррекция ТСС может быть достигнута не через ограничениие действия отдельных, пусть даже весьма значимых факторов патогенеза, а путем лимитирования их продукции через формирование ранней эндотоксиновой толерантности и модификации антиэндотоксинового статуса [5], ослабляющих гипервоспалительную фазу патологического процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панфилова Т. В., Штиль А. А., Фролов Б. А. Тритерпеноид милиацин снижает индуцируемое стрессом ПОЛ / Т. В. Панфилова, А. А. Штиль, Б. А. Фролов // Бюлл. экспер. биол и мед.– 2006.– Т. 141.– № 6.– С. 633-635.
2. Механизмы реализации защитного действия милиацина при экспериментальной сальмонеллезной инфекции: влияние на эндотоксинемию и продукцию цитокинов / Б. А. Фролов, И. Н. Чайникова, Ю. В. Филиппова и др. // ЖМЭИ.– 2014.– № 5.– С. 8-12.
3. Смолягин А. И., Чайникова И. Н., Штиль А. А. Влияние милиацина на дисфункцию иммунной системы у мышей при действии метотрексата / А. И. Смолягин, И. Н. Чайникова, А. А. Штиль // Иммунология.– 2009.– № 5.– С. 298-302.
4. Remick D. G., Ward P. A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis / D. G. Remick, P. A. Ward // Shock.– 2005.– V. 24.– P. 7-11.
5. Маркина А. А. Комплексное экспериментальное моделирование шоковых состояний / А. А. Маркина // Иммунология.– 2012.– № 5.– С. 250-254.

THE TRITERPENOID MILIACIN DOES NOT SHOW PROTECTIVE EFFECT IN ACUTE GENERALIZED INFECTION IN MICE ($CBAxC_{57}Bl_6)F_1$ INDUCED BY *K.PNEUMONIAE*

Frolov B. A., Polyakova V. S., Smolyagin A. I., Panfilova T. V., Zheleznova A. D., Sarycheva Yu.A., Filippova Y. V.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

It was used six animal groups: infected (comparison group); infected and receiving in 2 hours after infection the solvent for miliacin (control) or miliacin (4 experimental groups) in doses of 2, 10, 20 and 40 mg/kg. The infection (2×10^6 CFU, intraperitoneally) induced mice death 85.7 % within 48 h. under morphological finding of toxicoseptic shock. Miliacin hadn't influence on the indexes of animal death in all concentrations. An opinion was advanced that for weakening the hyperinflammatory phase of pathological process more perspective directions is the formation of endotoxic tolerance is more promising.

Keywords: triterpenoid miliacin, infection of *K. pneumonia.*

ЛОКАЛЬНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ФАКТОРЫ У ДЕТЕЙ С РЕАКТИВНЫМ АРТРИТОМ

Челпаченко О. Е., Иванова Е. В., Перунова Н. Б., Данилова Е. И., Федотова Л. П., Бондаренко Т. А., Салгина А. В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия

У детей с РеА отмечается изменение состояния локальной антимикробной защиты кишечного биотопа. Выявлено многократное повышение уровня лактоферрина и двукратное – лизоцима в копрофильтратах у всех детей с артиритами, независимо от степени дисбиоза толстого кишечника. Полученные данные свидетельствует о роли микроорганизмов кишечной микробиоты в развитии артрита и значимости ЛФ и лизоцима как маркеров, сопровождающих РеА.

Ключевые слова: реактивный артрит, копрофильтраты, лактоферрин, лизоцим, дети.

Реактивные артриты (РеА) занимают ведущее место среди ревматических заболеваний. Экспериментально доказана роль кишечного микробиома в развитии артритов [1,2]. Микроорганизмы, находящиеся в кишечнике, воздействуют на иммунную систему хозяина, приводя к изменению состояния антимикробной защиты кишечного биотопа, в том числе, показателей врождённого иммунитета [3].

Поскольку лактоферрин (ЛФ) рассматривается как перспективный клинический маркёр при ревматоидном артрите [4], проявляющий антимикробный синергидный эффект в сочетании с лизоцимом, **целью настоящей работы** явилось изучение уровня лактоферрина и лизоцима в копрофильтратах у детей с реактивным артритом.

Материалы и методы. Исследуемую группу составили 30 детей с РеА, группу сравнения – 25 условно здоровых детей. Для постановки диагноза РеА использовали критерии Международного совещания по РеА (Берлин, 1996). Исследование микробиоценоза кишечника и оценка его состояния по степеням проводились в соответствии с приказом МЗ РФ от 9 июня 2003 года № 231.

Копрофильтраты готовили с использованием ингибиторов протеаз: ингибитор соевых бобов, контрикал. Определение ЛФ в копрофильтратах проводилось методом ИФА с использованием реагентов «Вектор-Бест» (Россия). Лизоцим в копрофильтратах определяли фотометрическим методом с ацетонированным микрококком. Статистическую обработку проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, USA) с оценкой различий между средними величинами по t-критерию Стьюдента. Статистические результаты выражали в виде медианы (Me), нижних (Q25) и верхних (Q75) квартилей. Уровни статистической значимости различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. При бактериологическом исследовании детей с РеА дисбиоз кишечника выявлялся у 26 из 30 детей (86,7 ± 6,1 %), в группе сравнения – у 18 детей из 25 (72,0 ± 8,9 %), $p>0,05$. Из 26 детей с РеА, имеющих нарушения кишечного микробиоценоза, дисбиоз кишечника I степени отмечался у 15,4±7,0 % пациентов (у здоровых – 61,1±11,5 %, $p<0,05$), дисбиоз II степени – у 46,1±9,8 % детей с РеА (у здоровых – 38,9 ± 11,5 %, $p>0,05$), дисбиоз III степени – у 38,5±9,5 %, выявлялся только у больных РеА ($p<0,05$), т.е. у больных артритом преобладают более тяжёлые микробиоценотические нарушения, чем у здоровых детей ($p<0,05$).

В копрофильтратах обследуемых детей с РеА с бактериологически подтверждённым эубиозом уровень ЛФ отмечался на нулевых

значениях равно как у здоровых детей с эубиозом. Уровень лизоцима у больных с эубиозом – 0,65±0,15 мг/мл, в группе сравнения у здоровых детей с эубиозом (1,4 мг/мл) не отличался от уровня лизоцима у детей с дисбиозом (1,4 [1,3-1,5] мг/мл). У детей с РеА, имеющих дисбиоз, независимо от степени, в копрофильтратах отмечалось увеличение содержания ЛФ (1885 [1820-5636] нг/мл, p<0,05), что оказалось в 4 раза выше по сравнению с уровнем ЛФ у здоровых детей с дисбиозом (429[429-1796] нг/мл, p<0,01). Одновременно с увеличением концентрации ЛФ отмечается повышение уровня лизоцима у детей с РеА и дисбиозом в 2 раза (3,18 [1,7-5,0] мг/мл) по сравнению с уровнем лизоцима здоровых детей с дисбиозом (1,4[1,3-1,5] мг/мл, p<0,01).

При анализе содержания ЛФ в копрофильтратах детей с РеА в зависимости от степени дисбиоза выявлено, что у больных артритом уровень ЛФ повышался в зависимости от степени тяжести микробиоценотических нарушений кишечника: у больных с дисбиозом III степени уровень ЛФ – (2315[1335-4929] нг/мл) достоверно выше в сравнении с данным показателем у больных с дисбиозом I степени (343[141,3-585,3] нг/мл, p<0,01). Уровни ЛФ у больных детей с дисбиозом I и II степеней существенно не отличались от данных показателей в группе сравнения. При анализе содержания ЛФ в копрофильтратах здоровых детей (группы сравнения) в зависимости от степени тяжести дисбиотических изменений микрофлоры кишечника также отмечалась тенденция к увеличению уровня ЛФ: при дисбиозе I степени – (239[141,3-585,3] нг/мл); при дисбиозе II степени – (479[277-1427] нг/мл, p>0,05), однако достоверных различий между этими показателями не выявлено.

Идентичная закономерность выявлена при определении содержания лизоцима в копрофильтратах у детей с РеА при нарастании степени тяжести дисбиоза: при дисбиозе I степени – (1,78[1,3-2,35] мг/мл); при дисбиозе II степени – (2,1[1,8-5,0] мг/мл, p>0,05); при дисбиозе III степени – (3,18[1,84-5,0] мг/мл, p>0,05), т.е. тенденция к повышению уровня лизоцима, но без достоверных различий показателей. Не выявлено достоверных различий уровня лизоцима в копрофильтратах больных с дисбиозом I и II степени от этих показателей в группе сравнения.

Таким образом, изменение состояния локальной антимикробной защиты кишечного биотопа является свидетельством роли микробного фактора в развитии РеА. Проведенные ранее исследования показали связь между уровнем ЛФ и лизоцима копрофильтратов с тяжестью микробиоценотических нарушений кишечной микрофлоры и возможность использования этих факторов в качестве показателей локальной антимикробной защиты кишечного биотопа [4].

У детей с РеА, наряду с сопряжённостью уровня ЛФ и лизоцима копрофильтратов с тяжестью дисбиотических нарушений, отмечается их связь с наличием реактивного артрита, независимо от степени дисбиоза. Учитывая этиопатогенетическую значимость кишечного микробиома в развитии артритов [2], очевидна целесообразность определения ЛФ и лизоцима в качестве показателей локальной антимикробной защиты кишечного биотопа у больных РеА, а также возможность использования ЛФ и лизоцима для мониторинга активности воспалительного процесса у больных с РеА, определения тяжести и прогноза течения артрита и контроля эффективности противовоспалительной терапии.

«Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Оренбургской области в рамках научного проекта № 16-44-560553 «р_а» и фонда РГНФ – проект № 16-16-56004.»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scher J.U., Abramson S.B. The microbiome and rheumatoid arthritis. / J.U. Scher, S.B. Abramson. // Nat Rev Rheumatol.– 2011.– Vol.7.– No.10.– P. 569-578.
2. The role of the microbiome in Rheumatic Diseases. / N. Yeoh, J.P. Burton, P. Suppiah et al. // Curr. Rheumatol. Rep.– 2013.– Vol.15.– No. 314.– DOI 10.1007 / s11926-012-0314-y.
3. Бухарин О.В., Перунова, Н.Б Микросимбиоценоз. /О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова. // Екатеринбург: УрО РАН.– 2014.– 260 с.
4. Локальные антимикробные факторы и цитокины при дисбиозе кишечника человека. / Е.В. Иванова, Т.А. Бондаренко, И.Н. Чайникова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9 (18).– № 2 (1).– С. 691-692.

LOCAL ANTIMICROBIAL FACTORS IN CHILDREN WITH REACTIVE ARTHRITIS

Chelpachenko O. E., Ivanova E. V., Perunova N. B., Danilova E. I., Fedotova L. P., Bondarenko T. A., Salgina A. V.

Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

The changes in the state of local antimicrobial protection of the intestinal biotope of children with ReA were obtained. There were revealed a significant rise in the level of lactoferrin (LF) and double – lysozyme coprofiltrates of all children with arthritis compared with healthy children, regardless of the degree of colon dysbiosis. The findings showed the role of gut microbiota microorganisms in the development of arthritis and significance of LF and lysozyme as a marker accompanying ReA.

Keywords: reactive arthritis, coprofiltrates, lactoferrin, lysozyme, children.

СОСТОЯНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА У МУЖЧИН С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ДРУГИМИ ИППП

Антимирова Е. А., Прокопьев Д. С., Летяева О. И., Ковалев Д. А., Дольникова О. А.

Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

Нами был проведен анализ заболеваемости ПВИ среди мужчин города Челябинска, обратившихся к дерматовенерологу в период с января 2013 по август 2015 года. По результатам генотипирования было обнаружено, что большинство носителей папилломавирусной инфекции имеют вирусы высокого онкогенного риска, в частности ВПЧ 16 типа. Проведен анализ изменений системного иммунитета у больных папилломавирусной инфекцией, ассоциированной с другими возбудителями инфекций, передаваемых половым путем.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, высокий онкогенный риск, генотипирование, системный иммунитет.

Вирус папилломы человека является доказанным этиологическим агентом развития рака шейки матки, бовеноидного папулеза, эритроплазии Кейра, рака полового члена, при этом ВПЧ один из самых распространенных вирусов, передающихся половым путем, угрозе заражения которым в разный период жизни подвержена значительная часть населения [1, 2]. Распространенность ВПЧ в мире составляет от 10 до 23 %. Важнейшим кофактором инфицирования и развития патологического процесса являются состояния, сопровождающиеся дестабилизацией системного и местного иммунитета, в том числе инфицирование патогенной и условно-патогенной микрофлорой. Малосимптомное или бессимптомное течение сочетанных инфекций, отсутствие своевременной диагностики и лечения приводят к нарушению репродуктивной функции [3].

Цель. Изучить частоту встречаемости высокоонкогенных типов вируса папилломы человека среди мужского населения. Провести анализ характера иммунологических изменений у мужчин с папилломавирусной инфекцией, ассоциированной с другими возбудителями инфекций, передаваемых половым путем.

Материалы и методы. На базе мужского анонимного кабинета ЧОККВД и Медицинского Центра «Феникс» был осуществлен

анализ 1215 амбулаторных карт пациентов, обратившихся к дерматовенерологу в период с января 2013 по август 2015 года. Средний возраст пациентов составил 31±2 год. В наше исследование вошли пациенты с диагнозом А 56.0 – Хламидийная инфекция нижних отделов мочеполового тракта, N 34 + B 96.8 – уретрит, ассоциированный с *M. genitalium*, пациенты с ПВИ, которые имели персистирующий характер течения инфекции.

Критерии исключения: гонококковая, трихомонадая инфекция, наличие тяжелой соматической патологии, ВИЧ, несогласие пациентов на участие в исследовании.

Материалом для выделения ДНК возбудителей и последующей амплификации послужили соскобы эпителия уретры, взятые одноразовыми универсальными зондами. В качестве метода выявления, дифференциации и количественного определения ДНК ВПЧ ВР использовалась ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени при помощи диагностических наборов «Амплисенс ВПЧ ВКР – СКРИН-ТИТР FRT» и «Амплисенс ВПЧ ВКР – ГЕНОТИП FRT» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва. ПЦР – исследования проводились на четырехканальном амплификаторе «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия). Всем пациентам был выполнено исследование системного иммунитета. Иммунологические исследования проведены с помощью метода проточной цитофлуориметрии на аппарате Cytomics FC 500 Beckman Coulter (США).

Из 1215 человек, обследованных на наличие ПВИ, вирус был выявлен у 216 (17,7 %.). Распределение генотипов ВПЧ ВКР среди мужчин: ВПЧ 16 типа был обнаружен у 54 мужчин (25,9 %), ВПЧ 18 типа у 17 человек (7,8 %), ВПЧ 31 типа у 27 мужчин (12,5 %), 33 типа у 18 пациентов (8,33 %), ВПЧ 35 типа был обнаружен у 5 больных (2,31 %), ВПЧ 39 типа у 8 пациентов (3,7 %), ВПЧ 45 типа у 11 человек (5,09 %), ВПЧ 51 типа выявлен у 22 пациентов (10,18 %), ВПЧ 52 типа у 16 мужчин (7,4 %), ВПЧ 56 типа у 5 больных (2,31 %), ВПЧ 58 типа у 3 пациентов (1,38 %), ВПЧ 59 типа был обнаружен у 3 больных (1,38 %).

В результате комплексного обследования были выделены три группы пациентов: группа «ПВИ» (n=26), у которых определилась только ДНК ВПЧ, группа «ИППП» (n=26), у мужчин этой группы были обнаружены хламидии и/или *M.genitalium*, группа «ПВИ+ИППП» (n=30), где имелось сочетание ВПЧ и хламидий и/или *M.genitalium*. Группу сравнения составили практически здоровые мужчины (n=21).

В результате изучения показателей периферической крови, были установлено, что количество лейкоцитов в группе «ПВИ+ИППП» составляет 6,63±1,24×10^9/л, что достоверно выше, чем в группе «ПВИ» 5,98±1,18×10^9/л. Показатель лейкоцитов в группе здоровых мужчин равен 6,13±1,01×10^9/л.

Исследование клеточных факторов системного иммунитета показало снижение уровня фагоцитарной активности нейтрофилов, в группе «ПВИ+ИППП» она составляет 45,36± 11,56, в группе «ПВИ» 52,00±9,69. Лизосомальная активность составляет 272,05± 54,55×10^9/л и 295,06±66,27 соответственно. Спонтанный НСТ-тест в группе «ПВИ+ИППП» составил 32,15±9,91, у мужчин группы «ПВИ» – 20,83± 9,10. Размеры циркулирующих иммунных комплексов составили 93,95±53,30 и 78,33±19,74 нм соответственно.

Оценка содержания IgA показала снижение этого показателя в случае сочетанной инфекции. Уровень IgA у пациентов группы «ПВИ+ИППП» оказался 2,27±1,11 г/л, в группе «ПВИ» – 2,39±0,91 г/л. Уровень IgM в группе «ПВИ+ИППП» составлял 2,42±0,86 г/л, в группе «ПВИ» – 1,45±1,17 г/л. Значение общего IgG в этих группах составило 19,12±2,62 г/л и 14,67± 4,53 г/л соответственно.

Выводы. Анализ заболеваемости папилломавирусной инфекцией среди мужчин города Челябинска показывает, что большинство носителей папилломавирусной инфекции имеют вирусы высокого онкогенного риска, самым частым типом вируса является ВПЧ 16 типа. Сочетанное течение ПВИ с хламидийной или микоплазменной инфекцией характеризуется более выраженным угнетением факторов системного иммунитета у мужчин, чем в случае изолированного течения папилломавирусной инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Папилломавирусная инфекция: новые взгляды на диагностику и лечение (обзор литературы) / Н. В. Бестаева, Н. М. Назарова, В. Н. Прилепская и др. // Гинекология.– 2013.– Т. 15, № 3.– С. 4-7.
2. Довлетханова Э. Р., Абакарова П. Р. Возможности применения противовирусных препаратов с иммуномодулирующим действием в лечении ВПЧ-ассоциированных заболеваний / Э. Р. До-

влетханова, П. Р. Абакарова // Гинекология.– 2014.– Т. 16, № 5.– С. 24-26.
3. Летяева О. И., Абрамовских О. С., Гизингер, О. А. Оппортунистические инфекции гениталий и папилломавирусная инфекция: новые возможности иммуномодулирующей терапии/ О. И. Летяева, О. С. Абрамовских, О. А. Гизингер // Акушерство и гинекология.– 2011.– № 6.– С. 108-112.

ANALYSIS OF THE INCIDENCE OF THE HUMAN PAPILLOMA VIRUS AMONG MEN

Antimirova E. A., Prokopev D. S., Letyaeva O. I., Kovalev D. A., Dolnikova O. A.

South Ural state medical University, Chelyabinsk, Russia

We analyzed the incidence of HPV infection among the men of the city of Chelyabinsk who applied to the dermatologist in the period from January 2013 to August 2015. According to the results of genotyping, it was found that most carriers of human papillomavirus infection viruses have high risk HPV, in particular HPV type 16. We carried out analysis of changes in systemic immunity in patients with human papillomavirus infection associated with other pathogens of sexually transmitted infections

Keywords: human papillomavirus, HPV high risk, genotyping, systemic immunity.

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕЙТРОФИЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У СЕМЕЙНЫХ ПАР С ВЫСОКООНКОГЕННЫМИ ТИПАМИ ВПЧ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ИЗОПРИНОЗИНОМ

Телешева Л. Ф., Абрамовских О. С., Маркова В. А., Маркеева Д. А.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия

Проведено исследование количества и функциональной активности нейтрофилов урогенитального тракта женщин и мужчин из супружеских пар инфицированных высокоонкогенным типом ВПЧ. Забор материала проводился до лечения, через 3 и 6 месяцев после проведенной терапии. Показано, что лечение изопринозином приводит к элиминации возбудителя и нормализации функциональной активности нейтрофилов секретов репродуктивного тракта.

Ключевые слова: ВПЧ, локальный иммунитет, нейтрофилы.

Актуальность. Генитальная инфекция, вызванная высокоонкогенными типами вируса папилломы человека (ВПЧ), является не только проблемой инфицированных пациентов, но и их сексуальных партнеров [1]. В свою очередь, наличие клинических симптомов в менее чем 10 % случаев и бессимптомное течение, достигающее по данным литературы 60-70 %, создает условия для передачи инфекции половому партнеру [1-3]. Следовательно, выявление источника инфекции практически не представляется возможным, и можно предположить, что при установлении диагноза оба партнера могут быть инфицированы [3]. Благодаря «механизмам ускользания» ВПЧ остается «незамеченным» для системного иммунитета, кроме того, вирус способен подавлять локальные иммунные реакции [3, 4]. Нейтрофилы, являясь представителями системы врожденного иммунитета, обеспечивают пер-

вую линию защиты против папилломавирусной инфекции (ПВИ) и их функция определяет исход заболевания [5].

Цель данной работы заключалась в изучении и функциональной активности нейтрофилов секретов репродуктивного тракта женщин и мужчин из семейных пар, инфицированных ВПЧ высокогоонкогенного риска до лечения, через 3 и 6 месяцев после проведенной терапии.

Используемые методы. Объектом исследования стали 38 супружеских пар, инфицированных высокоонкогенными типами ВПЧ и являющихся постоянными половыми партнерами в течение 3-х и более лет. Группа контроля составила 16 женщин и 10 мужчин, не имевших урогенитальных и соматических заболеваний. ДНК высокоонкогенных типов ВПЧ в клиническом материале определяли методом ПЦР в режиме «реального времени».

С целью оценки иммунологических показателей у мужчин исследовали эякулят, у женщин – цервикальную слизь. Проводили изучение количества и функциональной активности нейтрофилов (фагоцитарную и лизосомальную активности, внутриклеточный кислородзависимый метаболизм оценивали с помощью НСТ-теста). Все пациенты получали 28-дневный курс терапии изопринозином по 1000 мг 3 раза в сутки. Забор материала производился до лечения, через 3 и 6 месяцев после лечения.

Статистический анализ осуществлен в пакете прикладных программ «Statistica for Windows 8.0».

Основные результаты. В ходе анализа клеточных факторов врожденного иммунитета цервикальной слизи женщин до лечения установлено, что абсолютное количество лейкоцитов и относительное количество жизнеспособных нейтрофилов значительно превышало показатели группы контроля (в 4 раза), значения же активности и интенсивности как спонтанного, так и индуцированного НСТ-теста были достоверно снижены.

В эякуляте у мужчин до лечения отмечалось повышение абсолютного количества лейкоцитов, активности и интенсивности спонтанного и индуцированного НСТ-теста, снижение количества жизнеспособных нейтрофилов и их функционального резерва по сравнению с аналогичными показателями группы контроля.

При повторном обследовании семейных пар через 3 месяца после проведенного лечения у женщин наблюдалось снижение абсолютного количества лейкоцитов и количества жизнеспособных нейтрофилов по сравнению с аналогичными показателями до лечения. У мужчин отмечалось снижение большинства показателей, при этом абсолютное количество лейкоцитов достигло уровня контрольной группы.

Более значительные изменения были обнаружены при обследовании супружеских пар через 6 месяцев после лечения. У женщин абсолютное количество лейкоцитов было ниже, чем в группах до и через 3 месяца после проведенного лечения. Показатели активности и интенсивности спонтанного и индуцированного НСТ-теста нейтрофилов цервикального секрета снижались. У мужчин через 6 месяцев после проведенного лечения изопринозином абсолютное количество лейкоцитов и жизнеспособность, а так же активность и интенсивность, как спонтанного, так и индуцированного НСТ-теста нейтрофилов были снижены относительно показателей группы до лечения. Следует отметить, что через 6 месяцев после лечения, у женщин и у мужчин из семейных пар в большинстве случаев не обнаруживался ВПЧ высокоонкогенных типов.

Таким образом, лечение изопринозином семейных пар, инфицированных высокоонкогенными типами ВПЧ, способствует элиминации инфекционного агента и нормализации функциональной активности нейтрофилов секретов репродуктивного тракта, как у женщин, так и у мужчин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Троянова А. В., Лысенко О. В., Латанская О. А. Типовой состав и микробные ассоциации папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска у семейных пар / А. В. Троянова, О. В. Лысенко, О. А. Латанская // Вестник Уральской медицинской академической науки.– 2011.– № 2-1 (35).– С. 207-208.
2. Snoeck R. Papillomavirus and treatment / R. Snoeck // Antiviral Res.– 2006.– V.71.– P. 181-191.
3. Телешева, Л.Ф., Лысенко, О.В., Троянова, А. В. Функциональная активность нейтрофилов секретов репродуктивного тракта половых партнеров, инфицированных вирусом папилломы человека / Л. Ф. Телешева, О. В. Лысенко, А. В. Троянова // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8. № 3 (17).– С. 876-879.
4. Оценка иммунологической эффективности лечения изопринозином у семейных пар, инфицированных ВПЧ / Л. Ф. Телешева, В. А. Маркова, О. В. Лысенко и др. // Российский иммуноло-

гический журнал.– 2015.– Т. 9.– № 1(1) (18).– С. 183-184.
5. Иммунологические аспекты патогенеза папилломавирусной инфекции репродуктивного тракта у женщин / О.С. Абрамовских, Л.Ф. Телешева, О.И. Летяева и др. // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология.– 2012.– № 2.– С. 95-101.

DYNAMICS OF INDICATORS NEUTROPHIL IMMUNITY IN MARRIED COUPLES WITH HIGH ONCOGENIC TYPES OF HPV BEFORE AND AFTER TREATMENT IZOPRINOZIN

Telesheva V.F., Abramovskikh O.S., Markova V.A., Markeeva D.A.

State budgetary educational institution of higher professional education «South Ural State Medical University», of Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

Conducted a study of the number and functional activity of neutrophils urogenital tract of women and men from married couples infected with high oncogenic types of HPV. Taking the material was carried out before treatment and at 3 and 6 months after therapy. It has been shown that treatment izoprinozin leads to elimination of the pathogen and normalization functional activity of neutrophil of secrets reproductive tract.

Keywords: HPV, local immunity, neutrophils.

ИНТЕРФЕРОНЫ I, II, III ТИПОВ И ПРОТИВОВИРУСНЫЙ БЕЛОК MxA В КРОВИ И СМЫВАХ У БОЛЬНЫХ ПРИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Оспельникова Т.П.[1], Морозова О.В.[1,2], Исаева Е.И.[1], Андреева С.А.[1], Ершов Ф.И.[1]

[1]ФГБУ Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ; [2]ФГБУ Федеральный Научно-Клинический Центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Анализ экспрессии генов интерферонов (IFN) α, β, γ, λ и противовирусного белка MXA в крови и в смывах инфицированных вирусами гриппа и аденовирусами посредством ОТ-ПЦР в реальном времени показал отличия для IFNα в лимфоцитах больных и здоровых людей при отсутствии РНК в смывах. Напротив, РНК IFNγ выявлена в половине смывов при отсутствии в крови. Высокие уровни РНК IFNl и MXA у больных ОРВИ в период острой инфекции не ингибировали репродукцию вирусов на ранних стадиях.

Ключевые слова: острые респираторные вирусные инфекции, интерфероны I, II, III типа, MXA белок, обратная транскрипция с ПЦР в реальном времени.

Введение. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения вирусные инфекции поражают 20 % населения, в результате осложнений ежегодно погибает около 500 тысяч человек. Из них острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) составляют около 90 %. В настоящее время известно более 200 возбудителей ОРВИ – вирусов, относящихся к различным семействам ортомиксовирусов, парамиксовирусов, аденовирусов, риновирусов, бокавирусов, метапневмовирусов, коронавирусов и др. ОРВИ свидетельствуют о нарушениях врожденной резистентности и специфического иммунитета [1, 2, 3]. Ген MX1 кодирует

противовирусный белок Myxovirus resistance protein (MXA) массой 76 кДа суперсемейства гуанозинтрифосфатаз (GTPase) и индуцируется интерферонами (IFN) I типа (α/β), но не IFNg или другими цитокинами. MXA узнаёт и захватывает нуклеокапсид-подобные структуры вирусов после их проникновения в клетки хозяина, ингибируя репликацию вирусных геномов [4]. Анализ экспрессии гена MX1 может служить маркером дифференциации вирусных от бактериальных инфекций и свидетельством биодоступности интерферонов I типа. Исследование системы IFN и индуцируемых ими генов необходимо для персонализированной профилактики и терапии.

Цель: количественные оценки экспрессии генов IFN I, II, III типов и противовирусного белка MXA при ОРВИ.

Материалы и методы. Образцы крови и смывы 17 пациентов инфекционного отделения Городской Клинической Больницы № 1 г.Москвы с диагнозами грипп (10 больных 18-33 лет) и ОРВИ (7 больных 18-44 лет) были любезно предоставлены рук. инфекционного отделения профессором Л. В. Колобухиной. Группу сравнения составили 15 практически здоровых человек в возрасте 25-60 лет. Для определения РНК риновирусов, РС вируса, вирусов парагриппа, ДНК аденовирусов групп B, C и E проводили обратную траскрипцию с ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием набора «ОРВИ-АмплиСенс» ("АмплиСенс", Москва). Количественное определение РНК IFN α, β, γ, λ и противовирусного белка MXA, а также определение IFN статуса культуральным методом проводили, как описано ранее [5].

Результаты и обсуждение. Респираторные вирусы, включая вирус гриппа А в 4 образцах и гриппа В в 6 образцах; аденовирусы в 7 образцах носоглоточных смывов выявлены методом ОТ-ПЦР-РВ. Другие возбудители ОРВИ не обнаружены.

Анализ экспрессии генов IFN 3 типов показал преимущества определения РНК в мононуклеарных клетках крови по сравнению с сыворотками как по общему количеству положительных образцов, так и по их количественным оценкам. Необходимо отметить наличие РНК IFN и MXA в смывах со слизистой носоглотки при качественных и количественных отличиях мукозального и системного ответа.

Для IFNα показано отсутствие РНК в смывах как здоровых людей, так и у больных ОРВИ при отличиях частот детекции в лимфоцитах больных (41,2±12,3 %) и здоровых людей (26,7±11,8 %). РНК IFNβ выявлена в крови всех инфицированных аденовирусами и в 93,3 % образцов контрольной группы при полном отсутствии в лимфоцитах больных гриппом и определении в большинстве исследованных смывов всех групп. В противоположность IFNα экспрессия гена IFNγ обнаружена преимущественно в смывах при полном отсутствии в клетках крови. При этом отличия между частотами детекции у больных гриппом (50 %) и здоровыми донорами (40 %) были не значимыми, а у инфицированных аденовирусами РНК IFNγ не определялась.

Высокие частоты (80-100 %) и уровни экспрессии генов IFNλ и MxA у больных ОРВИ и здоровых не отличались. Экспрессия гена MX1 в клетках крови и слизистой носоглотки была индуцирована IFNα и β, соответственно. Высокие уровни РНК MXA в клетках крови и слизистой свидетельствовали о биодоступности IFN I типа в этих клетках, о преимущественно вирусных инфекциях без ассоциаций с бактериями и не обеспечивали полного ингибирования репликации вирусов гриппа и аденовирусов на ранней стадии инфекции.

Выявлена функциональная недостаточность в продукции IFNα/γ лейкоцитами крови, сниженная в 3,3 и 2 раза, соответственно, по сравнению с показателями здоровых лиц.

Вывод. Качественные и количественные отличия РНК IFN 3 типов в клетках слизистой носоглотки и в лимфоцитах крови у больных ОРВИ в острый период при отсутствии последующих осложнений и у здоровых людей контрольной группы свидетельствуют о дифференциальной индукции их экспрессии на входных воротах инфекции, которая обеспечивает врождённую неспецифическую доиммунную резистентность и последующеее развитие преимущественно клеточного иммунного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seth R. B., Sun L., Chen Z. J. Antiviral innate immunity pathways / R. B. Seth, L. Sun, Z. J. Chen // Cell. Research.– 2006.– V. 16.– P. 141-147.
2. Medzhitov R. Innate immunity: quo vadis? / R. Medzhitov // Nat. Immunol.–2010.– V. 11 (7).– P. 551-553.
3. Biron C. A. Yet anotherrole for natural killer cells: cytotoxicity in immune regulation and viral

persistence / C. A. Biron // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2012.– V. 109(6).– P. 1814-1815.
4. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? / G. Trinchieri // J. Exp.Med.– 2010.– V. 207.– P. 2053-2063.
5. Респираторные вирусы и бактерии, антитела и цитокины у больных с фенотипом «бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких» / Т. П. Оспельникова, О. В. Морозова, Е. И. Исаева и др. // Пульмонология.– 2014.– V. 5.– С. 46-51.

INTERFERONS OF TYPES I, II, III AND ANTIVIRAL PROTEIN MXA IN BLOOD AND NASOPHARYNGEAL SWABS OF PATIENTS WITH ACUTE RESPERATORY VIRAL INFECTIONS

Ospelnikova T. P.[1], Morozova O. V.[1,2], Isaeva E.I. [1], Andreeva S. A.[1], Ershov F. I.[1]

1Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology of N. F. Gamaleya of the Russian Ministry of Health; [2]Federal Research Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, Russia

Analysis of gene expression of interferons (IFN) α, β, g, l and antiviral protein MXA in blood and nasopharyngeal swabs of patients infected with influenza viruses and adenoviruses by means of reverse transcription with subsequent real time PCR showed differences for IFNα in lymphocytes of patients and control healthy persons in the absence of RNA in swabs. In contrast, IFNg RNA was revealed in half of swabs in the absence in blood. High levels of IFNl and MXA RNA in samples of patients with acute respiratory viral infections during acute period did not inhibit the virus reproduction at the early stages.

Keywords: acute respiratory viral infections; interferons of types I, II, III; MXA protein; reverse transcription with real time PCR.

ВИРУСЫ И ЦИТОКИНЫ У ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Оспельникова Т. П.[1], Морозова О. В.[2], Исаева Е. И.[2], Ветрова Е. Н.[2], Лизогуб Н. В.[3], Смирнова М. Ю.[3], Осипова Г. Л.[3], Чучалин А. Г.[3], Ершов Ф. И.[1]

[1]ФГБУ «ФНИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России; [2]ФГБУ «ФНИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздрава России; [3]ФГУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, Москва, Россия

Респираторные вирусы (риновирус, респираторно-синцитиальный вирус, аденовирус, вирусы гриппа А и В, вирусы парагриппа типа 1 и 3) выявлены в большинстве образцов мокроты, сывороток и лимфоцитов крови больных БА. Индукция провоспалительных цитокинов респираторными вирусами, дефицит противовоспалительных цитокинов и дисбаланс интерферонов могут вызывать аллергическое воспаление.

Ключевые слова: бронхиальная астма, респираторные вирусы, интерфероны I, II, III типа, МхА белок, обратная транскрипция с ПЦР в реальном времени.

Введение. Бронхиальная астма (БА) является многофакторным заболеванием с аллергическим воспалением, гиперреактивностью бронхов, гипертрофией, гиперплазией и сокращениями гладкой мускулатуры, гиперсекрецией слизи в бронхах, активацией тучных клеток, эозинофилов, лимфоцитов, эпителиальных клеток, макрофагов, разрушением эпителия бронхов и образованием свободных радикалов оксида азота и 8-изопростана [1].

Симптомы БА могут усиливаться под влиянием вирусных инфекций, аллергенов, курения, физических нагрузок и стресса [1, 2]. БА зарегистрирована у 4-10 % населения в мире; в России – у 5 % взрослых и 9 % детей [3]. При БА повышенные уровни интерлейкинов Th2 пути (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13) индуцируют секрецию IgE и активацию эозинофилов [4].

Цель: анализ про- и противовоспалительных цитокинов у больных БА.

Материалы и методы. Анализ респираторных вирусов и цитокинов проведён для 3 групп больных БА: 1) 19 госпитализированных больных (41,4±3,8 лет) с обострением БА; 2) 28 амбулаторных больных с фенотипом БА-ХОБЛ вне фазы обострения (57,2±10,5 лет); 3) 22 больных детей 4-6 лет с обострениями БА. Для определения РНК риновирусов, респираторно-синцитиального (РС) вируса, метапневмовируса, вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов, коронавирусов видов OC43, E229, NL63, HKUI, ДНК аденовирусов групп B, C и E и бокавируса проводили обратную транскрипцию с ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием набора «ОРВИ-АмплиСенс» (“АмплиСенс”, Москва). Количественное определение РНК и белков цитокинов, а также определение IFN статуса культуральным методом проводили в соответствии с [5].

Результаты и обсуждение. Респираторные вирусы (риновирус, РС вирус, аденовирус, вирусы гриппа A (H1N1 и H3N2) и B, вирусы парагриппа типа 1 и 3) выявлены: в 73,7 % парных сывороток и в 36,8 % соскобов слизистой носоглотки взрослых больных БА в обострении, в 35,8 % образцов индуцированной мокроты больных с фенотипом БА-ХОБЛ и в 54,6 % образцов лимфоцитов крови детей с БА. Из них риновирусы детектировали в 28,6 % образцов мокроты взрослых и в 36,4 % образцов лимфоцитов крови детей. Аденовирусы определяли в 26,3 % соскобов носоглотки больных с обострением БА и в 15,8 % сывороток, а в образцах мокроты больных БА-ХОБЛ – только в единичных случаях. РНК вируса гриппа A (H3N2) в обнаружена в 10,5 % соскобов. При исследовании парных сывороток методом ИФА выявили сероконверсию специфических IgG, направленных к вирусу гриппа A (H3N2, H1N1) в 26,3 % и B в 10,5 %, РС вирусу (15,8 %), парагриппу 1 в 15,8 % и парагриппу 3 в 15,8 %. Следует отметить, что у 7 из 19 больных с обострениями БА респираторные вирусы выявлены в форме смешанной инфекции.

Провоспалительные цитокины IL8, IFNγ и IL1β выявлены во всех исследованных образцах мокроты (медианы 1276, 138 и 91 пг/мл, соответственно); в меньших количествах выявлены IL4, IL6, IFNα, TNFα и TGFβ в 11-44 % образцов. В 81,8 % образцов крови детей выявлены IFN α, γ и IL4 с концентрациями, значительно превышающими физиологические значения. Соотношение средних концентраций IFNγ и IL4 у взрослых (1,9) и детей (1,3) с БА также свидетельствовало о сдвиге баланса в сторону провоспалительных цитокинов. Дисбаланс РНК IFN I-III типов при отсутствии экспрессии гена IFNβ, детекции РНК IFNα в 58,3 % образцов и РНК IFNλ в 42,9 % образцов наряду с низким уровнем экспрессии гена противовирусного белка MXA показаны для образцов мокроты больных БА-ХОБЛ. Выявлено снижение функциональной активности IFNα/γ в крови больных БА по сравнению с контрольной группой здоровых добровольцев. Низкие уровни экспрессии гена MX1, индуцируемого IFN I типа и кодирующего противовирусный белок MXA, также могут свидетельствовать об интерфероновой недостаточности.

Вывод. Нарушение баланса в системе цитокинов со сдвигом в сторону повышения уровня провоспалительных цитокинов, дефицит противовоспалительных цитокинов и дисбаланс интерферонов могут вызывать длительное аллергическое воспаление.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamid Q., Tulic M. Immunology of asthma / Q. Hamid, M. Tulic // Annu. Rev. Physiol.– 2009.– V. 71.– P. 489-507.
2. Kumar R. K., Foster P. S., Rosenberg H. F. Respiratory viral infection, epithelial cytokines, and innate lymphoid cells in asthma exacerbations / R. K. Kumar, P. S. Foster, H. F. Rosenberg // J. Leukoc. Biol.– 2014.– V. 96 (3).– P. 391-396.
3. Чучалин А. Г. (ред.) Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA) / А. Г. Чучалин.– Москва: Атмосфера, 2007.
4. Barnes P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease / P. J. Barnes // J. Clin. Invest.– 2008.– V. 118 (11).– P. 3546-3556.
5. Респираторные вирусы и бактерии, антитела и цитокины у больных с фенотипом «бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких» / Т. П. Оспельникова, О. В. Морозова, Е. И. Исаева и др. // Пульмонология.– 2014.– V.5.– С. 46-51.

VIRUSES AND CYTOKINES IN ADULTS AND CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA

Ospelnikova T. P.[1], Morozova O. V.[2], Isaeva E. I.[2], Vetrova E. N.[2], Lyzogub N. V.[3], Smirnova M. Yu.[3], Osipova G. L.[3], Chuchalin A. G.[3], Ershov F. I.[1]

[1]Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology of N. F. Gamaleya of the Russian Ministry of Health; [2]Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology of N. F. Gamaleya of the Russian Ministry of Healt, D. I. Ivanovskyi Institute of Virology Moscow; [3]Federal Research Institute of Pulmonology of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

Respiratory viruses (human rhinovirus, respiratory syncytial virus, adenovirus, influenza A and B viruses, parainfluenza virus 1 and 3) were revealed in majority of samples of sputum, blood sera and lymphocytes of patients with BA. Induction of proinflammatory cytokines with respiratory viruses, deficit of anti-inflammatory cytokines and the IFN imbalance can cause allergic inflammation.

Keywords: bronchial asthma, respiratory viruses, interferons of I, II, III type, MxA protein, reverse transcription with real time PCR.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПЕРСИСТЕНЦИИ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Зотова М. А., Орнер И. Ю., Никушкина К. В., Батурина И. Л., Емельянов И. В., Никонова Т. И.

ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия

Для изучения влияния количества ДНК ВПЧ на механизмы иммунного ответа был проведен анализ взаимосвязей между уровнем вирусной нагрузки ВПЧ высокого риска и показателями местного иммунитета у женщин с транзиторной и персистирующей генитальной папилломавирусной инфекцией. Установлено наличие существенных различий в состоянии локальной иммунной системы женщин в зависимости от дозы антигена, что доказывает участие этого молекулярно-биологического маркера в иммунологических процессах, определяющих течение и исход ПВИ.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, папилломавирусная инфекция, цитокины, вирусная нагрузка.

Актуальность. Главный принцип функционирования иммунной системы, выработанный в ходе длительной эволюции, состоит в многообразии факторов иммунной защиты, действующих в синергизме или антагонизме друг с другом, обеспечивая два противоположных, но приемлемых исхода взаимоотношений с инфекционным агентом – его элиминацию или персистенцию. Активация и вовлечение в процесс различных механизмов иммунного ответа зависит не только от степени патогенности возбудителя, но и от его количества, оказывающее опосредованное влияние на исход инфекционного процесса [3]. Доказано, что длительное носительство онкогенных типов вируса папилломы человека (ВПЧ) многократно повышает риск онкогенной трансформации [2], что делает актуальным выявление факторов, имеющих прямое или опосредованное отношение к формированию и длительности персистенции вируса.

Цель. Для установления влияния количества ДНК ВПЧ на механизмы иммунного ответа провести анализ взаимосвязей между уровнем вирусной нагрузки ВПЧ высокого риска (ВПЧ ВР) и показателями местного иммунитета у женщин с генитальной папилломавирусной инфекцией.

Методы. Обследовано 152 ВПЧ-позитивные женщины, которые ретроспективно были

разделены на 3 группы: I группа – 68 пациенток с отрицательными результатами ВПЧ-тестирования через 6 и 12 месяцев после первичного выявления ВПЧ ВР (транзиторное течение ПВИ), II группа – 32 женщины с персистирующим течением ПВИ, у которых вирус выявлялся только через 6 месяцев после первичного обследования и не выявлялся через 12 (персистирующее течение ПВИ длительностью 6 месяцев), III группа – 52 женщины с положительным ВПЧ-тестом через 6 и 12 месяцев после первичного обследования (персистирующее течение ПВИ длительностью 12 месяцев).

Для количественного определения ДНК ВПЧ ВР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в цервикальных соскобах методом RT-ПЦР использовали набор реагентов «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, г. Москва). Результаты концентраций ДНК ВПЧ ВР выражались в lg (ВПЧ×10^5 клеток человека) и трактовались следующим образом: менее 3 lg – малозначимая, от 3 до 5 lg – значимая, более 5 lg – повышенная вирусная нагрузка.

Для оценки иммунологических показателей исследовалась цервикальная слизь. Было определено общее количество лейкоцитов, абсолютное и относительное содержание жизнеспособных клеток, фагоцитарная и лизосомальная активности нейтрофилов, кислородзависимый метаболизм и функциональный резерв нейтрофилов в НСТ-тесте (1). Определение уровней цитокинов (ИЛ 1 β, РАИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО-α, ИФ-α, ИФ-γ) проводилось на тест-системах ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург), концентрации IgA, IgM, IgG и sIgA – ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) и ООО «Хема» (г. Москва) методом ИФА.

Для установления взаимосвязей между вирусной нагрузкой и иммунологическими показателями цервикальной слизи был проведен корреляционный анализ по Спирмену (Statistica 6.0.). Во всех случаях различия, связи и зависимости считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты. Средняя концентрация вируса в I группе была 3,26±0,32 lg ВПЧ×10^5 клеток, во II группе – 5,64±0,22 lg ВПЧ×10^5 клеток, что достоверно выше, чем в группе с транзиторным течением ПВИ. В III группе средняя концентрация вирусной ДНК составляла 4,28±0,33 lg ВПЧ ×10^5 клеток, что достоверно выше относительно группы с транзиторным течением ПВИ, но ниже по сравнению с персистирующим течением ПВИ длительностью 6 месяцев.

Было выявлено, что в I группе вирусная нагрузка коррелировала с sIg A и ИФ-γ. В свою очередь, по результатам корреляционного анализа иммунологических показателей мы установили, что sIg A и ИФ-γ связаны с уровнем ФНО-α, что свидетельствует о вовлеченности вирусной нагрузки в работу иммунных механизмов.

Во II группе установлены положительные связи между вирусной нагрузкой и активностью индуцированного НСТ-теста нейтрофилов, ИЛ-2, ИФ-γ и Ig M и отрицательные связи – с лизосомальной активностью нейтрофилов, общим количеством лейкоцитов и абсолютным содержанием жизнеспособных нейтрофилов. В свою очередь, ИЛ-2 и Ig M коррелировали с уровнем ИЛ-1β, а ИФ-γ был связан с РАИЛ-1 и ИЛ-10. Интересно обратить внимание на взаимосвязь вирусной нагрузки с ИФ-γ, которая была отрицательной в группе с транзиторным течением ПВИ и стала положительной при персистирующем течении ПВИ длительностью 6 месяцев. ИФ-γ, обладая прямой противовирусной активностью и являясь важнейшим иммунорегулятором, усиливает синтез HLA-антигенов клетками, что приводит к ускорению процессов распознавания и переработки антигенов, активирует другие клетки иммунной системы, участвующие в элиминации патогена. Это позволяет сделать вывод об адекватной реакции иммунной системы в ответ на увеличение антигенной нагрузки у женщин II группы. Учитывая, что вирусная нагрузка в этой группе была выше порога прогрессии (более 5 lg), увеличение количества взаимосвязей отражает напряженность и согласованную работу факторов местного иммунитета в ответ на массивную антигенную атаку, что, в итоге, обуславливает элиминацию вируса, но в течение более длительного времени.

В III группе установлено снижение количества взаимосвязей до одной с исчезновением связей, характерных для транзиторного и персистирующего течения ПВИ длительностью 6 месяцев, и появлением новой положительной взаимосвязи между вирусной нагрузкой и Ig A. Обращает на себя внимание тот факт, что влияние вирусной нагрузки на иммунологические показатели ограничивалось корреляциями с Ig A и ИЛ-4 (через Ig A). Это отражает практически полное отсутствие активации

факторов местного иммунитета на выявленную в данной группе женщин дозу антигена и препятствует удалению вируса, поддерживая хроническое течение ПВИ.

Таким образом, корреляционный анализ взаимосвязей между уровнем вирусной нагрузки ВПЧ ВР и иммунологическими показателями цервикальной слизи показал наличие существенных различий в состоянии локальной иммунной системы женщин в зависимости от дозы антигена, что доказывает участие этого молекулярно-биологического маркера в иммунологических процессах, определяющих течение и исход ПВИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Савочкина А. Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И. И. Долгушин, Ю. С. Андреева, А. Ю. Савочкина.– М.: Изд-во РАМН, 2009.– 208 с.
2. Evaluation of type-specific HPV persistence and high-risk HPV viral load quantitation in HPV positive women under 30 with normal cervical cytology / X. Carcopino, N. Bolger, M. Henry et al. // J. Med. Virol.– 2011.– Vol. 83, № 4.– P. 637-643.
3. Antibodies to merkel cell polyomavirus correlate to presence of viral DNA in the skin / H. Faust, D. V. Pastrana, C. B. Buck et al. // J. Infect. Dis.– 2011.– Vol. 203, № 8.– P. 1096-1100.

STUDY IMMUNOLOGICAL MECHANISMS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS PERSISTENCE

Zotova M. A., Orner I. Y., Nikushkina K. V., Baturina I. L., Emelyanov I. V., Nikinova T. I.

South Ural state medical University, Chelyabinsk, Russia

To study the effect of the quantity of HPV DNA in the immune response mechanisms the relationship between the level of viral load of high-risk HPV and indicators of local immunity in women with transient and persistent genital HPV infection were analyzed. We revealed the presence significant differences in the state of the local immune system of women depending on the dose of antigen that shows participation of the molecular biomarker in immunological processes that determines the course and outcome of HPV-infection.

Keywords: human papillomavirus, HPV-infection, cytokines, viral load.

ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОГО КАНДИДОЗА И МУКОЗАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Шабашова Н. В., Данилова Е. Ю., Учеваткина А. Е., Филиппова Л. В., Фролова Е. В.

НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Изучены особенности развития орофарингеального кандидоза (ОФК) у больных гемобластозами. Выявлена избыточная колонизация ротовой полости *Candida alb.* у всех больных по сравнению со здоровыми. Наряду с общеизвестными факторами риска, развитие ОФК может зависеть от индивидуальной склонности мукозального иммунитета к развитию избыточного немедленного и раннего индуцибельного иммунных ответов и воспаления, сопровождающегося существенным повреждением барьера слизистой оболочки и ее кандидацидных свойств на фоне химиотерапии, супрессирующей регуляторные свойства Т-клеток.

Ключевые слова: орофарингеальный кандидоз, мукозальный иммунитет, цитокины.

Актуальность. Сложная экосистема ротовой полости образована многослойным плоским эпителием, ротовой жидкостью (РЖ) и сообществом микроорганизмов (МО) [1]. Среди обилия видов МО этого локуса заслуживают внимания грибы-комменсалы *Candida albicans*(C.a.), способные при дефектах иммунной защиты вызывать орофарингеальный кандидоз (ОФК) [1, 2]. По данным немногочисленных публикаций распространенность ОФК среди гематологических и онкологических пациентов, получивших химиотерапию (ПХТ) и/или лучевую терапию достигает лишь 9,6 %, несмотря на очевидные дефекты иммунореактивности [2, 3]. Причины такой избирательности грибкового осложнения у больных гемобластозами не установлены.

Цель исследования: определить факторы риска и состояние мукозального иммунитета при ОФК у больных гемобластозами.

Материалы и методы. Провели собственные клинические наблюдения за 430 больными гемобластозами. Из них у 137 исследовали РЖ, в том числе, у 51 больного с выявленным ОФК. Группы сравнения были представлены 11 пациентами, у которых ОФК развился на фоне других иммунодефицитных состояний, и 33 здоровыми людьми с санированной ротовой полостью. Группы больных были сопоставимы по возрасту (старше 34 лет) и полу. Здоровые люди были в возрасте от 26 до 31 года. Содержание *C.a.*(КОЕ) определяли в стандартном количестве нестимулированной РЖ, которую сеяли на 4 %-й агар Сабуро и инкубировали при 37 °С 24 часа. Высокой микробной нагрузкой считали содержание грибов свыше 500 КОЕ/мл. В РЖ твердофазным ИФА определяли уровни IFN-γ, IL-17, IL-8, IL-6, TNF-α, G-CSF, IL-10, моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), β-дефензина 2 (DEFb2), секреторного лейкоцитарного протеазного ингибитора (SLPI) («Цитокин» и «Вектор-Бест», Россия, «Cloud-CloneCorp.» и «R&D», США). Кандидацидное действие РЖ определяли на проточном лазерном цитометре при двойном окрашивании грибов флюорохромом ФИТЦ. Результаты обрабатывали статистически (STATISTICA for Windows, версия 6.0). Достоверными считали различия при $p<0,05$.

Результаты. Клинический анализ свидетельствовал, что ОФК развивался преимущественно при лимфозависимых заболеваниях: неходжкинской лимфоме (29 %), остром миелоидном лейкозе (21 %), плазмоклеточной миеломе (21 %), лимфогранулематозе (20 %). Другие виды гемобластозов осложнялись ОФК редко (8 %). Но и в группе без ОФК 47 % также составляли больные неходжкинской лимфомой и 9 % – лимфомой Ходжкина. 12 % пациентов поступили в стационар с признаками ОФК до начала лечения. В 88 % случаев ОФК развивался после применения ПХТ: на фоне 1 курса ПХТ – в 29 %, после 2-го и более курсов ПХТ – в 59 % случаев. Хотя больные с осложнением получали ПХТ по различным протоколам (Hyper-CVAD+R, R-CHOP, BEACOPP, 7+3 и пр.), не выявили достоверной зависимости от вида ПХТ. В группе с развитием ОФК чаще встречались пациенты в возрасте старше 65 лет, с сахарным диабетом, получавшие антибактериальную и глюкокортикоидную терапию. Но лишь использование антибактериальной терапии достоверно увеличивало ($p<0.05$) вероятность развития ОФК.

У всех больных гемобластозами, независимо от вида заболевания, развития или отсутствия ОФК, выявлен избыточный рост грибов *C.a.* по сравнению со здоровыми ($p<0,05$), что свидетельствует о нарушении микробиоценоза, но слабом значении уровня местной обсемененности грибами в патогенезе осложнения. В РЖ у всех больных гемобластозами, по сравнению со здоровыми людьми был увеличен уровень DEFb2($p<0,05$), что указывает на активацию эпителиальных клеток – участников немедленного ответа. Установлено, что при развитии ОФК также возрастала продукция SLPI, IL-6, IL8, цитокина хронического воспаления и хемоаттрактанта для нейтрофилов, и MCP-1, привлекающего клетки моноцитарно-макрофагального ряда, по сравнению со здоровыми ($p<0,05$) и гематологическими пациентами без ОФК ($p<0,05$). что подтверждает как выраженную активность участия эпителиоцитов, так и других клеток врожденного иммунитета в ответе на грибы, хотя и не предотвращающую их размножение и инвазивное действие. При этом у всех больных гемобластозами кандидацидная активность РЖ мало отличалась от здоровых людей. Вне зависимости от наличия или отсутствия ОФК у больных гемобластозами уровни IL17, считающегося ключевым цитокином ранней индуцибельной защиты от грибов, не отличались от здоровых. Установлена тенденция к снижению спонтанного синтеза

IFNγ и IL10, основных регуляторов всех видов адекватной защиты против грибов. Эти изменения указывают на чрезмерную активацию местного немедленного и раннего иммунных ответов, неконтролируемое воспаление, которое сопровождается выраженным локальным повреждением барьерной ткани [2, 4] и отсутствием повышения ее кандидацидной способности. При ОФК у негематологических больных, наоборот, отмечена тенденция к увеличению уровня IFN-γ и кандидацидной активности РЖ, что указывает на различия в патогенезе микоза у пациентов этих двух групп.

Выводы.

1. ОФК чаще развивался при лимфозависимых гемобластозах и после курсов полихимиотерапии, хотя не выявлено достоверной зависимости его развития от вида и схем полихимиотерапии. Применение антибактериальной терапии достоверно увеличивало частоту ОФК.

2. У больных гемобластозами на фоне полихимиотерапии существенным фактором риска развития ОФК может быть индивидуальная особенность мукозального иммунитета: избыточность немедленного и раннего индуцибельного иммунного ответов и воспаления, сопровождающегося существенным повреждением барьера слизистой оболочки и ее кандидацидных свойств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salvatory O., Puri S., Tati S. Innate Immunity and Saliva in Candida albicans mediated Oral Diseases / O. Salvatory, S. Puri, S. Tati. // Dent Res.– 2016.– T.95, № 4.– P. 365-371.
2. Особенности местной защиты онкогематологических больных при орофарингеальном кандидозе / Е. Ю. Данилова, Н. В. Шабашова, Е. В. Фролова и др. // Иммунопатология, аллергология, инфектология.– 2015.– № 3.– С. 31-39.
3. Gligorov J., Bastit L., Gervais H. Prevalence and treatment of oropharyngeal candidiasis in cancer patients: results of the French Candidoscope study» / J. Gligorov, L. Bastit, H. Gervais. // Int J Radiat Oncol Biol Phys.– 2011.– T. 80, № 2.– P. 532-539.
4. Naglik J. R., Moyes D. L., Wächtler B. Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity / J. R. Naglik, D. L. Moyes, B. Wächtler // Microbes and Infection.– 2011.– T. 13, № 12-13.– С. 963-976.

RISK FACTORS FOR DEVELOPING OROPHARYNGEAL CANDIDIASIS AND MUCOSAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

Shabashova N. V., Danilova E. Y., Uchevatkina A. E., Filippova L. V., Frolova E. V.

North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov (Kashkin Research Institute of Medical Mycology), Saint-Petersburg, Russia

Properties of the development of oropharyngeal candidiasis (OPC) in patients with hematological malignancies have been studied. Excessive *Candida* colonization of oral in all hematological patients compared with healthy people was revealed. Apart from well-known risk factors, the development of OPC can depend on the individual propensity to develop of mucosal immunity excess inducible immediate and early immune responses and inflammation accompanied with significant damage to the mucosal barrier and their candidacidal properties on the background chemotherapy with suppression of regulatory T cells functions.

Keywords: oropharyngeal candidiasis, mucosal immunity, cytokines.

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ ПРОКАЛЬЦИТОНИНА И КОЛИЧЕСТВА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК У СЕПТИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Долгушин И. И., Савочкина А. Ю., Торопова Л. Р., Островский С. И., Четвернина Е. А.

ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия

В работе представлены данные о взаимосвязи уровня прокальцитонина (ПКТ) и количества нейтрофильных внеклеточных ловушек у септических больных. Установлено, что существует взаимосвязь между уровнем прокальцитонина и внеклеточных сетей. А имеено, при повышении уровня ПКТ, происходит увеличение количества нейтрофильных ловушек.

Ключевые слова: сепсис, прокальцитонин, нейтрофильные внеклеточные ловушки.

Актуальность проблемы сепсиса в современной медицине по-прежнему остается неоспоримой. Несмотря на возросшие возможности интенсивной терапии, летальность составляет от 16 % у пациентов с сепсисом и до 60 % у пациентов с септическим шоком [2]. В настоящее время существует ряд лабораторных исследований для диагностики сепсиса, среди которых прокальцитонин (ПКТ) в наибольшей степени отвечает всем современным требованиям: воспроизводимость, стабильность, быстрота. Данный тест в течение многих лет применяется в российской практике, за это время накоплен положительный опыт его использования для принятия важных диагностических решений [3]. Также у септических больных регистрируется лейкоцитоз. Большую часть лейкоцитов составляют нейтрофилы, у которых был обнаружен новый механизм защиты [1]. Ранее нами было установлено, что у септических больных наблюдается тенденция к увеличению нейтрофильных внеклеточных ловушек [4].

Вышеизложенное определило **цель данной работы:** установить взаимосвязь между увеличением уровня прокальцитонина и количества нейтрофильных внеклеточных ловушек периферической крови у септических больных.

Материалы и методы. Были исследованы образцы крови 27 пациентов (13 женщин, 14 мужчин, в возрасте 28-82 лет) больных сепсисом. Забор крови у больных проводили после постановки соответствующего диагноза. Лабораторные исследования начинали проводить не позднее 30 мин после забора крови. В периферической крови проводили подсчет нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) (окраска мазков по Романовскому-Гимзе, Г. Гимза, 1904 г.) и определяли уровень прокальцитонина.

Все полученные данные были подвергнуты статистической обработке (SPSS).

Результаты. Проведенное исследование позволило установить, что существует взаимосвязь между уровнем прокальцитонина и количеством нейтрофильных внеклеточных ловушек. При повышении уровня ПКТ у септических больных также регистрировалось повышение количества внеклеточных сетей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neutrophil extracelllulartraps kill bacteria/ V. Brinkmann, U. Rechard, C. Goosmann et al. // Sciense.– 2004.– Vol. 303.– P. 1532-1535.
2. Хамидуллина Г. Ф., Габбасова А. А., Стяжкина С. Н. Сепсис в акушерско-гинекологической практике / Г. Ф. Хамидуллина, А. А. Габбасова, С. Н. Стяжкина // Наука, техника и образование.– 2015.– № 3(9).– С. 66.
3. Диагностическая значимость прокальцитонинового теста при сепсисе / И. Л. Миронов, Д. Н. Барсукова, Л. И. Ратникова и др. // Известия высших учебных заведений. Уральский регион.– 2014.– № 3.– С. 128-131.
4. Оценка функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных с сепсисом на первые сутки после постановки диагноза/ И. И. Долгушин, Л. Р. Торопова, А. Ю. Савочкина и др. // Рос. иммунол. журнал.– 2015.– Т. 9(18).– № 2(2).– С. 22-23.

THE RELATIONSHIP OF LEVEL PROKALTSITONIN AND NUMBER NEUTROPHILIC EXTRACELLULAR TRAPS IN PATIENT WITH SEPSIS

Dolgushin I. I., Savochkina A. Y., Toropova L. R., Ostrovskii S. I., Chetvernina E. A.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

In work present date on the relationship of level prokaltsitonin (PKT) and number neutrophilic extracellular traps in septic patient. Were determined that there is a correlation between the level of prokaltsitonin and extracellular networks. Namely, with increasing levels of PCT, is an increase in neutrophil number of traps.

Keywords: sepsis, prokaltsitonin, neutrophilic extracellular traps.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ С СЕПСИСОМ С БЛАГОПРИЯТНЫМ ИСХОДОМ

Савочкина А. Ю., Торопова Л. Р., Долгушин И. И., Абрамовских О. С.

ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия

В исследовании оценивали функциональную активность нейтрофилов у септических больных с благоприятным исходом. У пациентов установлено повышение всех показателей функциональной активности нейтрофилов в первые сутки после постановки диагноза. Установлено, что в динамике при улучшении клинического состояния, данные показатели снижаются.

Ключевые слова: нейтрофилы, сепсис, нейтрофильные внеклеточные ловушки.

Актуальность. Сепсис был и продолжает оставаться наиболее частой причиной летальных исходов в отделениях реанимации и интенсивной терапии [1]. За последние 50 лет частота сепсиса в большинстве стран мира возросла более чем в 10 раз и согласно прогнозам, заболеваемость сепсисом будет ежегодно увеличиваться и достигнет к 2020 году более 1110000 случаев в год [2]. Кроме того, актуальность сепсиса вызвана высокими экономическими потерями, обусловленными сложным диагностическим поиском и дорогостоящим лечением [3]. Ранняя диагностика сепсиса в большинстве случаев затруднена по тем причинам, что многие из его клинических проявлений малоспецифичны. Один из главных путей решения данной проблемы связан с поиском новых методов ранней и точной диагностики сепсиса. Изучение эффекторных механизмов врожденного иммунитета, которые активизируются немедленно после инфицирования организма, может стать весьма эффективным для ранней диагностики сепсиса, его мониторинга и прогнозирования благоприятных и неблагоприятных исходов.

Цель исследования – оценить функциональную активность нейтрофилов периферической крови у больных с сепсисом с благоприятным исходом в динамике.

Материалы и методы. Были исследованы образцы крови 27 пациентов (13 женщин, 14 мужчин, в возрасте 28-82 лет) больных сепсисом с благоприятным исходом. Забор крови у больных проводили после постановки соответствующего диагноза. Лабораторные исследования начинали проводить не позднее

30 мин после забора крови. В периферической крови проводили подсчет лейкоцитарной формулы, оценивали функциональную активность нейтрофилов: фагоцитарную активность по методу Фрейдлин (Фрейдлин И. С., 1984), лизосомальную активность (исследование интенсивности люминесценции лизосом в цитоплазме фагоцитов, окрашенных акридиновым оранжевым), оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов (постановку НСТ-теста осуществляли в модификации А. Н. Маянского и М.К Виксмана 1979 г.), подсчет нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) (окраска мазков по Романовскому – Гимзе, Г. Гимза, 1904г).

Все полученные данные были подвергнуты статистической обработке (SPSS).

Результаты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в первые сутки у больных с благоприятным исходом сепсиса регистрируется повышение показателей функциональной активности нейтрофилов: повышение лизосомальной активности, фагоцитарной активности, внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, а также максимальный уровень внеклеточных ловушек. В динамике при улучшении клинического состояния вышеперечисленные показатели снижаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хамидуллина Г. Ф., Габбасова А. А., Стяжкина С. Н. Сепсис в акушерско-гинекологической практике / Г. Ф. Хамидуллина, А. А. Габбасова, С. Н. Стяжкина // Наука, техника и образование.– 2015.– № 3(9).– С. 66.
2. Карсанов А. М., Маскин С. С., Карсанова З. О. Сепсис: современная парадигма / А. М. Карсанов, С. С. Маскин, З. О. Карсанова // Вестник экспериментальной и клинической хирургии.– 2015.– Т. VII: 3.– С. 301-309.
3. Савельев В. С., Гельфанд Б. Р. Сепсис. Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение: Практическое пособие / В. С. Савельев, Б. Р. Гельфанд // М.: Мед. информ. агенство.– 2010.– С. 352.

DYNAMICS OF CHANGES FUNCTIONAL PARAMETERS OF NEUTROPHILS IN SEPTIC PATIENTS WITH A FAROBLE OUTCOME

Savochkina A. Y., Toropova L. R., Dolgushin I. I., Abramovskihk O. S.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

The study evaluated the functional activity of neutrophils in septic patients with a faroble outcome. In patient with sepsis there were determined increase in all parameters functional activity of neutrophils in first day of diagnostics sepsis. It was established that in the dynamics with improved clinical status, these parameters are falling.

Keywords: neutrophils, sepsis, neutrophilic extracellular traps.

ОБЩЕГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И УРОВЕНЬ TLR4 НА МОНОЦИТАХ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ КАК ПРЕДИКТОРЫ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ГИСТЕРОСКОПИИ

Михайловская М.В., Селихова М.С., Ираклионова Н.С., Белан Э.Б., Панина А.А.

ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», Волгоград, Россия

Изучена возможность использования относительного уровня экспрессии TLR-4 на лейкоцитах периферической крови и общегематологических показателей в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений гистероскопии. Показано, что недостаточно активное участие клеточных элементов иммунной системы в разрешении воспалительного процесса, а также сниженная способность эритроцитов по обеспечению оксигенации организма в послеоперационный период ведут к развитию инфекционно-воспалительных осложнений после гистероскопиии

Ключевые слова: гистероскопия, послеоперационный период, врождённый иммунитет.

Гистероскопия (ГС) в современной медицине приобрела широкое распространение для диагностики и лечения гинекологических заболеваний. Вместе с тем, это малоинвазивное хирургическое вмешательство имеет риск инфекционно-воспалительных осложнений (ИВО), частота которых, по данным мировой литературы, составляет 0,7-12 % [1].

Известно, что послеоперационное, воспаление является нормальным защитным механизмом и направлено на отграничение очага повреждения. Вместе с тем, иммунокомпрометация, а также возможное участие микробной флоры, могут нарушать физиологическое течение воспаления и создавать предпосылки для инфекционно-воспалительных процессов. Важное место в индукции противобактериальной защиты отводится врожденному иммунитету, в частности, паттерн-распознающим рецепторам. В частности, уровень экспрессии TLR4 может коррелировать с тяжестью процесса, и в ряде случаев позволяет рассматривать его в качестве предиктора посттравматических ИВО [2, 3].

Цель исследования: поиск ранних предикторов ИВО ГС.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена в дизайне когортного проспективного исследования, в которое включены 196 женщин в возрасте от 19 до 43 лет (средний возраст 29,4±6,47 лет), поступивших для выполнения ГС в ГУЗ КБСМП № 7 г. Волгограда.

Всем женщинам в течение 1 суток после ГС выполнено общегематологическое исследование (анализатор ACT 5DIFF (BeckmanCoulter, США)) и определен уровень экспрессии TLR4 на моноцитах периферической крови (проточная цитофлюориметрия; FACScan (Becton Dickinson, США)), данные которых анализировались дифференцированно в зависимости от наличия ИВО в течение 1 месяца.

Результаты и обсуждение. В течение 1 месяца после ГС ИВО были диагностированы у 6,1 %(12/196) женщин, в том числе у 3,6 % (7/196) развился эндометрит, у 2,6 % (5/196) – сальпингоофорит.

Наличие ИВО после ГС у пациенток ассоциировалось с достоверно более низким (хотя и в физиологических пределах) количеством эритроцитов (соответственно, 4,1± 0,56×10^{12} кл/л *vs* 4,5±0,46×10^{12} кл/л, p=0,008), а риск ИВО имел место при значениях < 4,3×10^{12} кл/л (RR 6,75 [95 % CI 1,3; 54,4]). Также риск ИВО после ГС у пациенток возникал при среднем содержании гемоглобина в эритроците менее 24,1 пг (RR 14,67 [95 %CI 1,11; 402,27])

(22,9±2,12 пг *vs* 26,2±1,44 пг, p=0,001). Средний объём эритроцита, ассоциирующийся с риском ИВО, составил менее 77 фл (RR 31,3 [95 % CI 2,5; 513,2]) (соответственно, 74,7±5,13 фл *vs* 85,1±4,25 фл, p=0,0002).

При оценке относительного риска развития осложнений в зависимости от количества лейкоцитов в периферической крови, его достоверные значения (RR=6,4 (95 % CI [2,6; 714]) показаны для уровня > $6,7\times10^9$ кл/л (в том числе, при нормальном количестве лейкоцитов).

К 5-кратному возрастанию риска осложнений вело снижение абсолютного количества моноцитов менее $0,41\times10^9$ кл/л (RR 5,29 [95 % CI 1,36; 20,68]; более высокие значения, в том числе превышающие физиологические, ассоциировались с отсутствием риска.

Для нейтрофилов с риском ИВО ассоциировались значения абсолютного количества палочкоядерных <$0,34\times10^9$ кл/л (RR=13,5 (95 % CI [13,2; 102,7]) относительного количества сегментоядерных >64 %, (RR=1,98 (95 % CI [1,016;10,4]).

Дополнительную информацию может дать определения факторов неспецифического иммунитета [3]. Анализ риска ИВО от уровня экспрессии TLR 4 на поверхности моноцитов показал, что при его уровне ниже 7 % осложнения отсутствовали в 100 % случаев, в пределах 7-8 % ассоциировались со сниженным риском развития осложнений (соответственно RR=0,31; 95 % CI [0,09;0,61] и RR=0,34; 95 % CI [0,11;0,72]), а при уровне 9 % имело место его резкое возрастание (RR=2,8; 95 % CI [0,86;13,9]), в том числе, при значениях, превышающих 9 %, осложнения развивались во всех случаях. По всей видимости, существуют причины (генетические факторы, инфекция и др.), приводящие к существенной стимуляции экспрессии TLR4 (выше 8 %), которая, вероятно, является следствием имеющейся микробной стимуляции, но отражает процесс на ранних этапах до развития клинических проявлений ИВО. Другой возможной причиной может быть полиморфизм генов рецептора, приводящий к усилению их экспрессии при нарушенной функции.

Выводы. У женщин с нормальными показателями общего анализа крови в течение 1 суток после ГС сохраняется риск ИВО в течение 1 месяца, для определения которого требуется количественная оценка всех показателей. Дополнительную информацию может дать определения факторов неспецифического иммунитета, в частности, экспрессии TLR4 на моноцитах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савельева Г. М., Бреусенко В. Г., Каппушева Л. М. Гистероскопия: атлас и руководство / Г. М. Савельева, В. Г. Бреусенко, Л. М. Каппушева.– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013.– 248 с.
2. Li L., Kang J., Lei W. Role of Toll-like receptor 4 in inflammation-induced preterm delivery. / L. Li, J. Kang, W. Lei // Mol. Hum. Reprod.– 2010 – V.16 (4) – P. 267-272.
3. Селихова М. С. Роль эндотоксемии и механизмов врождённого иммунитета в патогенезе неразвивающейся беременности. / Селихова М. С. и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.– 2012.– № 1. С. 18-20.
4. Белан Э. Б. Уровень IL-8 в сыворотке крови как маркер течения воспалительного процесса у больных с гинекологической патологией / Э. Б. Белан // Цитокины и воспаление.– 2011.– Т. 10, № 3.– С. 55-60.

HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND TLR 4 LEVEL AT MONOCYTES IN EARLY POSTOPERATIVE PERIOD AS PREDICATOR OF INFECTIOUS AND INFLAMMATORY COMPLICATIONS OF HYSTEROSKOPY

Mikhaylovskaya M. V., Selikhova M. S., Iraklionova N. S., Belan E. B., Panina A. A.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Possibility of use the relative level of expression of TLR-4 in peripheral blood leukocytes and hematologic indicators as predictors of infectious and inflammatory complications after hysteroscopy is studied. It is shown that insufficiently active participation of immune system cellular elements in permission of inflammatory process, and also the reduced ability of erythrocytes on ensuring oxygenation of an organism during the postoperative period conduct to development of infectious and inflammatory complications after hysteroscopy.

Keywords: hysteroscopy, postoperative period, innate immunity.

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ДЕТЕЙ С ОТЯГОЩЕННЫМ ГЕРПЕС-ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ ПРЕМОРБИДНЫМ ФОНОМ

Бабик Р. К.

Южно-Уральский государственный медуниверситет, Челябинск, Россия

Исследование иммунного статуса проведено у 238 пациентов, инфицированных герпесвирусами простого типа (ВПГ) и цитомегаловирусами (ЦМВ). В сопоставимых группах сравнения латентных и манифестных форм этих инфекций наблюдалась супрессорная направленность иммунных сдвигов. Значимо снижены показатели $CD8^+$ лимфоцитов у герпес-инфицированных детей и $CD34^+$ лимфоцитов у больных цитомегаловирусной инфекцией. При генерализованных формах уменьшение числа $CD20^+$ лимфоцитов указывало на нарушенную активацию гуморального звена иммунитета, выявлены дефекты и фагоцитарной функции.

Ключевые слова: иммунитет, дети, герпес.

Актуальность. Патогенами, способными к длительной персистенции, наиболее часто являются вирусы простого герпеса I-II типов (ВПГ I-II) и цитомегаловирусы (ЦМВ). Атипичный характер клинических проявлений герпес-вирусных инфекций при перинатальном заражении нередко затрудняет выявление заболеваний, потому и последствия инфицирования для будущего здоровья детей явно недооцениваются [1,2].

Цель. Определение иммунологических аспектов герпес-вирусных инфекций для выявления групп риска по неблагоприятному течению и развитию осложнений.

Материалы и методы. Когортное проспективное динамическое исследование проведено у 238 пациентов, инфицированных герпес-вирусами ВПГ и ЦМВ этиологии. Выбор когорты проводили в стационаре МБУЗ ДГКБ № 8 г. Челябинска из популяции новорожденных и детей первых трех месяцев жизни по разработанному алгоритму выявления внутриутробных герпетических инфекций, в котором учитывали клинико-лабораторные данные и анамнестические сведения. Дети рассматривались как инфицированные герпес-вирусами при наличии маркеров ДНК ЦМВ и/или ВПГ в крови и/или моче и низкоавидных специфических антител IgG (индекс авидности менее 40 %). Подсчет общего числа лейкоцитов, абсолютного и относительного количества гранулоцитов, моноцитов, лимфоцитов и их субпопуляций в крови проведен методом проточной цитометрии на лазерных проточных цитометрах Epics™ XL™ и Cytomics FC (Beckam Coulter, США). Для выявления поверхностных маркеров (антигенов) клеток использовали моноклональные антитела, имеющие соответствующую направленность и специфичность. Используя методы количественного определения субпопуляций лимфоцитов в периферической крови, проведено CD-типирование.

Результаты. У детей с генерализованными, тяжелыми формами герпетических инфекций (ВПГ-этиологии) отличительными иммунологическими признаками явились: при относительных лимфопении снижение количества $CD3^+$ и $CD4^+$ лимфоцитов; повышение в периферическом кровотоке числа ранних предшественников Т- и В-лимфоцитов, незрелых Т-лимфоцитов, числа клеток, экспрессирующих рецепторы $CD25^+$; повышение экспрессии HLA-DR антигена и снижение $CD11b^+$.

У детей с латентными формами герпетических инфекций (ВПГ-этиологии) отмечено снижение в периферическом кровотоке Т- и В-лимфоцитов с маркерами $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, числа клеток, экспрессирующих рецепторы ($CD11b^+$, $CD16^+$). Проявилось изменение процессов презентации антигена (повышение экспрессии HLA-DR антигена) и снижение числа клеток с маркерами апоптоза ($CD95^+$).

В группах детей с генерализованными формами ВПГ – инфекций уменьшение числа зрелых

В-лимфоцитов ($CD20^+$) указывало на нарушенную активацию гуморального звена иммунитета. Кроме того, были низкими компоненты комплемента С1, С3 при повышении значений показателя СН50. Уменьшение числа зрелых В-лимфоцитов ($CD20^+$) выявлено и при латентных формах ВПГ-инфекций. У детей с латентными формами ВПГ-инфекции реакция системы комплемента проявилась статистически значимым снижением среднего значения показателя С3 и повышением С4 и С5. В то время как, у детей с манифестацией ВПГ: дефекты компонентов комплемента проявились в тенденции к снижению их значений, в частности, С1 и С3. У пациентов с генерализованными герпес-вирусными инфекциями об изменениях в фагоцитарном звене можно судить на основании показателей, выражающихся в повышении исходного уровня активации и низком функциональном резерве НСТ-теста нейтрофилов – на фоне относительных лимфопении и выраженного моноцитоза.

Иммунологический статус детей с ЦМВ-инфекцией характеризовался снижением числа зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$), и снижением количества $CD34^+$. Не отмечено повышение в периферическом кровотоке числа ранних предшественников Т- и В-лимфоцитов, незрелых Т-лимфоцитов, числа клеток, экспрессирующих рецепторы $CD25^+$, что указывало на отсутствие ранней активации клеточного иммунитета. Не проявилось повышение экспрессии HLA-DR антигена. В иммунном статусе детей, инфицированных ЦМВ, но без клинических проявлений, отмечено значительное снижение числа маркеров естественных киллеров ($CD16^+$), снижение числа зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD4^+$), понижение числа клеток с маркером апоптоза ($CD95^+$).

Дефекты гуморального звена у детей с манифестными формами ЦМВ-инфекции проявились статистически значимым снижением средних значений показателей системы комплемента С1 и С3. У детей, инфицированных ЦМВ, изменения в гуморальном звене отмечены снижением Ig G, дефектами системы комплемента – статистически значимым снижением компонентов комлемента, таких как: С1, С2, С3. В результате исследования гуморального звена не выявлено изменения количественного значения В-лимфоцитов. Кроме того, не отмечено изменение показателей ЦИК, СН50.

Нарушение фагоцитарной функции выявлено при снижении нейтрофилов, НСТ-теста у больных цитомегаловирусной инфекцией. В иммунном статусе детей, инфицированных ЦМВ, но без клинических проявлений отмечено увеличение доли моноцитов, дефекты фагоцитарного звена при снижении нейтрофилов, статистически достоверное повышение фагоцитоза нейтрофилов, их НСТ спонтантанной активности, низкое значение фагоцитарного числа и индекса НСТ-тест нейтрофилов.

Таким образом, в ходе проведенных исследований были получены данные, свидетельствующие о том, что герпетические инфекции у детей сопровождаются изменениями показателей клеточного, гуморального и врожденного иммунитета, направленность и выраженность которых неблагоприятны в развитии осложнений инфекционного процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боковой А. Г., Егоров А. И. Герпесвирусные инфекции у детей и родителей / А. Г. Боковой, А. И. Егоров – М.: Центр стратегической конъюнктуры,– 2014.– 256 с.
2. Хаитов Р. М., Атауллаханов Р. И. Иммунология / Р. М. Хаитов, Р. И. Атауллаханов. // Иммунотерапия: Руководство для врачей.– М., ГЭОТАР Медиа,– 2012.– 672 с.

INDICATORS OF IMMUNE STATUS OF CHILDREN WITH A HISTORY OF HERPES VIRAL INFECTIONS PREMORBID BACKGROUND

Babik R. K.

South Ural state medical University, Chelyabinsk, Russia

The study of immune status was performed in 238 patients infected with the herpes simple viruses type (HSV) and cytomegaloviruses (CMV). In comparable groups comparison of latent and manifest forms of these infections was observed suppressor direction of immune shifts. Significantly reduced rates of $CD8^+$ lymphocytes in herpes-infected children and $CD34^+$ lymphocytes in patients with cytomegalovirus infection. In the generalized form, the decrease in the number of $CD20^+$ lymphocytes indicated impaired activation of humoral immunity revealed defects and phagocytic function.

Keywords: immunity, child, herpes.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ТЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ

Бабик Р. К.[1], Бабик Т. М.[2]

[1]Южно-Уральский государственный медицинский университет;
[2]УРАЛГУФК, Челябинск, Россия

Ротавирусная инфекция у детей, протекавшая благоприятно, была сопряжена статистически значимым повышением в крови цитокинов: ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-8, ИФН-α, ИФН-γ и РАИЛ. У пациентов с неблагоприятным течением и исходом ротавирусной инфекции концентрации ИЛ-1β, ИЛ-8, ИЛ-4, ФНО-α, ИФН-α и РАИЛ не имели статистических различий от средних величин этих показателей в группе здоровых детей. У этих пациентов отмечен дефицит ИЛ-1α.

Ключевые слова: иммунитет, дети, вирусы, кишечные, инфекции.

Актуальность. Вопросы выявления вирусных кишечных инфекций (ОКИ) являются актуальными в современной медицине не только в связи с распространенностью, но и особенностями клинического течения и частоты неблагоприятных исходов заболеваний у детей [1]. Остаются во многом не исследованными клинико-иммунологические особенности вирусных кишечных инфекций у детей, в том числе и прогностические критерии тяжести [2, 3].

Цель. Оценить иммунологические параметры у детей благоприятного и неблагоприятного течения и исходов вирусных кишечных инфекций.

Пациенты и методы. С целью прогнозирования неблагоприятного течения вирусных кишечных инфекций, выявления влияющих факторов, помимо оценки острых клинических проявлений болезни, проведено катамнестическое наблюдение 265 детей г. Челябинска – ретроспективный анализ амбулаторных карт, выписных эпикризов и их осмотр через год после перенесенной вирусной ОКИ. Клинико-анамнестические данные в каждой группе, сформированной в зависимости от тяжести, исходов заболевания, сопоставлены с изменениями в иммунном статусе, показателями уровня цитокинов.

Подсчет общего числа лейкоцитов, абсолютного и относительного количества гранулоцитов, моноцитов, лимфоцитов и их субпопуляций в крови проведен методом проточной цитометрии на лазерных проточных цитометрах Epics™ XL™ и Cytomics FC (Beckam Coulter, США). Для исследования цитокинов (IL-1α, IL – 1β, IL-8, TNF-α, RAIL-1 и IL-4, IFN–α, IFN-γ, RAIL) были использованы соответствующие тест-системы для иммуноферментного анализа, произведенные ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург), методом ИФА на приборе «Personal Lab» (Италия). Для оценки состояния иммунной системы у наблюдаемых детей исследованы цитокины, представляющие белки, вырабатываемые активированными клетками иммунной системы: провоспалительные цитокины: ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНО-α и антивоспалительные медиаторы – РАИЛ-1; интерфероны.

Результаты. Статистически значимые снижение показателей абсолютных гранулоцитов, преимущественно, за счет уменьшения содержания сегментоядерных нейтрофилов, и повышение количества моноцитов относительно данных аналогичных показателей контрольной группы отмечено при благоприятном течение и исходе. Существенные нарушения показателей респираторного взрыва нейтрофилов крови, прежде всего, активности НСТ-теста отмечались при неблагоприятном течении инфекции. В то же время, не проявилось статистически достоверное увеличение лизосомальной активности нейтрофилов, в отличие от повышенных результатов этого показателя у пациентов при ротавирусной инфекции с благоприятным исходом.

Проведен анализ изменения показателей иммунофенотипирования лимфоцитов у детей с благоприятным и неблагоприятными исходами ротавирусной инфекции у детей.

Содержание $CD3^+$ Т-лимфоцитов было достоверно ниже в обеих группах больных ро-

тавирусной ОКИ детей в отличие от здоровых лиц. Количество $CD8^+$ Т-лимфоцитов, также со статистической разницей, было меньше у пациентов обеих групп, чем в контрольной группе. Известно, что уменьшение количества лимфоцитов является одним из проявлений иммунореактивности. Реализация механизмов естественной биологической программы апоптоза и ее интенсификации, непосредственное воздействие повреждающего фактора, приводит, как правило, к изменению количества клеток, обеспечивающих иммунореактивность, прежде всего субпопуляций Т-лимфоцитов. Несмотря на статистически незначимые однонаправленные изменения, с тенденцией к уменьшению, $CD16^+$, $CD56^+$, достоверное снижение CD11b не исключало дефицит NK-клеток у детей с ротавирусной инфекцией. Маркерный спектр дефицита NK клеток отмечен у детей с неблагоприятным течением ротавирусной инфекции. В то же время не отмечено у пациентов с благоприятным течением изменений значений маркеров ранней ($CD25^+$) и поздней (HLA-DR) активации Т-клеток.

В результате исследования гуморального звена не выявлено изменения количественного значения В-лимфоцитов, однако отмечена тенденция к понижению ЦИК и достоверное понижение С1 компонентов комплемента у детей с благоприятным течением и исходом. У детей с неблагоприятным исходом было зарегистрировано уменьшение числа зрелых В-лимфоцитов ($CD20^+$) указывало на нарушенную активацию гуморального звена иммунитета, кроме того снижение С50, С1, С3 компонентов комплемента.

Ротавирусная инфекция у детей, протекавшая благоприятно, была сопряжена статистически значимым повышением в крови цитокинов: ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-8, ИФН-α, ИФН-γ и РАИЛ. У пациентов с неблагоприятным течением ротавирусной и исходом концентрации ИЛ-1β, ИЛ-8, ИЛ-4, ФНО-α, ИФН-α и РАИЛ не имели статистических различий от средних величин этих показателей в группе здоровых детей. У этих пациентов отмечен дефицит ИЛ-1а. Повышение ИФН-γ в периферической крови детей с негладким течением ротавирусной инфекции не проявилось столь существенно, как у пациентов с благоприятным исходом.

Таким образом, у обследованных детей с острыми проявлениями вирусной ОКИ отмечен изначально слабый врожденный иммунный ответ. Однако активное участие провоспалительных цитокинов способствовало формированию адаптивного иммунитета при кратковременности клинического течения ОКИ с благоприятным течением и исходом. Статистически значимое повышение содержания TNF-α и IL-1α в сыворотке крови у больных свидетельствовало о важной роли указанных цитокинов в реализации механизмов противовирусной защиты. Динамика цитокинов: снижение концентрации противовоспалительного IL-4 и повышение уровня IL-8, при низких значениях провоспалительных IFN-γ, IL-1α, IL-1β,– характерна для тяжелых форм вирусных кишечных инфекций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ротавирусная инфекция у детей: современные аспекты диагностики и лечения / В. А. Анохин, С. В. Халлиулина, О. И. Биккинина и др.// Педиатрия.– 2009.– № 39.– С. 41-45.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А. С. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев – СПб.: Фолиант.– 2008.– 552 с.
3. Караулов А.В., Калюжин О. В. Иммунотропные препараты: принципы применения и клиническая эффективность / А. В. Караулов, О. В. Калюжин.– М.: МЦФЭР.– 2007.– 144 с.

IMMUNOLOGICAL CRITERIA FOR ADVERSE COURSE AND OUTCOMES OF VIRAL INTESTINAL INFECTIONS IN CHILDREN

Babik R. K.[1], Babik T. M.[2]

[1]South Ural state medical University; [2]Ural state University of physical culture, Chelyabinsk, Russia

Rotavirus infection in children, proceeded favorably, was associated in a statistically significant increase in blood cytokines: IL-1α, IL-1β, IL-8, IFN-α, IFN-γ and RAIL. In patients with adverse course and outcome of rotavirus infection the concentration of IL-1β, IL-8, IL-4, TNF-α, IFN-α and RAIL had no statistical differences from the average values of these indicators in the group of healthy children. In these patients, the marked deficiency of IL-1α.

Keywords: immunity, children, virus, intestinal, infection.

РАЗРАБОТКА СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К КОРИ И КРАСНУХЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ

Смердова М. А., Мамаева Т. А., Наумова М. А., Топтыгина А. П.

ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Работа посвящена созданию и апробации отечественных контрольных препаратов в лабораториях, проводящих ИФА-исследования на наличие антител класса G и M к вирусам кори и краснухи. Показано, что созданные контрольные образцы пригодны для использования в клинико-диагностических лабораториях. О стабильности ВЛК IgM к вирусу кори свидетельствует коэффициент вариации (CV) результатов (8,9 %), полученных 10-ю лабораториями.

Ключевые слова: корь, краснуха, ИФА, внутрилабораторный контроль

Корь – вирусное инфекционное заболевание, опасное тяжелыми осложнениями вплоть до смертельных исходов. Краснуха – менее тяжелое заболевание, однако весьма опасна для беременных из-за развития синдрома врожденной краснухи, приводящего к внутриутробной гибели плода или формированию пороков развития [1].

В рамках программы ВОЗ «Здоровье для всех в XXI веке» в 2002 году была разработана программа элиминации кори в Российской Федерации. Для реализации программы на базе Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского создан национальный научно-методический центр (ННМЦ) по надзору за корью с референс-лабораторией, за которой закреплены 10 региональных лабораторий Госсанэпиднадзора [2].

Достижение элиминации кори и краснухи диктует новые требования к оценке качества лабораторных исследований и достоверности полученных результатов. Существующие методологические подходы не в полной мере позволяют решать ряд актуальных проблем в надзоре за этими инфекциями. Методы контроля исследований являются частью системы обеспечения качества, отражающей адекватность функционирования всей работы диагностических лабораторий [3, 4]. Актуальность работы определяется отсутствием отечественных разработок по контролю качества исследований на корь/краснуху; необходимостью получения достоверных результатов, позволяющих оптимизировать мероприятия по контролю элиминации этих инфекций и прогнозировать заболеваемость на основе оценки популяционного иммунитета.

Цель работы. Отработка биотехнологических платформ для создания партий контрольных препаратов и их использования с учетом региональных показателей заболеваемости коревой и краснушной инфекций.

Материалы и методы. Всего было разработано и получено 9 типов контрольных препаратов: 5 наборов для проведения внутреннего лабораторного контроля (ВЛК), оценки сходимости и воспроизводимости результатов исследований по выявлению IgM и IgG к вирусам кори и краснухи *in vitro* и 4 панели сывороток, приготовленных для внешнего контроля качества ИФА-исследований (оценки правильности), проводимых лабораториями.

Все контрольные образцы изготовлены на основе стабилизированной (с помощью смеси сахарозы (до 5 %) и консерванта ProClin-3000) инактивированной прогреванием (56 °С в течение 1 часа) сыворотки крови человека; не содержат HBs- и p24 HIV-1-антигена и антител

к HCV, T. Pallidum, HIV-1,2, лиофильно высушены. Восстановленные образцы хранятся при температуре +2 до +8 °С в течение 14 дней или температуре (–20±2)°С в течение 3 месяцев.

Апробация контрольных материалов ВЛК к вирусам кори и краснухи была проведена с помощью ИФА референс-лабораторией ВОЗ по надзору за корью и краснухой (Москва) с использованием тест-систем российских фирм производителей (ЗАО «Вектор-Бест», ЗАО «Эколаб») и тест-систем фирмы Siemens (Германия). Подбор рабочих разведений контрольных препаратов осуществляли путем двукратного разведения (с 1:2 до 1:64) с помощью отрицательной донорской сыворотки (ОДС).

Результаты и обсуждение. Аттестацию ВЛК IgM к вирусу кори для тест-системы «ВектоКорь-IgM» (ЗАО «Вектор-Бест») проводили согласно «ГОСТ РИСО 5725-5-2002[5]. В результате экспериментальных исследований было определено среднее значение оптической плотности (ОП), которое составило 1,3±0,15.

Апробация ВЛК IgM к вирусу кори была проведена в 10 лабораториях, выполняющих исследования по диагностике кори/краснухи. В условиях каждой лаборатории были проведены исследования ВЛК IgM к вирусу кори на тест-системе «ВектоКорь IgM» (ЗАО «Вектор-Бест») по сходимости результатов. Полученные данные были близки к аттестованному значению измеряемой величины (ОП=1,3). Об отсутствии существенных различий по результатам измерений свидетельствует и показатель коэффициента вариации (CV) результатов между лабораториями, который составил 8,9 %.

Полученные данные свидетельствуют о возможности создания ВЛК и его использования для контроля качества исследований, проводимых лабораториями по кори и краснухи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Постовит В. А. Детские капельные инфекции у взрослых / В. А. Постовит – СПб.: Теза, 1997.– С. 90-156.
2. Национальная лабораторная сеть Российской Федерации по диагностике кори и ее роль в выполнении программы ВОЗ по ликвидации кори. / Т. А. Мамаева, Н. Т. Тихонова, М. А. Наумова и др. // Здоровье населения и среда обитания.– 2007.– Т. 11 (176).– С. 4-7.
3. Identification of Performance Problems in a Commercial Human Immunodeficiency Virus Type 1 Enzyme Immunoassay by Multiuser External Quality Control Monitoring and Real-Time Data Analysis / J. Kim, C. Swantee, B. Lee, H. Gunning, A. Chow et al. // J. Clin. Microbiol.– 2009.– V. 47 (10).– P. 3114-3120.
4. ГОСТ РИСО 15189-2006 «Национальный стандарт Российской федерации». Москва, введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2006 г. N 348-ст.
5. «ГОСТ РИСО 5725-5-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» часть 1. Москва: Госстандарт России.– 2002.– С. 2-3.

INTERNAL VERIFICATION STANDARD DEVELOPMENT FOR INTERNAL QUALITY CONTROL USING IN MEASLES AND RUBELLA SPECIFIC ANTIBODIES EVALUATION BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Smerdova M. A., Mamaeva T. A., Naumova M. A., Toptygina A. P.

G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

The work describes development and testing of control samples produced by domestic research laboratories engaged in detection of IgG and IgM antibodies to measles and rubella viruses. The resulting control samples are fit for use in clinical diagnostics laboratories. Stability of internal quality control for IgM antibody to measles virus is demonstrated by 8,9 % variation coefficient of results obtained by 10 laboratories.

Keywords: measles, rubella, ELSA, internal quality control.

АНАЛИЗ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ МЫШЕЙ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫМ ВИРУСОМ

Ветрова Е. Н., Морозова О. В., Исаева Е. И.

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почётного академика Н. Ф. Гамалеи Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздрава РФ»; Москва, Россия

Экспериментальная модель инфекции респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ) с определением инфекционных титров и вирусных геномных РНК в лёгких, тимусе, селезёнке и мононуклеарных клетках крови мышей в динамике позволила выявить максимальные значения в лёгких и крови через 5 суток после заражения. Анализ экспрессии генов ключевых цитокинов посредством обратной транскрипции с последующей ПЦР показал индукцию генов интерферона (IFN) γ, фактора некроза опухолей TNFα и интерлейкина (IL) 12 Т-хэлперного пути 1 типа при ингибировании противовоспалительных интерлейкинов IL4 и IL10.

Ключевые слова: респираторно-синцитиальный вирус; мыши; обратная транскрипция с ПЦР; интерферон гамма; интерлейкины.

Введение. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является повсеместно распространённым возбудителем острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) [1], особенно среди детей, из которых до 60 % инфицированы в течение первого года жизни, пожилых людей и лиц с иммунодефицитами [1]. Активация врождённой резистентности при инфекции РСВ подавляется быстрее, чем при других ОРВИ, вследствие чего возможно заражение РСВ несколько раз. Репликация этого РНК-содержащего парамиксовируса преимущественно в нижних дыхательных путях сопровождается развитием бронхитов, бронхиолитов и пневмоний у 2-3 % инфицированных людей и может приводить к бронхиальной астме [2]. Развитие молекулярно-генетических методов дифференциальной детекции РСВ и экспериментальные модели с использованием пермиссивных культур клеток и восприимчивых лабораторных животных стимулируют поиск специфических терапевтических препаратов [2-3].

Цель: анализ экспрессии генов цитокинов мышей при экспериментальной инфекции РСВ.

Материалы и методы. Штамм № 2733 РСВ типа А, выделенный из носоглоточного смыва больного в Москве в 2012 г., из Государственной Коллекции Вирусов ФНИЦЭМ им. Гамалеи Минздрава РФ (номер доступа в GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) KP713401) культивировали в культуре клеток эпителия рака гортани человека HEp-2. После адаптации РСВ к лёгким мышей в течение 3 пассажей 40 самцов мышей BALB/c массой 12-14 г инфицировали интраназально 5,0 lg $TCID_{50}$ РСВ. Контрольной группе из 20 мышей вводили PBS буфер. Инфекционные титры РСВ в органах и тканях мышей определяли в культуре клеток. РНК РСВ детектировали посредством обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием набора «hRSV-FL» («АмплиСенс», Москва) в образцах легких, селезёнки, тимуса и мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) инфицированных мышей через 3, 5 и 7 суток после заражения. Анализ экспрессии 6 генов цитокинов IFNγ, TNFα, IL4, IL6, IL10 и IL12 проводили посредством ОТ-ПЦР. Количество геном-эквивалентов рассчитывали с использованием формулы Лукьянова-Матца $N=2^{(40-n)}$, где N – число молекул ДНК в начале амплификации, n – количество циклов ПЦР.

Результаты. Молекулярно-генетический анализ изолятов РСВ у больных ОРВИ в Москве показал циркуляцию типов А и В с доминированием последнего в 2016 г. Структура гена нуклеопротеина N РСВ стабильна на протяжении последних 30 лет, что обусловлено полифункциональностью кодируемого белка и летальными мутантными вариантами [1].

После интраназального заражения мышей штаммом 2733 инфекционные титры РСВ достигали максимальных значений 5,0±0,5 lg $TCID_{50}$ через 5 суток, затем снижались до 4,60±0,6 lg $TCID_{50}$ через 7 суток и 1,3±0,6 lg $TCID_{50}$ через 9 суток. По данным ОТ-ПЦР-РВ наибольшие вирусные нагрузки составляли $4,5*10^4$ геном-эквивалентов в МПК, выделенных из 1 мл крови; $3,7*10^4$ копий вирусной РНК на 1 г лёгких через 5 суток и постепенно снижались до единичных вирионов к 9 суткам после инфицирования при минимальных значениях для образцов селезёнки инфицированных мышей в течение всего периода наблюдений. Гистологический анализ показал обширные очаги некроза в легких мышей, инфицированных РСВ, после 5 суток инфекции. Уменьшение веса у экспериментальных животных составляло в среднем 20 % по сравнению с интактными животными без летальных исходов.

Динамика экспрессии генов цитокинов предшествовала развитию инфекции РСВ с максимумами через 3 и 5 суток инфекции, соответственно. Анализ частот детекции и уровней экспрессии генов ключевых цитокинов показал индукцию цитокинов Т-хэлперного пути 1 типа (Th1) преимущественно клеточного иммунного ответа: IFNγ (100 % образцов МПК, 60 % образцов тимуса, 29 % образцов селезёнки при отсутствии РНК в лёгких инфицированных мышей); IL12 (во всех исследованных образцах МПК, тимуса, селезёнки и лёгких мышей) и фактора некроза опухолей (tumor necrosis factor (TNF)) α (100 % МПК, 90 % тимусов, 86 % селезёнок, 33 % лёгких). Повышенные уровни экспрессии генов IFNγ и TNFα могут вызывать гиперреактивность бронхов и бронхообструкции.

При этом выявлено ингибирование цитокинов Th2 пути: IL4, 6, 10. Для последнего регуляторного цитокина IL10 обнаружено полное ингибирование в лёгких и селезёнке инфицированных РСВ мышей через 7 суток после заражения. Помимо дисбаланса с преобладанием провоспалительных цитокинов у инфицированных животных отмечено повышенное в 3 раза содержание эозинофилов, что может обуславливать развитие гиперреактивности бронхов и легочную эозинофилию. В МПК относительное количество Т-хэлперов $CD4^+$ при развитии инфекции РСВ уменьшалось, а цитотоксических лимфоцитов $CD8^+$ увеличивалось по сравнению с показателями в группе интактных мышей, что может вызывать повреждения респираторного эпителия [2-3].

Вывод. При модельной экспериментальной инфекции РСВ обнаружены индукция провоспалительных цитокинов IFNγ, IL12 и TNFα и дефицит противовоспалительных интерлейкинов IL4 и IL10.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walsh E., Falsey A.R. Respiratory syncytial virus infection in adult populations / E.E. Walsh, A.R. Falsey // Infect Disord Drug Targets.– 2012.– V. 12 (2).– P. 98-102.
2. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice / H.S. Jafri, S. Chavez-Bueno, A. Mejias et al. // J. Infect.– 2004.– V. 189 (10).– P. 1856-1865.
3. Role of interferon gamma in the pathogenesis of primary respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice / S.M. Schaik, N. Obot, G. Enhorning et al. // J. Med. Virol.– 2000.– V. 62 (2).– P. 257-266.

ANALYSIS OF CYTOKINES IN EXPERIMENTAL INFECTION OF MICE WTH RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

Vetrova E.N., Morozova O.V., Isaeva E.I.

Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology of N.F. Gamaleya of the Russian Ministry of Health, D.I. Ivanovskyi Institute of Virology, Moscow, Russia

Experimental model infection with the respiratory syncytial virus (RSV) with detection of its infectious titers and the viral genomic RNA in lungs, thymus, spleen and blood mononuclear cells of mice in dynamics allowed us to reveal maximal values in lungs and blood in 5 days postinfection. Gene expression analysis of key cytokines using reverse transcription with subsequent PCR showed induction of interferon (IFN) γ, tumor necrosis factor (TNF) α and interleukin (IL) 12 RNA transcription of T-helper 1 response and inhibition of anti-inflammatory IL4 and IL10.

Keywords: respiratory syncytial virus; mouse model; reverse transcription with subsequent PCR; interferon γ; interleukins.

РЕЦИДИВИРУЮЩИЙ РИНОФАРИНГИТ У ДЕТЕЙ: НЕКОТОРЫЕ ЭТИОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ОПТИМИЗАЦИИ ТЕРАПИИ

Белан Э. Б., Садчикова Т. Л., Желтова А. А., Панина А. А., Садчикова А. И.

ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Волгоград, Россия

Для детей 3-летнего возраста с рецидивирующим назофарингитом, обусловленным вирусом Эпштейна-Барр, изучены особенности клеточного и гуморального иммунитета. Также показано, что включение в терапевтический комплекс изопринозина пранобекса приводит к сокращению количества обращений за медицинской помощью по поводу рецидивирующего ринофарингита на протяжении последующих 12 месяцев с 7,4±1,19 до 3,5±1,18 (p<0,001).

Ключевые слова: рецидвирующий ринофарингит; вирус Эпштейн-Барр; инозин пранобекс; дети.

Рецидивирующий ринофарингит (РРФ) (МКБ-10: J 31.1) представляет одну из распространённых причин отнесения детей к категории часто и длительно болеющих.

Одной из частых его причин в раннем возрасте является вирус Эпштейн-Барр (*Herpesviridae: Gammaherpervirinae*; ВЭБ) [1]. Возможности своевременной этиотропной терапии ВЭБ-инфекции в настоящее время затруднены [2], поэтому для лечения таких больных в настоящее время рассматриваются иммунотропные препараты [3, 4, 5] и неспецифические противовирусные [2].

Материалы и методы. В исследование включены дети (n=71) в возрасте 3-х лет, имевших не менее 6 эпизодов РРФ за предшествующий год, и направленных на консультацию врача аллерголога-иммунолога. Все дети до включения в исследование консультированы врачом-оториноларингологом, по показаниям – другими специалистами. В исследование не включались пациенты, имевшие другую патологию дыхательных путей и ЛОР-органов; острые и хронические воспалительные заболевания другой локализации или получавшие иммунотропные лекарственные препараты.

Всем детям помимо общеклинических исследований проведено: бактериологическое исследование и определение ДНК вирусов герпеса 1, 2, 4 (ВЭБ), 5 и 6 типов в материале из зева и носа (ПЦР; «АмплиСенс», ЗАО «ИнтерЛаб-Сервис», Россия); антитела к данным вирусам сыворотке в крови (ИФА; ЗАО «Вектор-Бест», Россия); анализ субпопуляционного состава клеток иммунной системы (проточном цитофлюориметр Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США) с использованием ФИТЦ-МКА (Caltag laboratories, Канада); определение сывороточного уровня IgA, IgM, IgG и содержание IgM и IgG к ВЭБ (ИФА; «Вектор-Бест», Россия).

Серопозитивные по ВЭБ дети, у которых в зеве определялась вирусная ДНК, получали в составе комплексной терапии инозин пранобекс в суточной дозе 0,05 г/кг/сут (два 10-дневных курса с интервалом 8 дней); другие иммунотропные и противовирусные средства в терапевтический комплекс не включались. Ретроспективно (по данным медицинской документации) оценивалось количество обращений за медицинской помощью по поводу респираторных инфекций за предшествующий год. Обращения в течение последующих 12 месяцев мониторировались проспективно.

Результаты и их обсуждение. Полученные данные свидетельствуют об измененной иммунологической реактивности детей с ВЭБ-ассоциированным РРФ, что должно учитываться при проведении терапевтических и реабилитационных мероприятий. Так, они имели более высокое количество лейкоцитов в периферической крови (соответственно, 11054±2874,50 и 9442±2944,5 кл/мкл, (p=0,038)) преимущественно за счет кратного увеличение абсолютного и относительного

количества лимфоцитов по сравнению с группой контроля (соответственно, 66,2±9,0 % и 53,8±7,5 %, (p=0,045)), что согласуется с существующими представлениями о патогенезе ВЭБ-индуцированных заболеваний.

Не наблюдалось достоверных отличий со стороны $CD3^+$- и $CD4^+$- лимфоцитов, однако имело место увеличение абсолютного количества $CD8^+$-клеток (соответственно, 1547,0±777,33 и 1058,8±502,87 кл/мкл, (p=0,027)). В совокупности с увеличением как абсолютного (соответственно, 1285,7±361,25 и 552,1±125,25 кл/мкл, (p=0,009)), так и относительного количества $CD16^+$ лимфоцитов (соответственно, 13,50±1,02 и 8,90±6,64 %, (p=0,045)), данные изменения, по всей видимости, носят характер активации противовирусной защиты.

Изменения со стороны гуморального звена иммунитета касались как количества В-лимфоцитов, так и уровня продуцируемых иммуноглобулинов. Известно, что ВЭБ является В-лимфоцитотропным вирусом, который вызывает активацию и пролиферацию пораженной клетки вплоть до ее опухолевой трансформации. У пациентов исследуемой группы имело место увеличение количества $CD22^+$ лимфоцитов в 1,7 раза по отношению к группе сравнения (соответственно, 1005,1±247,25 и 603,9±167,4 л/мкл, (p=0,027)).

Выявленные изменения сочетались с активацией гуморального ответа, что проявлялось более высоким уровнем IgM (соответственно 1,6±0,82 и 0,9±0,38 г/л, (p=0,0008)) и IgA (соответственно, 0,63±0,23 и 0,45±0,22 г/л, (p=0,03)), но не IgG (соответственно, 7,1±2,04 и 6,6±2,18 г/л (p=0,51)). Данный факт требует более подробного изучения влияния ВЭБ на В-лимфоциты и их функциональную активность.

Включение в терапевтический комплекс инозина пранобекса привело к нормализации основных показателей иммунного статуса за исключением общего и относительного количества лимфоцитов, которое оставалось повышенным, однако достоверно более низким по сравнению с исходным (p<0,05).

Анализ заболеваемости респираторными инфекциями в течение последующих 12 месяцев показал, что включение в терапевтический комплекс инозина пранобекса у детей с ВЭБ-ассоциированным РРФ приводит к сокращению числа обращений за медицинской помощью по поводу респираторных инфекций. В целом, количество таких обращений сократилось с 7,4±1,19 до 3,5±1,18 (p<0,001).

Выводы: дети с ВЭБ-индуцированным РРФ имеют изменённую иммунологическую реактивность. Включение инозина пранобекса в терапевтический комплекс у таких больных приводит к сокращению числа респираторных инфекций в течение последующего года.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jenson H. B. Epstein-Barr Virus / H. B. Jenson // Pediatrics in Review.– 2011, № . 32.– P. 375-385.
2. Петров В.И., Белан Э. Б. Противовирусные средства / В. И. Петров, Э. Б. Белан // М.: ГЭОТАР-Медиа.– 2012.– 224 с.
3. Novel anti-infectives: is host defence the answer? / P. Hamil, K. Brown, H. Jenssen // Current Opinion in Biotechnology – 2008.– № .19.– P. 628-636.
4. Чернышов В. Н., Сависько А. А., Лебеденко А. А. Новые возможности профилактики обострений бронхиальной астмы у детей при развитии острой респираторной инфекции / В. Н. Чернышов, А. А. Сависько, А. А. Лебеденко // Вопросы современной педиатрии.– 2010.– Т. 9. № 2.– С. 54-57.
5. Оптимизация фармакотерапии у детей с острой Эпштейна-Барр вирусной инфекцией / Е. Б. Касымова, О. А. Башкина, Х. М. Галимзянов и др. / // Экспериментальная и клиническая фармакология.– 2014.– Т. 77. № 1.– С. 26-29.

RECURRENT RHINOPHARYNGITIS IN CHILDREN: SOME ETIOPATHGENETIC PECULIARITIES AND OPTIMIZATION OF THE TREATMENT

Belan E. B., Sadchikova T. L., Panina A. A., Zheltova A. A., Sadchikova A. I.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Peculiarities of cell and humoral immunity in toddlers suffering from recurrent Epstein-Barr virus(EBV) – associated rhinopharyngytis (RRP) have been studied. Also it have been shown that treatment of EBV-associated RRP with isoprinosine pranobex results in the decrease of the visits to a doctor from 7,4±1,19 to 3,5±1,18 (p<0,001) during subsequent year.

Keywords: recurrent rhinopharyngitis; Epstein-Barr virus; inosine pranobex; children.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ НАРУШЕНИЙ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Уразова О. И., Новицкий В. В., Есимова И. Е., Хасанова Р. Р., Филинюк О. В.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

У 98 больных туберкулезом легких (ТЛ) изучены молекулярные факторы нарушения взаимодействия и дисфункции миелоидных дендритных клеток (мДК) и Т-лимфоцитов. Показано, что к ним относятся дефицит на мДК поверхностных молекул TLR2 и CD86, а также генетически детерминированное снижение секреции мДК цитокинов – IL-27 и IL-12p70. Нарушения синтеза IL-2- и IFN-γ Т-лимфоцитами у больных ТЛ связаны с недостаточностью экспрессии молекул для рецептор- и цитокин-зависимой активации клеток при формировании иммунологического синапса, а также с дефицитом тирозиновых киназ (JAK1, JAK2, TYK2) и транскрипционных факторов (AP-1, NF-κB, NFAT2, T-bet, STAT1, STAT4) для внутриклеточной трансдукции сигналов активации.

Ключевые слова: туберкулез, иммунитет, дендритные клетки, Т-лимфоциты.

Доказано, что в основе патогенеза туберкулеза легких (ТЛ) лежит дисрегуляция иммунного ответа, опосредованного активацией, пролиферацией и дифференцировкой Т-лимфоцитов-хелперов типа 1 (Th1) [1, 2]. Одним из ее патогенетических факторов является нарушение взаимодействия Th1 с антигенпрезентирующими клетками (АПК), как прямого (контактного), так и посредством секретируемых АПК цитокинов [2, 3]. Однако что и каким образом при этом происходит на уровне межклеточных и внутриклеточных реакций, что является основным звеном патогенеза патологического течения иммунного ответа при ТЛ – вопрос открытый, требующий детального изучения.

Цель работы: охарактеризовать факторы дисфункции дендритных клеток и нарушений рецептор- и цитокин-опосредованной активации Т-лимфоцитов у больных ТЛ.

В программу исследования вошли 98 пациентов (76 мужчин и 22 женщины) в возрасте 20-55 лет с впервые выявленным ТЛ – 36 пациентов с инфильтративным ТЛ (ИТЛ) и 62 больных с диссеминированным ТЛ (ДТЛ). Для сравнительного анализа параметров иммунного статуса в зависимости от лекарственной чувствительности инфицирующего штамма *M. tuberculosis* была сформирована группа из 48 обследованных с лекарственно-чувствительным ТЛ (ЛЧТЛ) и 50 человек с лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ – из них 15 пациентов с множественно лекарственно-устойчивым (МЛУ) ТЛ).

Группу сравнения составили 50 здоровых добровольцев (12 женщин и 38 мужчин) сопоставимого возраста.

Материал исследования: $CD209^+$ миелоидные дендритные клетки (мДК), трансформированные *in vitro* из моноцитов, и лимфоциты.

Методы. Моноциты и лимфоциты выделяли из цельной крови методом градиентного центрифугирования. Определение поверхностных молекул на мДК (CD209, TLR-2, HLA-DR, CD80, CD86) и лимфоцитах (CD3ε, CD28, gp130, IL-12Rβ2), а также внутриклеточных цитокинов (IL-2, IFN-γ) и транскрипционных факторов (AP-1, NF-κB, NFAT2, T-bet) в Т-клетках проводили с использованием специфических моноклональных антител («R&D Systems», США) методом проточной цитометрии. Методом твердофазного иммуноферментного анализа анализировали: 1) секрецию мДК цитокинов IL-12p70, IL-18 и IL-27 по их концентрации в супернатантах на 7-е сутки культивирования клеток (реагенты «eBioscience Company», США); 2) содержание транскрипционных факторов STAT1, STAT4 и активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 в лизатах лимфоцитов крови (реагенты «Cusabio Biotech», США). При

культивировании лимфоцитов в качестве индукторов использовали моноклональные антитела к CD3(ε), CD28 («R&D Systems», США) и рекомбинантные IL-12, IL-27 («eBioscience Company», США). Время инкубации варьировало в зависимости от параметра от 40 мин до 48 ч. Идентификацию полиморфизмов генов *IL12B* и *IL27* осуществляли с использованием полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных алгоритмов биометрии.

Результаты. У больных ТЛ вне зависимости от клинической формы (ИТЛ, ДТЛ) и варианта (ЛЧТЛ, ЛУТЛ) заболевания, а также спектра резистентности *M. tuberculosis* к базовым препаратам этиотропной терапии (с моно-, полиили множественной устойчивостью) отмечалось снижение относительного числа $TLR2^+$ (исключение – больные с полирезистентным и МЛУ ТЛ), $TLR2^+$/$HLA\text{-}DR^+$, $CD86^+$ и иммуногенных $CD80^+$/$CD86^+$ мДК. Секреция IL-27 в культуре трансформированных мДК у больных ТЛ была существенно ниже, чем у здоровых доноров; выявлялась ассоциация гипопродукции IL-27 с носительством полиморфизма *rs17855750 (T-2905G)* гена *IL27*. Напротив, характер изменений секреции IL-18 и IL-12p70 мДК проявлял выраженную зависимость от клинической формы и варианта заболевания. У больных ДТЛ и ЛЧТЛ регистрировалось повышение секреции обоих цитокинов – IL-18 и IL-12p70, в то время как у больных ИТЛ и ЛУТЛ нормальный уровень секреции IL-18 сочетался с разнонаправленными изменениями секреции IL-12p70 – снижением при ИТЛ (в ассоциации с носительством полиморфизма *rs17860508 (B/4)* гена *IL12B*) и повышением при ЛУТЛ. У больных ЛУТЛ уровень секреции данных цитокинов также варьировал в зависимости от спектра лекарственной резистентности возбудителя – у больных МЛУ ТЛ повышение секреции IL-12p70 сочеталось с нормальной секрецией IL-18.

Наряду с этим, у больных ТЛ обнаруживалось снижение относительного и абсолютного числа IL-2- и IFN-γ-синтезирующих Т-клеток ($CD3^+CD28^+IL\text{-}2^+$ и $CD3^+IFN\text{-}\gamma^+$). Указанные нарушения сочетались с дефицитом в Т-лимфоцитах основных компонентов трансдукции сигналов активации синтеза IL-2 и IFN-γ, о чем свидетельствовало снижение числа клеток с иммунофенотипами $CD3^+AP\text{-}1^+$, $CD3^+NF\text{-}\kappa B^+$, $CD3^+NFAT2^+$, $CD3^+T\text{-}bet^+$, содержания активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 и факторов транскрипции STAT1, STAT4 в лизатах лимфоцитов. Выраженность установленных изменений в большей степени зависела от лекарственной устойчивости возбудителя заболевания и в меньшей степени – от клинической формы ТЛ. Кроме того, у больных инфильтративным и диссеминированным ЛЧТЛ и ЛУТЛ снижение синтеза IL-2 Т-лимфоцитами ассоциировалось с дефицитом $CD3^+$, $CD28^+$ и $CD3^+CD28^+$ субпопуляций клеток в крови, а сниженный уровень $IFN\text{-}\gamma^+$ Т-лимфоцитов при увеличении числа $CD3^+IFN\text{-}\gamma^-$ клеток – с низким уровнем экспрессии на Т-лимфоцитах рецепторов к IL-12 (IL-12Rb2) и IL-27 (gp130).

Выводы:

1. Факторами дисфункции мДК у больных ТЛ являются дефицит поверхностных молекул для связывания *M. tuberculosis*, формирования иммунологического синапса и костимуляции Т-клеток, а также дефицит секреции мДК молекул цитокин-зависимой активации Т-лимфоцитов – IL-27 (у всех больных ТЛ) и IL-12p70 (у больных ИТЛ).

2. Нарушения синтеза IL-2 и IFN-γ Т-лимфоцитами у больных ТЛ связаны с недостаточностью экспрессии на их поверхности молекул для взаимодействия с рецепторами и цитокинами (IL-12, IL-27) дендритных клеток, а также с дефицитом ключевых тирозиновых киназ и транскрипционных факторов, опосредующих внутриклеточную трансдукцию сигналов рецептор- и цитокин-зависимой активации Т-клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allelic polymorphism of cytokine genes during pulmonary tuberculosis / I. O. Naslednikova, O. I. Urazova, O. V. Voronkova et al. // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2009. – Т. 148. № 2. – С. 175-180.
2. Молекулярные факторы нарушений цитокин-зависимой активации Т-лимфоцитов при туберкулезе легких / И. Е. Есимова, О. И. Уразова, М. С. Игнатова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 3. – С. 373-376.
3. Ярилин, А. А. Иммунология / А. А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.

MOLECULAR FACTORS OF VIOLATIONS OF IMMUNE RESPONSE AT PULMONARY TUBERCULOSIS

Urazova O. I., Novickij V. V., Esimova I. E., Hasanova R. R., Filinyuk O. V.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Molecular factors of violations of interaction and dysfunction of myeloid dendritic cells (mDC) and T-lymphocytes were investigated at 98 patients with pulmonary tuberculosis (TB). It is shown that these include deficit of surface molecules TLR 2 and CD 86 on mDC, and genetically deterministic reduction of IL-27 and IL-12p70 secretion by mDC. Violation of the synthesis of IL-2 and IFN-γ by T-lymphocytes in patients with TB is associated with insufficiency of the expression of molecules to receptor- and cytokine-dependent activation of cells during the formation of immunological synapse and deficiency of tyrosine kinases (JAK1, JAK2, TYK2) and transcription factors (AP-1, NF-κB, NFAT2, T-bet, STAT1, STAT4) for intracellular transduction of activating signals.

Keywords: tuberculosis, immunity, dendritic cells, T-lymphocytes.

СРАВНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Королевская Л. Б.[1,2], Шмагель К. В.[1,2], Сайдакова Е. В.[1,2], Шмагель Н. Г.[2,4], Шилов Д. Ю.[2,3], Черешнев В. А.[1,2,3]

[1]Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;
[2]Пермский государственный национальный исследовательский университет;
[3]Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера;
[4]Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Пермь, Россия

У ВИЧ-инфицированных пациентов исследован субпопуляционный состав $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов периферической крови и лимфатических узлов. Установлено, что по сравнению с неинфицированными людьми у больных с ВИЧ-инфекцией снижен уровень $CD4^+$ и увеличено количество $CD8^+$ Т-клеток. В обеих субпопуляциях лимфоцитов повышена доля клеток памяти и снижено число наивных клеток. Эти изменения обнаружены как в периферической крови, так и в лимфатических узлах ВИЧ-позитивных пациентов.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, субпопуляции Т-лимфоцитов, лимфатические узлы, периферическая кровь.

Известно, что главной мишенью ВИЧ являются $CD4^+$ Т-лимфоциты с фенотипом клеток памяти [1]. Оценку субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных больных проводят, как правило, при исследовании периферической крови. Следует отметить, что циркулирующие клетки представляют собой лишь небольшую часть всей популяции лимфоцитов, основным же резервуаром репликации вируса являются лимфоидные ткани [2]. Ранее рядом авторов были представлены данные о субпопуляциях Т-клеток лимфатических узлов у ВИЧ-инфицированных людей [3]. Вместе с тем вопрос о том, является ли субпопуляционной состав Т-лимфоцитов периферической крови ВИЧ-инфицированных больных прямым отражением такового в лимфатической ткани, остается открытым.

Целью настоящей работы было сравнение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов лимфатических узлов и периферической крови у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Методы. Объектом исследования служили мононуклеарные клетки, полученные из периферической крови и лимфатических узлов ВИЧ-инфицированных пациентов, давших письменное согласие на участие в исследовании. Все пациенты находились на антиретровирусной терапии не менее 2 лет, к моменту обследования репликация ВИЧ у них была подавлена (<50 копий/мл). Контрольную группу составили условно здоровые добровольцы без признаков ВИЧ-инфекции. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов крови и лимфоузлов оценивали методом проточной цитометрии. Лимфоциты $CD45RA^+CD27^+CCR7^+$ определяли как наивные клетки, $CD45RA^-CD27^+CCR7^+$ – как клетки центральной памяти, $CD45RA^-CD27^-CCR7^-$ – как клетки эффекторной памяти и $CD45RA^+CD27^-CCR7^-$ – как терминальные эффекторы. При анализе данных рассчитывали медиану и интерквартильный размах. Сравнение величин проводили на основании критерия Манна-Уитни.

Результаты. Относительное количество $CD4^+$ Т-лимфоцитов крови у ВИЧ-инфицированных пациентов (n=36) было существенно ниже по сравнению с показателем неинфицированных доноров (n=20): 29,6 % (20,3-38,3 %) и 53,3 % (50,1-56,8 %; p<0,001) соответственно. У ВИЧ-позитивных людей субпопуляционный состав $CD4^+$ Т-лимфоцитов крови был представлен следующим образом. На долю наивных клеток приходилось 35,8 % (27,3-54,9 %), клеток центральной и эффекторной памяти – 29,7 % (24,8-35,9 %) и 14,7 % (11,5-27,7 %), терминальных эффекторов – 1,5 % (0,6-3,9 %). У неинфицированных доноров эти показатели составили 48,4 % (34,4-53,2 %), 29,0 % (23,1-37,6 %), 11,9 % (7,4-14,3 %), 1,2 % (0,6-3,2 %) соответственно. Статистически значимые различия между группами ВИЧ+ и ВИЧ– были установлены только при оценке относительного числа клеток эффекторной памяти (p<0,05). Вместе с тем у ВИЧ-зараженных больных доля наивных $CD4^+$ Т-клеток крови была ниже, чем у здоровых людей. При оценке субпопуляционного состава $CD8^+$ Т-клеток крови установлено, что у ВИЧ-позитивных субъектов значительно увеличено количество $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов по сравнению с величиной, выявленной у здоровых людей: 41,9 % (34,6-51,9 %) и 26,5 % (21,0-29,9 %; p<0,001). В группе больных с ВИЧ-инфекцией субпопуляции $CD8^+$ Т-лимфоцитов крови были распределены следующим образом: наивные клетки составили 18,6 % (12,3-32,4 %), клетки центральной и эффекторной памяти – 11,2 % (7,8-15,2 %) и 18,0 % (11,3-25,5 %), терминальные эффекторы – 37,2 % (29,8-47,8 %). В контрольной группе (ВИЧ–) относительное число данных субпопуляций $CD8^+$ Т-клеток крови составило 41,0 % (26,6-48,9 %), 12,8 % (7,6-15,4 %), 10,5 % (7,5-17,6 %) и 25,2 % (18,4-40,0 %) соответственно. Статистически значимые отличия установлены для субпопуляций наивных клеток (p=0,001), терминальных эффекторов (p<0,05) и клеток эффекторной памяти (p<0,01).

Таким образом, у ВИЧ-инфицированных больных выявлено снижение относительного количества $CD4^+$ и увеличение числа $CD8^+$ Т-лимфоцитов периферической крови. При этом понижен уровень наивных клеток и повышена доля клеток эффекторной памяти как среди $CD4^+$, так и среди $CD8^+$ Т-лимфоцитов.

Исследование субпопуляционного состава Т-клеток лимфатических узлов у ВИЧ-инфицированных (n=6) и неинфицированных (n=4) людей показало следующие результаты. Уровень $CD3^+CD4^+$ клеток, выделенных из лимфоузлов ВИЧ-зараженных больных, был ниже по сравнению с соответствующим показателем здоровых людей: 48,9 % (33,0-52,3 %) и 60,2 % (50,3-79,7 %). Наличие ВИЧ-инфекции сопровождается уменьшением относительного числа наивных $CD4^+$ Т-клеток: 35,8 % (28,2-48,9 %) и 46,6 % (37,9-65,1 %) в группах ВИЧ+ и ВИЧ– соответственно. Кроме того в лимфоузлах ВИЧ-инфицированных пациентов относительное количество $CD4^+$ Т-клеток памяти было выше по сравнению с их уровнем у здоровых добровольцев. На долю клеток центральной и эффекторной памяти у ВИЧ-позитивных больных приходилось 53,6 % (40,5-60,3 %) и 9,9 % (5,1-12,69 %) соответственно. У неинфицированных людей эти показатели составили, соответственно, 44,6 % (27,8-53,9 %) и 5,9 % (3,8-10,0 %). Статистически значимые различия между группами ВИЧ+ и ВИЧ– были выявлены только при оценке относительного количества $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов: 19,0 % (15,2-27,7 %) и 11,2 % (6,4-13,5 %; p<0,05). Вместе с тем анализ субпопуляционного состава $CD8^+$ Т-клеток лимфоузлов показал снижение доли наивных лимфоцитов и повышение от-

носительного числа клеток памяти у ВИЧ-инфицированных больных по сравнению с их уровнем у здоровых людей. Полученные данные свидетельствуют о том, что в лимфатических узлах ВИЧ-инфицированных субъектов увеличено общее количество $CD8^+$ Т-клеток и снижен уровень $CD4^+$ лимфоцитов. При этом в обеих субпопуляциях Т-лимфоцитов уменьшена доля наивных клеток и увеличен процент клеток памяти.

Таким образом, в результате проведенного нами исследования показано, что изменения в субпопуляциях $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, выявленные в лимфатических узлах ВИЧ-инфицированных больных, сходны с таковыми, установленными в периферической крови.

Работа поддержана Российским научным фондом (№ 15-15-00016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract / S. Mechandru, M. A. Poles, K. Tenner-Racz et al. // J Exp Med.– 2004.– V. 200, N 6.– P. 761-770.
2. Micribial traslocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection / J. M. Brenchley, D. A. Price, T. W. Schacker et al. / Nature Med.–2006.– V. 12, N 12.– P. 1365-1371.
3. Effect of HIV-1 infection on lymphocyte phenotypes in blood versus lymph nodes / O. O. Yang, J. J. Ferbas, M. A. Hausneret al. // J Acquir Defic Syndr.– 2005.– V. 39.– P. 507-518.

COMPARISON OF PERIPHERAL BLOOD AND LYMPH NODE T LYMPHOCYTE SUBSETS IN HIV-INFECTION

Korolevskaya L. B.[1,2], Shmagel K. V.[1,2], Saidakova E. V.[1,2], Shmagel N. G.[2,4], Shilov D. Yu.[2,3], Chereshnev V. A.[1,2,3]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; [2]Perm State University; [3]Perm State Medical University; [4]Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russia

Peripheral blood and lymph node $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocyte subsets in HIV-infected patients were studied. It was found that compared to uninfected persons in patients with HIV levels of $CD4^+$ T cells were reduced and numbers of $CD8^+$ T cells were increased. In both lymphocyte subsets memory cell levels were increased and naive cells were reduced. These changes were detected in both the peripheral blood and the lymph nodes of HIV-positive patients.

Keyword: HIV infection, T lymphocyte subsets, lymph nodes, peripheral blood.

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ У ПАЦИЕНТОВ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ КОНЪЮНКТИВИТАМИ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ АНОМАЛЬНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Медведева М. В., Биляк А. С.

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия

Проведено исследование уровня провоспалительных цитокинов в крови, слюне и слезе у пациентов, страдающих конъюнктивитами и проживающих в условиях различного геомагнитного фона. Получены данные, свидетельствующие о необходимости учёта геомагнитного фона в диагностике и лечении таких пациентов, а также необходимость поиска препаратов, способствующих нормализации иммунного ответа в условиях аномального магнитного поля.

Ключевые слова: магнитное поле, конъюнктивит, цитокины.

Актуальность. Воспалительные заболевания глаз, к которым относятся конъюнктивиты, занимают одно из ведущих мест в офтальмологической практике [1], поэтому актуальной задачей является поиск эффективных методов их диагностики и лечения. Помимо особенностей самого возбудителя в развитии конъюнктивита немаловажную роль играет иммунологический статус пациента, на который влияют социальные и экологические факторы [2]. В частности, в регионах с аномально высокими значениями геомагнитного поля, таких как регион Курской магнитной аномалии, характеризующийся залеганием значительных объёмов железных руд, отмечается увеличение заболеваемости [3]. Действию аномального магнитного поля подвергается и сам возбудитель, что приводит к более тяжёлому течению заболевания и хронизации процесса [4].

Целью данной работы явилось изучение провоспалительных цитокинов сыворотки крови, слюны и слезы пациентов с конъюнктивитами, проживающих в условиях действия фонового и аномального магнитных полей.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 80 человек в возрасте 25-45 лет, из которых 40 – жители Курска (регион с фоновым значением напряжённости геомагнитного поля – 0,45 эрстеда), и 40 – жители центра Курской магнитной аномалии – Железногорска (напряжённость геомагнитного поля 3 эрстеда). В основные группы (по 20 человек в каждой) вошли проживающие в Курске и Железногорске пациенты с конъюнктивитом, получавшие классическую терапию. В контрольные группы обоих регионов вошли по 20 здоровых доноров. У обследуемых всех групп для оценки уровня цитокинов производился отбор слёзной жидкости, слюны и крови. Оценка уровней ИЛ-4 и ИЛ-6 проводилась с помощью набора реагентов ВЕКТОР-БЕСТ методом твёрдофазного иммуноферментного анализа. Сравнение результатов в основных группах производилось до лечения и на 10 сутки терапии. Обработка результатов исследования проводилась методами непараметрической статистики с использованием критерий Вилкоксона. Различия считались достоверными при $p<0,05$.

Результаты. Определение в сыворотке здоровых доноров уровня ИЛ-4 показало, что он был максимальным у лиц, проживающих в зоне с фоновым значением геомагнитного поля (6,00±0,68 пг/мл), тогда как у здоровых доноров Железногорска он был ниже (4,37±0,60 пг/мл). В слюне и в слёзной жидкости его концентрация у здоровых лиц Курска (3,80±0,48 и 4,70±0,90 пг/мл) была достоверно ниже, чем у жителей Железногорска (5,60±0,67 и 6,03±0,44 пг/мл соответственно).

У пациентов, страдающих конъюнктивитом, уровень ИЛ-4 был относительно снижен в Курске (5,00±0,56 пг/мл) и почти неизменен – в Железногорске (4,60±0,45 пг/мл). Иная картина наблюдалась в слюне: содержание цитокина у больных с конъюнктивитами в Курске не отличалось от показателей контроля (4,10±0,24 пг/мл), а у пациентов, проживающих в Железногорске – достоверно ниже значений здоровых лиц (3,30±0,37 пг/мл). В слезе у больных в обоих регионах уровень ИЛ-4 был практически равным и составил 6,10±0,47 и 6,40±0,50 пг/мл.

После стандартного лечения наблюдалось незначительное увеличение уровня ИЛ-4 в сыворотке крови у пациентов, проживающих в Курске и Железногорске до 5,20±0,60 и 5,21± 0,84 пг/мл соответственно. Аналогичные изменения отмечены в слюне у пациентов Курска, у которых уровень цитокина повысился до 4,60±0,26 пг/мл. Увеличение содержания ИЛ-4 в слюне у пациентов Железногорска к концу лечения было менее выражено – до 3,96± 0,27 пг/мл. Достоверных изменений содержания ИЛ-4 в слёзной жидкости на фоне стандартной терапии у пациентов обоих регионов отмечено не было.

Что касается ИЛ-6, то у здоровых лиц различия между группами были более выражены – у представителей Курска его уровень составил 6,83±0,89 пг/мл, а у железногорских доноров – 2,14±0,27 пг/мл. Ещё более выраженными были различия, касающиеся содержания данного цитокина в слюне: 0,59±0,21 и 0,02±0,01 пг/мл для курских и железногорских доноров соответственно. В слёзной жидкости не было обнаружено статистически достоверных различий между показателями жителей Курска и Железногорска – 0,03±0,01 и 0,04±0,01 пг/мл. При развитии патологического процесса уровень сывороточного ИЛ-6 у пациентов, проживающих в Курске, почти в 2 раза превышал аналогичный показатель здоровых лиц и составил 10,00±0,76 пг/мл. Более выраженное увеличение уровня ИЛ-6 в крови отмечено у пациентов Железногорска – до 3,10±0,27 пг/мл. В слюне заболевших

был отмечено снижение уровня ИЛ-6 – он составил 1,37±0,21 и 0,08±0,03 пг/мл соответственно у пациентов Курска и Железногорска. Уровни цитокина в слезе оказались практически равными у больных Курска – 0,02±0,007 пг/мл, тогда как у пациентов Железногорска он стал ниже контроля и составил 0,02±0,006 пг/мл. На фоне стандартного лечения отмечалась некоторая нормализация повышенного уровня сывороточного ИЛ-6 у пациентов Курска до 9,10±0,40 пг/мл. У больных Железногорска он повысился до 9,40±0,54 пг/мл. У пациентов Курска и Железногорска в слюне к 10 дню наблюдалось его незначительное снижение до 1,16±0,13 пг/мл и 0,067±0,024 пг/мл соответственно. К концу лечения также было отмечено повышение уровня ИЛ-6 в слёзной жидкости у всех пациентов: в Курске до 0,028±0,008 пг/мл, а в Железногорске – до 0,04±0,015 пг/мл.

Выводы. В результате исследования получены данные, подтверждающие значимость влияния аномальных значений магнитного поля на содержание противовоспалительных цитокинов в биологических жидкостях пациентов с конъюнктивитами. Разнонаправленность изменений их содержания в Курске и Железногорске свидетельствует о необходимости учёта уровня геомагнитного фона в диагностике и лечении пациентов с конъюнктивитами и диктуют необходимость поиска новых эффективных методов лечения, соответствующих экологической обстановке данных зон. Определение уровня цитокинов в слёзной жидкости и слюне пациентов с конъюнктивитами могут стать альтернативой анализа их содержания в сыворотке крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Майчук Ю. Ф. Основные тенденции в эпидемиологии и терапии глазных инфекций // Тр. VIII Съезда офтальмологов России.– М., 2005.– С. 92-93.
2. Архипов Г. С., Архипова Е. И. Иммунологические аспекты профилактики и лечения инфекционных заболеваний. / Г. С. Архипов, Е. И. Архипова // Изучение факторов риска и прогнозирование здоровья населения на региональном уровне.– М.: Медицина, 2003.– Т. 1.– С. 47-55.
3. Заброда Н. Н., Артеменко М. В. Экология региона КМА и заболеваемость. / Н. Н. Заброда, М. В. Артеменко// Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье» – 2007.– № 1.– С. 68-71.
4. Неман М. А., Калуцкий П. В. Изменение структуры популяции кишечной палочки при развитии инфекционного процесса в условиях воздействия магнитного поля повышенной напряженности. / М. А. Неман, Калуцкий П. В. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье» – 2012.– № 1.– С. 29-32.

PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH BACTERIAL CONJUNCTIVITIS, LIVING IN ANOMALOUS MAGNETIC FIELDS REGIONS

Medvedeva M. V., Bilyak A. S.

Kursk State Medical University Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia

We studied the levels of proinflammatory cytokines in patients with conjunctivitis in their blood, saliva and tear, in regions with different geomagnetic activity. The results show the need for paying attention to the regional geomagnetic activity through the diagnostic and treatment of such patients, and the need of search for medicaments that can normalize the immune response in the anomalous magnetic field conditions.

Keywords: magnetic field, conjunctivitis, cytokines.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ CD4$^+$ И CD8$^+$ Т-КЛЕТОК ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ КОИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С

Сайдакова Е. В.[1,2], Шмагель К. В.[1,2], Королевская Л. Б.[1,2], Шмагель Н. Г.[1,3], Черешнев В. А.[1,2], Энтони Д. Д.[4], Ледерман М. М.[4]

[1]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия; [2]Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермь, Россия; [3]Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Пермь, Россия; [4]Западный резервный университет Кейза, Кливленд, Огайо, США

Исследован субпопуляционный состав Т-клеток лимфатических узлов и периферической крови у ВИЧ-инфицированных больных, коинфицированных вирусом гепатита С (ВГС). Показаны различия в распределении субпопуляций Т-клеток между лимфоидной тканью и кровью. Установлено, что наличие ВГС коинфекции не вызывает изменений субпопуляционного состава CD4$^+$ и CD8$^+$ Т-клеток лимфоидных органов у ВИЧ-инфицированных больных, принимающих антиретровирусную терапию.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, ВГС-инфекция, Т-лимфоциты.

Общие пути передачи вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и вируса гепатита С (ВГС) привели к широкому распространению сочетанной ВИЧ/ВГС инфекции. Ранее было установлено, что ВГС коинфекция оказывает неблагоприятное влияние на развитие ВИЧ-инфекции, снижая эффективность восстановления численности Т-лимфоцитов при проведении антиретровирусной терапии [1]. Также было показано, что наличие ВГС приводит к изменению субпопуляционного состава Т-клеток, увеличивает уровень активации и интенсивность апоптоза Т-лимфоцитов [2]. Эти данные были получены на клетках периферической крови, которые составляют, в среднем, лишь 2% от общего числа лимфоцитов организма [3]. На сегодняшний день остается неизвестным, насколько ВГС коинфекция влияет на Т-клетки, находящиеся в лимфоидных тканях ВИЧ-позитивных больных.

Целью настоящей работы было определение субпопуляционного состава Т-клеток лимфатических узлов ВИЧ/ВГС коинфицированных пациентов.

Материалы и методы. Работа была одобрена этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. Каждый пациент дал письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Проведен анализ субпопуляционного состава CD4$^+$ и CD8$^+$ Т-клеток паховых лимфатических узлов, полученных от 12 ВИЧ-инфицированных больных, принимающих антиретровирусные препараты. Шесть пациентов были коинфицированы ВГС, остальные 6 человек выступили в качестве контрольной группы. Параллельно было проведено исследование субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови 80 ВИЧ-инфицированных больных, 44 из которых были коинфицированы ВГС. Методом проточной цитометрии в крови и лимфоузлах пациентов были определены 4 субпопуляции Т-клеток: наивные (CD45RA$^+$CD27$^+$), центральной памяти (ЦП; CD45RA$^-$CD27$^+$), эффекторной памяти (ЭП; CD45RA$^-$CD27$^-$), терминальные эффекторы (ТЭ; CD45RA$^+$CD27$^-$). Сравнение групп проводили на основании непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Результаты. Было показано, что при ВИЧ-инфекции, отягощенной гепатитом С, субпопуляционный состав Т-клеток лимфатических узлов значительно отличается от состава

периферической крови. В лимфоузлах почти половину всех лимфоцитов составили $CD4^+$ Т-клетки (48,5 %). В отличие от этого, в крови ВИЧ/ВГС позитивных пациентов $CD4^+$ Т-клетки составили лишь 23,8 % (P<0,001). В лимфатических узлах среди $CD4^+$ Т-клеток преобладала субпопуляция клеток центральной памяти (56,8 %). В крови их доля составила 32,1 % (P<0,001). Относительное количество $CD4^+$ Т-клеток эффекторной памяти было ниже в лимфоузлах по сравнению с кровью (12,8 % и 16,7 % соответственно; P<0,05). Доли наивных $CD4^+$ Т-клеток не имели статистически значимых отличий между двумя компартментами, однако, следует отметить, что в лимфоидных органах наблюдалась тенденция к снижению числа этих клеток (29,0 % и 34,4 % в лимфоузлах и крови соответственно; P>0,05).

У коинфицированных пациентов относительное количество $CD8^+$ Т-клеток лимфатических узлов было в два раза ниже аналогичного значения в крови (22,7 % и 48,8 % соответственно; P<0,001). Большинство $CD8^+$ Т-клеток в лимфоузлах было представлено субпопуляцией лимфоцитов центральной памяти (54,7 %). В крови доля этих клеток составила лишь 15,2 % (P<0,001). Процентное содержание наивных $CD8^+$ Т-клеток в лимфоидной ткани значительно превышало аналогичные значения в крови (33,0 % и 19,5 % соответственно; P<0,05). В то же время в лимфоузлах коинфицированных пациентов доли $CD8^+$ Т-клеток эффекторной памяти (9,0 %) и терминальных эффекторов (2,8 %) были в разы меньше, чем в крови (22,9 % (P<0,001) и 32,2 % (P<0,001) ЭП и ТЭ соответственно).

При ВИЧ-инфекции, не отягощенной гепатитом С, также были отмечены различия в субпопуляционном составе Т-клеток лимфатических узлов и крови. В лимфоузлах по сравнению с кровью было увеличено содержание $CD4^+$ Т-лимфоцитов (48,9 % и 29,6 % соответственно; P<0,05). Большинство $CD4^+$ Т-клеток лимфоидной ткани было представлено клетками центральной памяти (53,6 % и 29,7 % в лимфоузлах и крови соответственно; P<0,01). При этом количество $CD4^+$ Т-клеток эффекторной памяти было ниже в лимфоузлах по сравнению с кровью (9,9 % и 14,7 % соответственно; P<0,05), а относительное количество наивных Т-лимфоцитов двух компартментов не имело значительных отличий.

Иная ситуация наблюдалась в субпопуляции $CD8^+$ Т-лимфоцитов ВИЧ моноинфицированных больных. Доля цитотоксических Т-клеток была значительно уменьшена в лимфатических узлах по сравнению с кровью (19 % и 41,9 % соответственно; P<0,001). Основную часть $CD8^+$ Т-клеток лимфоузлов составляли наивные $CD8^+$ Т-лимфоциты и клетки центральной памяти (42,6 % и 44,8 % соответственно), в то время как доля этих Т-лимфоцитов в крови была не так велика (18,6 % (P<0,01) и 11,2 % (P<0,001) наивных и ЦП соответственно). Субпопуляции слабо представленные в лимфатических узлах (клетки эффекторной памяти – 5,6 %, и терминальные эффекторы – 3,1 %) занимали значительную долю в периферической крови (18,0 % (P<0,01) и 37,2 % (P<0,001) соответственно).

Таким образом, было показано, что при ВИЧ моноинфекции, как и при ВИЧ/ВГС коинфекции, субпопуляции Т-лимфоцитов неравномерно распределены между лимфатическими узлами и периферической кровью.

Сравнение субпопуляционного состава Т-клеток лимфатических узлов $ВИЧ^+ВГС^-$ и $ВИЧ^+ВГС^+$ пациентов не выявило статистически достоверных отличий между двумя группами доноров. Однако при сочетанной инфекции в лимфатических узлах были обнаружены тенденции к уменьшению относительного количества $CD4^+$ и $CD8^+$ наивных Т-клеток, а также увеличению содержания $CD8^+$ Т-лимфоцитов центральной и эффекторной памяти.

Таким образом, было показано, что ВИЧ/ВГС коинфекция и ВИЧ моноинфекция характеризуются сходными паттернами распределения $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов между периферической кровью и лимфатическими узлами, а наличие отягощающего заболевания не приводит к изменению субпопуляционного состава лимфоидных органов у ВИЧ-инфицированных больных. Работа поддержана программой фундаментальных исследований УрО РАН (проект № 15-3-4-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greub G. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection / G. Greub // Lancet. – 2000. – V. 356. – P. 1800-1805.
2. Королевская Л. Б. Влияние коинфекции вирусом гепатита С на численность субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных

пациентов, получающих антиретровирусную терапию / Л. Б. Королевская // БЭБиМ.– 2016.– Т. 161, № 2.– С. 243-246.

3. Trepe F. Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis / F. Trepel // Klin Wochenschr.– 1974.– V. 52.– P. 511-515.

LYMPH NODE CD4+ AND CD8+ T CELL SUBSETS OF HIV-POSITIVE PATIENTS CO-INFECTED WITH HEPATITIS C VIRUS

Saidakova E. V.[1,2], Shmagel K. V.[1,2], Korolevskaya L. B.[1,2], Shmagel N. G.[1,3], Chereshnev V. A.[1,2], Anthony D. D.[4], Lederman M. M.[4]

[1]Perm State University, Perm, Russia; [2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia; [3]Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russia; [4]Case Western Reserve University, Ohio, USA

Lymph node and peripheral blood T cell subsets of HIV-infected patients co-infected with hepatitis C virus (HCV) were studied. The differences in the distribution of T cell subsets between lymphoid tissue and blood were shown. It has been established that the presence of HCV co-infection does not cause changes in lymphoid organs' CD4+ and CD8+ T lymphocyte subpopulations' pattern of HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy.

Keywords: HIV, HCV infection, T-lymphocytes.

ДИАГНОСТИКА СЕПСИСА РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОЦЕНКИ CD64 НА НЕЙТРОФИЛАХ И ПРОКАЛЬЦИТОНИНА

Калашникова А. А., Ворошилова Т. М., Фролова М. Ю.

ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Определяли концентрацию прокальцитонина, относительное количество CD64+ нейтрофилов и плотность экспрессии этого маркера у пациентов с сепсисом различной этиологии. Определили пороговые значения (cut-off) nCD64 для диагностики сепсиса, вызванного грамотрицательной микрофлорой или грибами рода *Candida*. При относительном количестве CD64+ нейтрофилов более 83 % вероятность грамотрицательного или кандидозного сепсиса определяется с чувствительностью 87 %, специфичностью 81 %. При относительном количестве CD64+ нейтрофилов выше 98 % и плотности экспрессии более 8,1 высока вероятность развития септического шока. Наиболее выраженное повышение прокальцитонина отмечалось при грамотрицательном сепсисе. При грамположительном и кандидозном сепсисе более чем в 20 % случаев не выявлено повышение прокальцитонина. Изучение динамики изменений уровня прокальцитонина и nCD64 показало, что nCD64 является более лабильными показателем, снижаясь в течение суток при эффективной антибиотикотерапии.

Ключевые слова: сепсис, CD64, прокальцитонин.

В течение последних лет для ранней диагностики сепсиса было предложено определение экспрессии нейтрофилами CD64 (nCD64). В результате метаанализа 2013 года были определены чувствительность (76 %) и специфичность (85 %) этого метода [1]. При этом существуют заметные разногласия в оценке диагностической значимости определения nCD64 [2], связанные как со способами оценки, так и с выбранными пороговыми значе-

ниями (cut-off). Как правило, не учитывается природа возбудителей сепсиса. Принципиальные различия в механизмах иммунопатогенеза сепсиса, вызванного грамотрицательными и грамположительными бактериями, обусловлены особенностями строения клеточных стенок микроорганизмов и спектра бактериальных токсинов. Основными клетками-эффекторами, взаимодействующими с липополисахаридами грамотрицательных бактерий, являются клетки врожденного иммунитета, в то время как белковые экзотоксины грамположительных бактерий активируют специфический иммунитет (Т- и В- лимфоциты).

Целью нашей работы являлась оценка диагностической значимости определения относительного количества $CD64^+$ нейтрофилов и плотности экспрессии этого маркера в диагностике сепсиса в зависимости от этиологии возбудителя и в сравнении с прокальцитонином.

В динамике наблюдали пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России. Исследовали кровь, взятие которой осуществлялось от 1 до 15 раз в зависимости от длительности пребывания пациента в отделении. Обследован 31 человек, проведено 95 наблюдений. У 9 человек отмечалось развитие септического шока. Диагноз «сепсис» устанавливался в соответствии с клиническими критериями (ACCP/SCCM Cosensus Conference commitee, 1992). Во всех случаях клинический диагноз был подтвержден положительными результатами бактериологических посевов крови. В зависимости от результатов бактериологического посева были выделены группы «грамотрицательный сепсис» (15 человек, 60 наблюдений), «грамположительный сепсис» (13 человек, 20 наблюдений), «кандидозный сепсис» (3 человека, 15 наблюдений). Степень органной дисфункции по шкале SOFA была сопоставима во всех группах и составляла 9,4±2,4 балла.

Обследования включали: бактериологический посев крови; определение сывороточной концентрации прокальцитонина; определение относительного количества $CD64^+$ нейтрофилов и определение плотности экспрессии CD64 на нейтрофилах. Кровь засевали в две пары флаконов анализатора Bact/Alert 3D (БиоМерье, Франция). Микроорганизмы идентифицировали с использованием анализатора VITEK2.

Полуколичественное определение прокальцитонина проводили с использованием тест-систем BRAHMS PCT-Q (Thermo scentific). Значимыми уровнями концентрации являлись: <0,5нг/мл, ≥0,5нг/мл, ≥2нг/мл, ≥10нг/мл. Определение относительного количества $CD64^+$ нейтрофилов проводили методом проточной цитометрии (Navios, антитела IgG1FITC, CD64FITC, CD14PE, CD16PC5, CD45PC7). Плотность экспрессии CD64 оценивали с использованием расчетного индекса РИ (РИ=MFInCD64+/MFIk).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью Statistica 5.0. Использовали анализ по Спирмену, критерий Манна-Уитни, ROC-анализ.

В группе «грамотрицательный сепсис» практически все нейтрофилы экспрессируют CD64 с высокой плотностью экспрессии. Уровень nCD64 этой группы значительно превышал показатели группы «грамположительный сепсис» (95,8±0,83%, РИ 8,5±0,8 против 55,2±4,0%, РИ 2,7±0,2, $p<0,0001$).

Показатели группы «кандидозный сепсис» также превышали результаты группы «грамположительный сепсис» (85,1±4,7%, РИ 5,6±0,7 против 55,2±4,0%, РИ 2,7±0,2, $p<0,0001$). Способность грамположительных бактерий в меньшей степени стимулировать повышение nCD64 отмечена как в нашей работе, так и в исследовании E. Allen и соавторов [3].

Определены пороговые значения (cut-off) nCD64 для диагностики сепсиса, вызванного грамотрицательной микрофлорой или грибами рода *Candida*. При относительном количестве $CD64^+$ нейтрофилов более 83% вероятность грамотрицательного или кандидозного сепсиса определяется с чувствительностью 87%, специфичностью 81%. При относительном количестве $CD64^+$ нейтрофилов выше 98% и плотности экспрессии РИ более 8,1 высока вероятность развития септического шока.

У пациентов с сепсисом, вызванным грамотрицательными бактериями, в 60% случаев отмечались максимальные концентрации прокальцитонина – более 2 нг/мл. У пациентов с грамположительным и кандидозным сепсисом в половине и более случаев отмечалось умеренное повышение прокальцитонина в диапазоне от 0,5 нг/мл до 2 нг/мл. В подгруппах «грамположительный сепсис» и «кандидозный сепсис» в 25% и 22% случаев соответственно концентрации прокальцитонина

сохранялись в пределах нормальных значений. Различия в сывороточных концентрациях прокальцитонина при сепсисе различной этиологии были определены в работах других исследователей [4]. В нашем исследовании получены сходные результаты. Определение прокальцитонина наиболее информативно для диагностики сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями.

Определена прямая корреляционная зависимость между содержанием прокальцитонина в сыворотке и показателями экспрессии CD64 нейтрофилами крови ($p<0,05$). Вместе с тем, при кандидозном сепсисе показатели nCD64 претерпевали более выраженные изменения, чем прокальцитонин.

Изучение динамики изменений уровня прокальцитонина и nCD64 показало, что nCD64 является более лабильными показателем, снижаясь в течение суток при эффективной антибиотикотерапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neutrophil CD64 expression in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis / S. Li, X. Huang, Z. Chen, H. Zhong et al. // International journal of infectious diseases.– 2013.– Vol. 17.– P. 12-23.
2. The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker of bacterial infection is low in critically ill patients / A. Gros, M. Roussel, E. Suavadet et al. // Intensive Care Med.– 2012.– Vol. 38.– P. 445-452.
3. Neutrophil CD64 expression: distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections / E. Allen, A. C. Bakke, M. Z. Purtzer, et al. // Ann. Rheum. Dis.– 2002.– Vol. 61.– P. 522-525.
4. Procalcitonin levels in gram-positive, gram-negative, and fungal bloodstream infections / C. Leli, M. Ferranti, A. Moretti et al. // Dis. Markers.– 2015.– V. 2015.– P. 701480.

DIAGNOSIS OF SEPSIS OF DIFFERENT ETIOLOGIES USING THE EVALUATION OF CD64 ON NEUTROPHILS AND PROCALCITONIN

Kalashnikova A. A., Voroshilova T. M., Frolova M. Y.

All-Russian center of emergency and radiation medicine EMERCOM of Russia, Saint-Petersburg, Russia

Determined the concentration of procalcitonin, the relative amount of $CD64^+$ neutrophils and density of expression of this marker in patients with sepsis of different etiology. Determined threshold values (cut-off) nCD64 for the diagnosis of sepsis caused by gram-negative bacteria or Candida. When the relative amount of $CD64^+$ neutrophils more than 83 % probability of gram-negative or candidal sepsis is defined with a sensitivity of 87 %, a specificity of 81 %. When the relative amount of $CD64^+$ neutrophils above 98 % and the density of expression of more than 8.1 high likelihood of developing septic shock. The most pronounced increase in procalcitonin was observed in gram-negative sepsis. In gram-positive and Candida sepsis in more than 20 % of the procalcitonin level was maintained within normal limits. The study of the dynamics of changes of procalcitonin level and nCD64 showed that nCD64 is more labile indicator, declining during the day, with the effective rehabilitation of inflammation with effective antibiotic treatment.

Keywords: sepsis, CD64, procalcitonin.

ОБЪЕКТИВНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ СЕПСИСА У НОВОРОЖДЕННЫХ С ДЫХАТЕЛЬНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ

Дударева М. В.[1], Сизякина Л. П.[2], Дударев И. В.[2]

[1]ФГБУ Институт акушерства и педиатрии Минздрава России;
[2]ФГБУ ГОУ ВПО РостГМУ, Ростов-на-Дону, Россия

В современной педиатрии проблема ранней диагностики гнойно-септических осложнений у новорожденных в критических состояниях затруднена ввиду развития сразу после рождения ребенка системной воспалительной реакции, проявляющейся прогрессирующей дыхательной недостаточностью, нарастающим нарушением гемодинамики и полиорганной недостаточности. Не вызывает сомнения ведущая роль иммунной системы в развитии, клиническом течении и исходах гнойно-воспалительных заболеваний у детей. В связи с этим остается актуальным поиск объективных высокочувствительных и специфичных маркеров для ранней диагностики сепсиса у новорожденных.

Ключевые слова: новорожденные, сепсис, гнойно-воспалительный очаг, бактериемия.

Среди респираторных нарушений наиболее частой причиной перинатальной заболеваемости и смертности являются респираторный дистресс-синдром, мекониальная аспирация, асфиксия и неонатальная пневмония [1]. При этом смертность в перинатальном периоде при этих состояниях составляет более 18 %, а важнейшим фактором, осложняющим их течение, является развитие бактериальной инфекции. Это диктует необходимость не только поиск новых подходов к лечению таких больных, но и способов ранней диагностики таких осложнений.

Целью настоящей работы явилось изучение апоптоза лимфоцитов и моноцитов периферической крови у новорожденных с дыхательными расстройствами.

Материалы и методы. Обследованы 212 доношенных новорожденных с гестационным возрастом от 39 до 41 недели, массой тела от 3700 до 4200 г, с оценкой по шкале Апгар 3,2± 1,6 баллов. Всем пациентам в процессе нахождения в отделении реанимации, осуществлялось динамическое клинико-лабораторное и иммунологическое обследование при поступлении, на 3-5 -е сутки и 20-е сутки (или исходе заболевания). У новорожденных детей при поступлении не было зарегистрировано клинических признаков бактериального инфицирования. При наблюдении в динамике на основании клинико-лабораторных данных было установлено, что к 3-5 суткам пребывания в реанимационном отделении у 17-ти новорожденных детей развился неонатальный сепсис.

Контрольную группу для новорожденных с дыхательными расстройствами составили доношенные здоровые новорожденные (n=38).

Исследования проводили на 3-х цветном проточном цитометре "Beckman Coulter" (США) с использованием реагентов фирмы "Beckman Coulter". При определении статистической обоснованности различия исследуемых групп применялся критерий Манна-Уитни для независимых групп и критерий Вилкоксона для связанных групп.

Результаты и обсуждение. Известно, что апоптоз как один из видов клеточной смерти играет важную роль в развитии патологических процессов: с его усилением или, наоборот, ингибированием связано возникновение и прогрессирование различных заболеваний [2]. Нарушение механизмов апоптоза лимфоцитов и моноцитов при синдроме дыхательных расстройств у новорожденных представляется наименее изученным.

При исследовании реализации программированной клеточной гибели лимфоцитов в аннексиновом тесте у новорожденных с синдромом дыхательных расстройств (СДР) нами было установлено достоверно

увеличенное содержание лимфоцитов периферической крови, находящихся в состоянии раннего Annexin V^+ и позднего Annexin V^+PI^+ апоптоза (12,71±1,16 % против 3,87±0,13 %, соответственно и 1,23±0,21 % против 0,15±0,01 %, соответственно) ($p<0,05$). Изучая экспрессию $CD14^+CD95^+$ мы наблюдали достоверное повышение относительного количества моноцитов, экспрессирующих этот рецептор по сравнению с группой здоровых детей (26,56±0,8 % против 17,5±0,44 %) ($p<0,05$). Очевидно, этот факт свидетельствовал о готовности моноцитов к апоптозу у новорожденных с СДР в отличие от показателей здоровых детей. Так, обнаруженное повышение $CD14^+CD95^+$ у новорожденных с СДР может указывать на возможное участие Fas- системы в реализации иммунного ответа на воспаление. Кроме того, по результатам аннексинового теста повышалось количество моноцитов вступивших в ранний и поздний апоптоз (Annexin V^+ и Annexin V^+PI^+) (21,45±0,71 % против 13,24±0,27 %, соответственно и 2,34±0,11 % против 0,97±0,06 %, соответственно) ($p<0,05$). Таким образом, выраженная гибель циркулирующих моноцитов у новорожденных с СДР может являться лабораторным критерием развития количественных и функциональных нарушений в системе иммунитета. Следует заключить, что на 20-е сутки заболевания количество лимфоцитов в раннем и позднем апоптозе достоверно снижалось относительно первых суток, но не достигало нормальных значений, что делало новорожденных уязвимыми в плане инфекционных осложнений. В результате оценки реализации программируемой клеточной гибели в анексиновом тесте были установлены изменения апоптотической реакции моноцитов у новорожденных с СДР. Так, на 3-5 сутки динамического наблюдения статистически достоверно увеличено содержание моноцитов периферической крови, находящихся в состоянии раннего $AnnexinV^+$ и позднего $AnnexinV^+PI^+$ апоптоза (30,92±0,91 % против 21,45±0,71 %, соответственно и 3,9±0,17 % против 2,34±0,11 %, соответственно) ($p<0,05$). На 20-е сутки заболевания экспрессия $AnnexinV^+$ и $AnnexinV^+PI^+$ имела тенденцию к снижению. Можно заключить, что чрезмерная гибель моноцитов обуславливает неадекватность иммунного ответа.

Нами были проведены исследования иммунного статуса у 17-и новорожденных с СДР, основное заболевание которых осложнилось бактериальным сепсисом. Процесс увеличения числа клеток $CD3^+CD95^+$ был сопряжен со значительным повышением количества клеток, вступивших в апоптоз, на основании их способности фиксировать на своей поверхности $AnnexinV^+$ и PI^+. Так, полученные нами данные свидетельствовали о том, что в периферической крови новорожденных с СДР, осложненным бактериальным сепсисом, по сравнению со здоровыми новорожденными выявлено достоверное повышение как раннего ($AnnexinV^+$), так и позднего ($AnnexinV^+PI^+$) маркеров апоптоза (10,13±2 % против 3,87±0,13 %, соответственно и 0,73±0,33 % против 0,15±0,01 %, соответственно) ($p<0,05$). В результате оценки реализации программируемой клеточной гибели в аннексиновом тесте были установлены изменения апоптотической реакции лимфоцитарных клеток у новорожденных с СДР, осложненном бактериальным сепсисом, в исходе заболевания. Нашими исследованиями впервые было установлено, что у новорожденных с СДР осложненных сепсисом по сравнению с группой контроля, регистрировалось достоверное повышение содержания моноцитов, находящихся на ранней ($AnnexinV^+$) и поздней ($AnnexinV^+PI^+$) стадии апоптоза (24,13±2,35 % против 13,24±0,27 % и 2,26±0,27 % против 0,97±0,06 %, соответственно) ($p<0,05$). Таким образом, нашими исследованиями установлено, что у новорожденных с септическими осложнениями относительное содержание $AnnexinV^+$ на моноцитах, значительно больше, чем у новорожденных без таковых. В условиях чрезмерной гибели моноцитов, иммунная система не может выполнять свою главную функцию осуществления иммунологического надзора, что приводит к развитию гнойно-септических осложнений и усугубляет синдром полиорганной недостаточности. Мониторинговое определение относительного содержания $AnnexinV^+$ на моноцитах, позволяет с высокой степенью вероятности диагностировать развитие неонатального сепсиса у новорожденных детей на доклинической стадии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дементьева Г. М., Рюмина И. И., Кушнарева М. В. Актуальные проблемы пульмонологии новорожденных / Г. М. Дементьева, И. И. Рюмина, М. В. Кушнарева // Рос. вест. перинатол. и педиатр.– 2001.– № 5.– С. 14-19.
2. Ярилин А. А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии / А. А. Ярилин; под ред. Б. Б. Мороза.– М., 2001.– С. 13-56.

AN EXPERIENCE OF USING OBJECTIVE DIAGNOSTIC CRITERIA OF NEONATAL SEPSIS IN NEWBORNS WITH THE RESPIRATORY FRUSTRATION

Dudareva M. V.[1], Sizjakina L. P.[2], Dudarev I. V.[2]

[1]Scientific research institute of obstetrics and pediatrics; [2]Rostov state medical university, Rostov-on-Don, Russia

In modern pediatrics the problem of early diagnostics of purulo-septic complications at newborns in critical states is complicated due to the development of systemic inflammatory reaction right after a birth of an infant manifesting in progressing respiratory insufficiency, increasing disturbance of haemodynamics and multiple organ failure. The immune system is sure to play the leading part in the development, clinical course and results of pyoinflammatory diseases. Therefore the research of objective, highly sensitive and specific markers for the early diagnostics of sepsis at newborns remains to be actual.

Keywords: newborns, sepsis, pyoinflammatory focus, bacteremia.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ХИМИОТЕРАПИИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Дуденко Е. В., Китаев М. И., Кадыров А. С., Сыдыкова С. С.

Национальный центр фтизиатрии МЗ КР, Бишкек, Кыргызстан

Выполнено изучение продукции цитокинов и результатов микробиологических исследований в процессе химиотерапии туберкулеза легких. Продукция провоспалительного ИЛ-6 показала снижение (p=0,05), а продукция провоспалительного ИЛ-8 повысилась (p=0,05) в процессе лечения. Таким образом, результаты указывают на возможность использовать изучение продукции ИЛ-6 и ИЛ-8 в качестве критерия контроля ответа иммунной системы на противотуберкулезную химиотерапию.

Ключевые слова: химиотерапия туберкулеза легких, цитокины.

Введение. Цитокины (ЦТ) являются медиаторами воспаления [1], влияющими на элиминацию *Mycobacterium tuberculosis* и служат для ограничения специфического процесса [2]. При нарушении сбалансированности продукции ЦТ развивается хроническое воспаление [3]. Таким образом, течение туберкулеза во многом определяется продукцией ЦТ и их соотношением [4]. Контроль эффективности химиотерапии туберкулеза легких (ТБЛ) осуществляется в основном с использованием микробиологических методов. Однако, контроль продукции ЦТ в процессе лечения может служить иммунологическим маркером выявления ответа иммунной системы на химиотерапию [5].

Цель. Изучение уровня цитокинов периферической крови в процессе химиотерапии больных туберкулезом легких.

Материалы и методы. В проспективное исследование на основе добровольного информированного согласия вошли 26 впервые выявленных больных ТБЛ. Диагноз подтвержден рентгенологическими, микробиологическими (бактериоскопия с окраской по Циль-Нильсену, посев на среду Левенштейна-Йенсена) и молекулярно-генетическими (полимеразная цепная реакция) методами. С использованием твердофазного иммуноферментного анализа ELISA проводилось количественное определение провоспалительных ИЛ-6, ИЛ-8 и про-

тивовоспалительных ИЛ-4, ИЛ-10 в сыворотке периферической крови при поступлении на лечение и через 2 месяца химиотерапии DOTS. Для постановки анализа использовались ридер «Stat Fax 2100» и наборы реактивов «Вектор-Бест». Определение цитокинового баланса проводилось в форме вычисления отношения суммы провоспалительных ЦТ к сумме противовоспалительных ЦТ.

С использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2010 выполнено вычисление выборочного среднего, стандартной ошибки и определен доверительный интервал при t=2,064. Результаты исследования ЦТ не отвечали параметрам нормального распределения выборки. Для определения статистической значимости различий использован непараметрический Т-критерий Вилкоксона для зависимых групп (p=0,05). Для выявления изменений результатов микробиологических методов использован тест Мак-Немара.

Результаты. Из общего количества обследованных больных: мужчин – 14 (53,85 %), женщин – 12 (46,15 %). Инфильтративный ТБЛ диагностирован у абсолютного большинства – 25 (96,15 %) из 26 больных, у одного (3,85 %) выявлен диссеминированный туберкулез.

При поступлении на лечение анализ мокроты с использованием полимеразной цепной реакции показал положительный результат у 21 (80,77 %) больного, посев на среду Левенштейна-Йенсена дал рост жизнеспособных микобактерий у 14 (53,85 %) пациентов, по результатам бактериоскопии 16 (61,54 %) из 26 обследованных больных ТБЛ оказались бактериовыделителями. Через два месяца интенсивной химиотерапии положительный результат посева выявлен у 7 (26,92 %), бактериоскопии – у 6 (23,08 %) из данных больных. Статистически значимых изменений при p=0,05 не обнаружено.

Продукция противовоспалительных интерлейкинов ИЛ-4 и ИЛ-10 в процессе лечения не показала статистически значимых изменений при $T_н$=141 и $T_н$=167 соответственно. Отмечена тенденция активизации продукции ИЛ-4 (0,70±0,14 пг/мл до лечения против 0,78±0,17 пг/мл после окончания интенсивного этапа химиотерапии). Секреция противовоспалительного ИЛ-10 изменилась от 3,03±0,60 пг/мл до 3,10±0,72 пг/мл.

Результаты изучения содержания провоспалительного ИЛ-6 выявили существенное снижение продукции данного ЦТ в процессе лечения (21,96±9,47 пг/мл при поступлении больных на лечение в стационар против 11,33±3,20 пг/мл через 2 месяца). Изменение показателя статистически значимо при $T_н$=90.

Уровень провоспалительного ИЛ-8, напротив, существенно увеличился в ходе химиотерапии (11,00±2,99 пг/мл до лечения и 23,50±10,98 пг/мл через 2 месяца лечения). Изменение показателя статистически значимо при $T_н$=69,5. Увеличение уровня ИЛ-8 на фоне противотуберкулезной химиотерапии свидетельствует о сохранении воспалительного процесса.

Цитокиновый баланс при поступлении больных ТБЛ в стационар составил 8,84 и через два месяца химиотерапии – 8,98. Таким образом, на фоне химиотерапии изменений цитокинового баланса не отмечено в результате разнонаправленности изменений активности секреции провоспалительных ЦТ и отсутствия существенной активации продукции противовоспалительных ЦТ.

Выводы. Результаты указывают на возможность использовать изучение изменения содержания провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 для контроля ответа иммунной системы на противотуберкулезную химиотерапию и в качестве дополнительного критерия лабораторного контроля эффективности противотуберкулезной химиотерапии при туберкулезе легких в сочетании с микробиологическими методами выявления микобактерий туберкулеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология.– 2012.– Т. 14, № 1-2.– С. 9-20.
2. Cardoso de Oliveira L.R. Analysis of toll-like receptors, inos and cytokine profiles in patients with pulmonary tuberculosis during anti-tuberculosis treatment / L.R. Cardoso de Oliveira, E. Peresi, M. de Assis Golim et al. // Plos one.– 2014.– V. 9, № 2.– P. 1-10.
3. Секачёва М.И., Буеверов А.О. Терапевтические возможности влияния на баланс цитокинов при заболеваниях кишечника и печени / М.И. Секачева, А.О. Буеверов // Русский медицинский журнал.– 2010.– № 5.– С. 40-42.
4. Yang Q., Cai Y., Zhao W. IP-10 and MIG are compartmentalized at the site of disease during pleural and meningeal tuberculosis and are decreased after antituberculosis treatment / Q. Yang, Y. Cai, W. Zhao // Clinical and vaccine immunology.– 2014.– V. 21, № 12.– P. 1635-1644.

5. Effect of standart tuberculosis treatment on plasma cytokine levels in patients with active pulmonary tuberculosis / C. Riou, B. P. Peixoto, L. Roberts et al. // Plos one.– 2012.– V. 7, № 5.– P. 1-12.

INVESTIGATION OF THE PRODUCTION OF CYTOKINES AND THE MYCROBIOLOGICAL CONTROL DURING CHEMOTHERAPY OF PULMONARY TUBERCULOSIS

Dudenko E. V., Kitaev M. I., Kadirov A. S., Sidikova S. S.

National center of the phthisiology MH KR, Bishkek, Kyrgyzstan

There has been studied the production of cytokines and results of microbiological investigations in the pulmonary tuberculosis chemotherapy. The production of pro-inflammatory IL-6 decreased (p=0,05), but the production of pro-inflammatory IL-8 increased (p=0,05) in the process of the treatment. Thus, the results of the study indicate the possibility to use the study of cytokines IL-6 and IL-8 as a criterion for the control of the answer of immunity on the chemotherapy.

Keywords: pulmonary tuberculosis chemotherapy, cytokines.

ДЕФЕКТЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МОНОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ПИЕЛОНЕФРИТАХ У ДЕТЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ПАТОГЕНАМИ

Агафонова Е. В.[1,2], Велижинская Т. А.[1,2]

[1]ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»;
[2]МСЧ ФГА АОУВО К(П) (РКБ N 2), Казань, Россия

Проведено изучение популяционного профиля и рецепторного аппарата моноцитов периферической у детей с вторичным хроническим пиелонефритом. Изучали субпопуляции $CD14^{++}CD16^{-}$, $CD14^{+}CD16^{+}$, $CD14^{+}HLADR^{+}$, $CD14^{+}11b^{+}$ и фагоцитарную активность моноцитов. Изменение субпопуляционного профиля моноцитов было связано со снижением субпопуляции $CD14^{+}CD16^{+}$ (“классические”) определяемой усиленной трансмиграцией в очаг хронического воспаления и повышением субпопуляции $CD14^{+}CD16^{+}$(“провоспали тельные”). Обсуждается вопрос о супрессорной функции $CD14^{++}CD16$. Изменение субпопуляционного профиля определяло нарушение функциональных характеристик клетки-антигенпредставляющей и фагоцитарной.

Ключевые слова: хронические пиелонефриты, моноциты, субпопуляции, функции.

Хронические пиелонефриты (ХП) занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваний мочевыводящей системы у детей. Персистенция бактериальных патогенов приводит к формированию нарушений иммунологической реактивности и развитие вторичных иммунных дисфункций. Несмотря на значительное число исследований по изучению иммунного статуса при ХП у детей, имеет место недостаточное внимание к системе моноцитов-макрофагов. В литературе имеется значительное количество исследований посвящённых изучению субпопуляционной и функциональной гетерогенности мононуклеарных фагоцитов, различающихся по экспрессии мембранных рецепторов и функциональным свойствам [1, 2]. Вместе с тем данные о функционировании моноцитов (М) при ХП ограничены сведениями о нарушении какой либо одной эффекторной функции [3].

Цель работы. Оценить значение дефектов функционирования М при ХП у детей

Обследованы дети с вторичным ХП (N=62) с непрерывно рецидивирущим течением заболевания. Возраст детей составил 3-14 лет, длительность заболевания от 3 до 8 лет. Вторичный дисметаболический вариант ХП диагносцирован у 20 (32,3 %) вторичный обструктивный у 25 (40,3 %) вторичный обструктивный дисметаболический у 17 детей (27,4 %). Этиологический спектр возбудителей был представлен *E. Coli* – у 61,9 %, *Ent. faecalis* – у 16,6 %, *Klebsiella* – у 11,9 %, *Enterobacter aglomerans* – у 4,2 %, *Sh. aureus* – у 2,4 %, *Sh. epidermidis* – у 2,4 % больных. В контроле обследована группа здоровых детей сопоставимых по полу и возрасту (N=29). На основе экспрессии мембранных рецепторов выделяли субпопуляции М – $CD14^{++}16^{-}$, $CD14^{+}16^{+}$, $CD14^{+}CD11b^{+}$, $CD14^{+}HLADR^{+}$ (метод ПЦФ). Оценку внутриклеточной биоцидности М изучали в спонтанном и индуцированном варианте НСТ теста, также оценивали – фагоцитарный индекс (ФИ) (*Sh. aureus*) и фагоцитарное число (ФЧ) на этапах 10 и 60 мин инкубации (ФИ 10, ФЧ 10, ФИ 60, ФЧ 60) для оценки ранних и поздних этапов фагоцитоза. Рассчитывали % переваривания на этапе 10 минутной инкубации (% П 10), % перевариваривания на этапе 60 минутной инкубации (% П 60). Рассчитывали интегральные показатели – коэффициент фагоцитарного индекса (КФИ- ФЧ 10/ ФЧ 60), характеризующий скорость фагоцитоза и коэффициент эффективности фагоцитоза (КЭФ-%П 60/% П10 х 10), отражающий завершённость фагоцитоза [4]. Статистическую обработку полученных проводили в математическом пакете Statistica 6. Применяли корреляционный анализ, методы вариационной статистики с расчетом среднего арифметического (М), доверительного интервала (m), t-критерия Стьюдента.

Изучение субпопуляционного профиля М выявило выраженные изменения в структуре циркулирующего пула. В группе детей с ХП имело место увеличение субпопуляции $CD14^{+}$ $CD16^{+}$ (8,06 %; $257,3\times10^{6}$/л, $p<0,05$ $p<0,05$), что отражает наличие инфекционного процесса в тубулоинтерстициальной системе почек. М $CD14^{+}CD16^{+}$ секретируют ИЛ-1, -6, TNF-α, но не ИЛ-10, их повышение при хронических заболеваниях ассоциируется с активностью воспалительного процесса [1, 2]. Однако при ряде иммунопатологических состояний М $CD14^{+}CD16^{+}$ проявляют регуляторную/супрессорную активность, обусловленную продукцией IL-10 на фоне снижения продукции IFN-γ [5]. Возможно, дихтомия регуляторной активности М обусловлена особенностями их активации, при этом М с супрессорными функциями характеризуются снижением экспрессии антигенов гистосовместимости 2 класса [1, 2, 5]. Содержание $CD14^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ в группе больных с ХП снижалось (77,16±5,04 %; $246,3\pm21,3\times10^{6}$/л, $p<0,05$), что свидетельствует о нарушении экспрессии ко-стимуляторных молекул и может быть причиной дефекта антигенпрезентирующей функции [5], отражая формирование ВИН. Выявлены обратные корреляции – $CD14^{+}HLADR\%^{+}$-$CD14^{+}16^{+}\%$ ($r=-0,48$, $p<0,05$), $CD14^{+}HLADR^{+}\times10^{6}$/л 10-$CD14^{+}CD16^{+}\times10^{6}$/л ($r=-0,58$; $p<0,001$), что указывает на возможную роль субпопуляции $CD14^{+}CD16^{+}$ в супрессии иммунного ответа у детей с ХП. Содержание $CD14^{++}CD16^{-}$ М снижалось (89,26;$284,2\times10^{6}$/л; $p<0,05$ $p<0,05$). Имела место взаимосвязь между содержанием $CD14^{++}CD16^{-}$ и абсолютным содержанием М ($r=-0,58$, $p<0,05$). Абсолютная моноцитопения при ХП у детей т.о., определялась снижением в циркуляции субпопуляции $CD14^{++}CD16^{-}$. Повышенная экспрессия адгезионных молекул эндотелием кровеносных сосудов приводит к притоку и связыванию циркулирующих М в очаге воспаления [2]. При ХП у детей нами выявило снижение субпопуляции $CD14^{+}CD11b^{+}$, ($52,3;166,9\times10^{6}$; $p<0,05$). По видимому, снижение М экспрессирующих интегриновые рецепторы связано с истощением фракции М за счет притока их в тубулоинтерстициальную ткань в условиях хронического воспаления. Подтверждением наших исследований являются данные о последовательном рекрутировании субпопуляций М в почки при инфекциях МВП – так, на этапе острого воспаления рекрутируется субпопуляция провоспалительных, на этапе хронического – субпопуляция классических М [3]. Т.о., изменение субпопуляционного профиля М при ХП за счет повышенной миграции и нарастания доли провоспалительных/супрессорных М приводит к отрицательной регуляции воспаления в тубулонтерстициальной ткани почки и способствует прогрессированию патологии. Выявлено достоверное повышение спонтанной биоцидности (31,88 %; $p<0,05$), что отражает индуцированный бактериальными патогенами респираторный взрыв. Уровень инд. биоцидности у детей с ХП имел тенденцию к снижению, на фоне чего регистрирова-

лось достоверное снижение ФР (15,40; p<0,05). При изучении показателей характеризующих захват бактериального патогена регистрировалось достоверное нарастание ФИ 10 (35,92 %; p<0,05) и снижение ФИ 60 (44,83 %; p<0,05). АФИ 10 достоверно не отличался от группы контроля, АФИ 60 угнетался в группе больных детей (в 1,7 раза, p<0,001). ФЧ 10 достоверно не отличался от группы контроля, ФЧ 60 снижалось (5,06 %; p<0,05). Таким образом, снижение скорости фагоцитоза в группе больных ХП (КФЧ 1,48; p<0,05) преимущественно было связано с угнетением захвата патогена на поздних, при активации ранних этапах фагоцитоза. На поздних этапах фагоцитоза снижение скорости сочеталась с угнетением переваривания –% П 60-55,77 %; p<0,05) что приводило к снижению эффективности фагоцитоза (КЭФ-2,18; p<0,05). Показатели характеризующие способность к киллингу патогенов (ФР,% П 60, КЭФ) были достоверно снижены в группе больных с ХП (15,40; 55,77; 2,18; p<0,05, p<0,05, p<0,05) по сравнению с группой контроля. Изучение корреляций между изучаемыми субпопуляциями М и показателями характеризующими фагоцитарную активность М в группе здоровых выявило наличие прямых взаимосвязей между субпопуляцией $CD14^{+}CD16^{-}$ АФИ 10 (r=0,56 p<0,05), АФИ 60 (r=0,67 p<0,050), НСТ сп (r=0,06 p<0,05) и $CD14^{+}CD16^{+}$ с АФИ 10(r=0,56 p<0,05), АФИ 60 (r=0,56 p<0,05), НСТ ст (r=0,56 p<0,05) что свидетельствует в пользу того что обе субпопуляции сопоставимо осуществляют захват и киллинг патогена на ранних и поздних этапах в группе здоровых детей. В группе больных выявлены корреляции $CD14^{+}CD16^{-}$-АФИ10 (r=0,56, p<0,05), АФИ60 r=0,46 p<0,05) %П (r=0,56, p<0,0). Для субпопуляции "провоспалительных" М достоверных взаимосвязей с фагоцитарными показателями не выявлено. Т.о., снижение фагоцитарной активности М преимущественно на поздних этапах фагоцитоза связано с изменением субпопуляционного профиля М, дифференцировкой $CD14^{+}16^{+}$ в направлении тканевых макрофагов с усилением антигенпредставляющей и лимитированием фагоцитарной активности. Таким образом, М периферической крови претерпевая морфологические, фенотипические и функциональные изменения играют определенную роль в негативной регуляции воспаления в тубулоинтерстициальной ткани почек при ХП у детей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets / T. Tallone, G. Turconi, G. Soldati et al. // J Cardiovasc Transl Res.– 2011.– V.4 (2).– P. 211-219.
2. Heterogeneity of human blood monocytes: two subpopulations with differents sizes, phenotypes and function / S.Y. Wang, K.L. Mak, L.Y. Chen et al. // Immunol.– 2009.– V. 77.– P. 298-303.
3. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation / A. Ingersoll Molly, M. Platt Andrew, Potteaux Stephane et al. // Trends Immunol.– 2011.– V. 32 (10).– P. 470-473.
4. Роль системы мононуклеарных фагоцитов при различных вариантах бронхитов у детей раннего возраста / Н.А. Тамбова, В.В. Софронов, Е.В Агафонова и др. // Российский педиатрический журнал.– 2007.– № . 5.– С. 16-18.
5. Identification of an IL-10 producting HLADR negative monocyte subset in the malignat ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expressions and proliferations of autologous T cells / A.E. Loercher, M.A. Nask, J.J. Kavahagh et al. // J. Immunol.– 2009.– V. 163.– P. 62-71.

DEFECTS IN THE OPERATION MONOCYTES CHRONIC PYELONEPHRITIS IN CHILDREN ASSOCIATED WITH BACTERIAL PATHOGENS

Agafonova E.V.[1,2], Velizhinskaya T.A.[1,2]

[1]Kazan State Medical University; [2]NFM PHA AOUVO K (P) (N RCH 2), Kazan, Russia

The study population profile and the receptor apparatus of peripheral monocytes in children with secondary chronic pyelonephritis. Studied subpopulations $CD14^{++}$ $CD16^{-}$, $CD14^{+}$ $CD16^{+}$, $CD14^{+}$ $HLADR^{+}$, $CD14^{+}$ $CD11b^{+}$ and phagocytic activity of monocytes. Changing Profile subpopulation of monocytes was associated with a decrease in the subpopulation of $CD14^{+}CD16^{+}$ ("classic") determines the gain transmigration into a hotbed of chronic inflammation and an increase in the subpopulation of $CD14^{+}CD16^{+}$ ("pro-inflammatory"). The question of the suppressor function of $CD14^{++}CD16$. Change subpopulation profile defines the functional characteristics of the violation antigen-presenting and phagocytic.

Keywords: chronic pyelonephritises, monocytes, subpopulations, functions.

Раздел 7
ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ И ИММУНОКОРРИГИРУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ. ВОПРОСЫ БЕЗОПАСНОСТИ, СВЯЗАННЫЕ С ИММУНОГЕННОСТЬЮ

Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Олефир Ю.В., Бондарев В.П.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

«Нежелательная» иммуногенность современных биотехнологических препаратов влияет на их фармакокинетические свойства, безопасность и эффективность. Продемонстрированы некоторые клинические проявления развития нежелательного иммунного ответа на введение препарата.

Ключевые слова: реакции гиперчувствительности, побочные реакции, моноклональные антитела, иммуногенность, безопасность препаратов.

Терапевтическое применение биотехнологических препаратов (гормоны, цитокины, моноклональные антитела (МкАТ), факторы свертывания крови и др.) часто сопровождается выработкой антител (АТ) к препаратам, что может оказывать влияние на фармакокинетические свойства, безопасность и эффективность их применения. Наиболее опасными осложнениями, обусловленными иммуногенностью, являются аллергические и реакции на введение (реакции гиперчувствительности).

В первых исследованиях ксенотрансплантации свиных органов человеку было установлено, что среди структур живой природы 4 соединения не встречаются у человека, к ним относятся – α-Gal (галактоза – α1, 3 – галактаза), Neu5Gc (N-гликолилнейраминовая кислота), β1, 2 – ксилоза и α1, 3 фукоза. Присутствие указанных структур в препарате может инициировать развитие иммунной реакции. Некоторые клеточные линии, применяемые для получения препаратов (например, SP2/O), продуцируют МкАТ, содержащие в своей структуре α-Gal гликаны. Для лечения рака был разработан препарат цетуксимаб (МкАТ к рецептору эпидермального фактора роста), в котором присутствуют α-Gal гликаны. При проведении его клинических исследований у 32,8 % больных отмечено развитие аллергических реакций немедленного типа. α-Gal гликаны встречаются в белках многих видов животных, поэтому достаточно часто среди населения отмечается сенсибилизация к данному соединению. У 68 % больных, с реакциями гиперчувствительности, АТ к α-Gal гликанам определялись до начала лечения цетуксимабом. АТ, вызывающие развитие анафилактических реакций, характеризуются высокой специфичностью. В частности, зарегистрированы случаи анафилактических реакций на базиликсимаб (химерные МкАТ к CD 25 – α-цепь рецептора ИЛ-2), но ни у одного пациента на последующее введение даклизумаба (гуманизированые МкАТ к CD25) аллергические реакции не наблюдались [1].

Иммуноглобулины Е являются ключевой молекулой развития IgE-зависимой аллергической реакции. Для лечения бронхиальной астмы разработан препарат омализумаб (гуманизированные МкАТ к IgE), при клинических исследованиях у 0,1-0,2 % больных были зарегистрированы реакции гиперчувствительности. Механизм развития анафилаксии на препарат остается пока неясным. Некоторые исследователи предполагают, что входящий в состав препарата стабилизатор полисорбат инициировал формирование АТ к препарату, вызвавших развитие анафилаксии, по аналогии с механизмом

развития красноклеточной аплазией на эритропоэтины и дарбпоэтины. Другие исследователи считают, что у больных аллергией до приема препарата уже имелись антиидиотипические АТ к IgE или омализумабу, которые привели к развитию анафилаксии. При распознавании Т-клетками эпитопа в препарате аллергические реакции развиваются по механизму классического иммунного ответа [3].

Выработка АТ к препарату не всегда сопровождается развитием побочных реакций. Например, применение препарата адалимумаб при ревматоидных заболеваниях приводит к образованию АТ у 68 % больных, но АТ не вызывают развитие реакций гиперчувствительности. Однако эти АТ приводят к снижению эффективности препарата. Отмечено, что в редких случаях (у больных с болезнью Крона) АТ к препарату вызывали развитие тяжелой формы сывороточной болезни, васкулита или нефрита.

Индуцированные введением белковых препаратов АТ могут быть нейтрализующими или не-нейтрализующими. Указанные АТ могут вырабатываться как к препаратам МкАТ на основе чужеродных, химерных, гуманизированных, так и полностью человеческих Ig. При изучении выработки АТ к препаратам при лечении псориаза у 7969 больных, АТ выявлены у 950 человек (11,9 %). При лечении инфликсимабом АТ определялись в 5,4-43,6 %, этанерсептом – 0-18,3 % и адалимумабом – 6-45 % случаев. Отмечено, что наличие АТ при применении инфликсимаба и адалимумаба ассоциировалось со снижением концентрации препарата в сыворотке крови и снижением эффективности терапии, АТ к этанерсепту не влияли на его эффективность [3].

АТ могут вырабатываться не только к определенному эпитопу препарата, но и к комплексу препарат – мишень. При применении препарата абциксимаб (химерный Fab-фрагмент, специфичный к гликопротеину IIb/IIIa – GPIIb/IIIa) АТ могут вырабатываться к С-концевому участку Fab-фрагмента, которые не влияют на эффективность препарата. Lajus с соав. установили, что АТ вырабатываются не только к препарату, но и к новому эпитопу, который образуется при формировании комплекса абциксимаба с GPIIb/IIIa на мембране тромбоцитов, что может сопровождаться развитием тромбоцитопении [4].

На развитие иммунного ответа на препараты влияют состояние системы иммунитета пациента и сопутствующая терапия. Начало лечения больных гемофилией А препаратом VIII фактора свертывания крови (фVIII) может вызвать активацию Th2 пути иммунного ответа с образованием IgG4 АТ к фVIII, обладающих нейтрализующей активностью. Так как АТ блокируют активность фVIII, больного переводят на комплексную терапию, включающую иммуносупрессирующие препараты. Это вызывает активацию уже Th1 пути иммунного ответа с выработкой IgG1 и IgG2 АТ к фVIII. Эффективность препаратов фVIII при выработке IgG1 и IgG2 выше, чем при IgG4 АТ [5]. На частоту выработки АТ к препарату также влияют особенности патологического процесса и сопутствующего лечения. Например, АТ к ритуксимабу определяются в 1,1 % случаев при лечении неходжинской лимфомы, в 11 % случаев при лечении ритуксимабом в сочетании с метотрексатом и в 23 % случаев при лечении гранулематоза ритуксимабом в сочетании с глюкортикоидами.

АТ к препарату вызывают не только снижение эффективности и развитие побочных реакций, но могут образовывать иммунные комплексы, вызывающие токсические эффекты. В процессе лечения уровень АТ к препарату может снизиться или вообще исчезнуть в результате развития иммунологической толерантности. Формирование АТ к препарату не всегда сопровождается снижением эффективности, в некоторых случаях отмечается повышение эффективности. При лечении препаратом Lym-1 (мышиные МкАТ против лимфомы) определялись высокие титры АТ к препарату, которые положительно коррелировали с показателями выживаемости больных, предполагается, что вырабатываемые против Lym-1 идиотипические АТ усиливают цитотоксические свойства антилимфомных АТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Solensky R., Khan D. A. Drug Allergy: An Updated Practice Parameter / R. Solensky, D. A. Khan // Annals of allergy, asthma & immunology.– 2010.– V. 105.– P. 273 e1-e78.
2. Shankara T., Petrov A. A. Omalizumab and hypersensitivity reactions / T. Shankara, A. A. Petrov // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.– 2013.– V. 13.– P. 19-24.
3. Hsu L., Snodgrass B. T., Armstrong A. W. Antidrug antibodies in psoriasis: a systematic review. / L. Hsu, B. T. Snodgrass, A. W. Armstrong // British J. of Dermat.– 2014.– V. 170.– P. 261-273.

4. Thrombocytopenia after abciximab use results from different mechanisms / S. Lajus, G. Clofent-Sanchez, C. Jais et al. // Thromb Haemost.– 2010.– V. 103.– P. 651-661.
5. Reding M. T. Immunological aspects of inhibitor development / M. T. Reding // Haemophilia.– 2006.– № 12.– P. 30-35.

BIOTECHNOLOGICAL MEDICAL PRODUCTS. THE SAFETY ISSUES CONNECTED WITH IMMUNOGENICITY

Soldatov A. A., Avdeeva Zh.I., Alpatova N. A., Olefir Yu.V., Bondarev V. P.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

«Adverse» immunogenicity modern biotechnological preparations influence the pharmacokinetics, safety and efficacy. Demonstrate some of the clinical manifestations of an undesirable immune response on administration of the preparations.

Keywords: hypersensitivity reactions, adverse reactions, monoclonal antibody, immunogenicity, safety products.

ИММУНОГЕННОСТЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ. ПРИЧИНЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ

Авдеева Ж. И., Солдатов А. А., Олефир Ю. В., Меркулов В. А., Бондарев В. П.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Отражены вопросы безопасности клинического применения биотехнологических лекарственных препаратов, связанных с проявлением их нежелательной иммуногенности; проанализированы факторы, влияющие на иммуногенный потенциал препаратов и современные подходы к его снижению.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, «нежелательная» иммуногенность, факторы риска, биотехнологические препараты.

Среди биологических лекарственных средств выделяют группу к которой относят препараты рекомбинантных цитокинов, эритропоэтины, факторы роста, гормоны, интерфероны, моноклональные антитела (МкАТ), препараты модифицированных МкАТ, вакцины на основе рекомбинантных белка (HBsAg, белки вируса папилломы) и др. Для вакцин иммуногенность является проявлением их фармакологического/биологического действия, которое реализуется за счет формирования иммунного ответа на чужеродные структуры, распознаваемые иммунной системой. Формирование специфических антител или клеток-эффекторов клеточного иммунного ответа при применении других препаратов, используемых в терапевтических целях, частности на основе рекомбинантных белков, является проявлением их нежелательной иммуногенности. Последствия формирования иммунного ответа различны – от отсутствия клинических проявлений до потери эффективности действия препарата или развития тяжелых, угрожающих жизни состояний. Исследования по изучению потенциальной иммуногенности препаратов, включая использование соответствующего

вида животных, являются обязательными на этапе доклинических исследований. Однако результаты таких исследований недостаточно информативны и имеют ограниченное значениев плане прогнозирования иммуногенности при клиническом применении препарата.Только результаты клинических исследований дают возможность адекватно оценить иммуногенный потенциал конкретного лекарственного препарата при определенном заболевании и используемой схеме применения [1,2]. Вопросы доклинической и клинической оценки иммуногенности биотехнологических лекарственных препаратов и препаратов МкАТ отражены в документах Европейского медицинского агентства по лекарственным средствам (EMA) и отечественном руководстве [3-5]. Выделяют следующие факторы риска проявления потенциальной иммуногенности биотехнологических препаратов, включая препараты МкАТ:

- свойства белка действующего вещества – чужеродные последовательности, Т – и В-клеточные эпитопы, структурная целостность молекулы белка, посттрансляционные модификации белка, продукты окисления, дезамидирования и др.;
- биологические свойства препарата – особенности связывания антигенпрезентирующими клетками (АПК), специфическое биологическое действие (фармакологические свойства) препарата;
- наличие и состав примесей, связанных с производством препарата – остаточное содержание белков клеток-хозяина; ДНК клеток-продуцента; реагентов, используемых в процессе производства; бактериальных эндотоксинов и др.;
- совместимость компонентов препарата с вспомогательными веществами и материалом первичной упаковки; условия хранения и транспортирования препарата; состав; формирование агрегатов;
- особенности и схема применения препарата – частота приема; доза и длительность применения; соблюдение установленной схемы применения;
- патология – особенности основного заболевания; наличие сопутствующих заболеваний; препараты сопутствующей терапии;
- популяция пациентов – особенности популяции пациентов; исходное содержание антител к препарату; особенности реактогенности организма.

Для снижения иммуногенной активности препаратов используют различные подходы. Для того, чтобы исключить возможность формирования антител к лекарственному препарату изначально на белковой молекуле идентифицируют Т- и В-клеточные эпитопы и затем удаляют их путем точечного мутагенеза, изменяя аминокислотную последовательность указанного участка, т.е. вносят коррекцию в структуру молекулы белка, снижая его иммуногенный потенциал.

Например, для снижения иммуногенности препаратов VIII фактора свертывания крови удаляют В домен молекулы белка, содержащий эпитопы, распознаваемые Т-клетками, который не влияет на специфическую активность препарата, но при этом значительно повышается стабильность молекулы и снижается иммуногенность препарата. В молекуле инфликсимаба (химерные МкАТ к фактору некроза опухолей альфа – ФНОα) выявлено шесть Т-клеточных эпитопов, из которых 4 расположены в вариабельной области иммуноглобулина (Ig) и 2 – в константной; при этом 3 из установленных эпитопов, расположены в области связывания ФНОα (CDR участок). Антитела, вырабатываемые к данным эпитопам, обладают высокой специфичностью. Следует отметить, что антитела, вырабатываемые против инфликсимаба, не взаимодействуют с адалимумабом (человеческие МкАТ к ФНОα). Использование компьютерного моделирования (insilico) может помочь в идентификации Т-клеточных эпитопов, однако оно не может в полной мере прогнозировать проявление иммуногенности при клиническом использовании лекарственных препаратов.

Другим направлением снижения иммуногенности является модификация белковой молекулы за счет изменения профиля гликозилирования, пегилирования, получение отдельных фрагментов белковой молекулы, в частности иммуноглобулина (Ig) МкАТ и др. Подобные модификации могут как экранировать отдельные эпитопы, снижая иммуногенный потенциал препарата, так и обнажать скрытые эпитопы, в связи с этим модифицированные препараты требуют тщательной оценке их иммуногенности.

Подход, основанный на минимизации или устранении в структуре Ig человека аминокислотных последовательностей иного видового происхождения (в частности, грызунов),

направленный на снижение иммуногенности МкАТ, снижает риск развития иммунного ответа, однако не позволяет предотвратить его полностью. Химерные, гуманизированные и полностью человеческие МкАТ характеризуются последовательным снижением иммуногенности, однако у части пациентов антитела формируются и на препараты МкАТ на основе Ig человека. Необходимо отметить, что подкласс Ig, на основе которого разработан препарат МкАТ, влияет на физико-химические свойства препарата, в частности указывается, что IgG2 и IgG4 более склонны к агрегации в отличие от IgG1. Существенное значение оценке иммуногенного потенциала должно быть уделено при разработке и регистрации биоподобных (биоаналогичных) лекарственных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The European Medicines Agency Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (EMEA/CHMP/BMWP/49348/2005).
2. The European Medicines Agency (2012). Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010).
3. The European Medicines Agency (2008). Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins (EMEA/CHMP/BMWP/14327/ 2006).
4. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I / А. Н. Миронов, В. И. Петров, В. А. Меркулов и др.; М.: Гриф и К, 2013.– 328 с.
5. The European Medicines Agency (2012). Immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for *in vivo* clinical use (EMA/CHMP/BMWP/86289/2010).

IMMUNOGENICITY BIOTECHNOLOGICAL MEDICAL PRODUCTS. THE REASONS AND OVERCOMING PROSPECTS

Avdeeva Zh.I., Soldatov A.A., Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Bondarev V.P.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Safety issues of clinical application of the biotechnological medical products connected with their display undesirable immunogenicity are reflected; the factors influencing on immunogenic potential of preparations and modern approaches to its decrease are analysed.

Keywords: recombinant protein, undesirable immunogenicity, risk factors, biotechnological products.

АНАЛИЗ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ ЛАЗЕРА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ В ТЕРАПИИ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ

Гизингер О.А.[1], Зиганшин О.Р.[1], Шеметова М.А.[1], Москвин С.В.[2]

[1]ГБОУ ВПО Южно-Уральский медицинский университет, Челябинск;
[2]ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА», Москва, Россия

В исследовании длительностью 12 месяцев приняло участие 90 женщин (30,9±0,4 года) с клинико-лабораторными признаками герпетического поражения мочеполовой системы. Этиотропная терапия включала Валацикловир по 500 мг один раз в день, комплексная терапия проводилась с использованием внутрисосудистого лазерного облучения крови (длина волны 365 нм, мощность излучения 2 мВт, экспозиция освечивания 8 мин., количество сеансов – 15) одновременно с применением Валацикловира. Результаты исследования указывают на наличие иммуномодулирующего действия внутрисосудистого лазерного облучения крови, что позволяет рекомендовать лазеротерапию для комплексной терапии герпетического поражения мочеполовой системы.

Ключевые слова: лазер низкой интенсивности, генитальный герпес, мочеполовая система.

Актуальность. Разработка эффективных средств терапии герпетической инфекции вызывает особый интерес у врачей и исследователей [4]. Имеющиеся антивирусные препараты для лечения и борьбы с ВПГ 1 и 2 типов, обладают одинаковым в количественном отношении механизмом действия. Они влияют на процесс избирательного фосфорилирования в инфицированных ВПГ клетках и конкурентного субстратного ингибирования полимеразы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), ведущей к окончанию считывания цепи ДНК вируса, отличаясь лишь специфичностью и сродством к ферментам вируса-мишени, однако их применение не всегда сопровождается ожидаемым противовирусным эффектом, что, по мнению ряда авторов связано с явлениями резистентности к противовирусным препаратам [4]. Перспективным подходом к решению данной проблемы может являться применение низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в качестве неспецифического физического фактора, стимулирующего функциональную активность эффекторов иммунного ответа, клеток с широким функционалом и потенциалом по осуществлению иммунобиологического надзора в общей системе гомеостаза [3].

Цель. Изучить иммунологическую эффективность внутрисосудистой лазеротерапии в комплексном лечении герпетических поражений мочеполовой системы.

Методы. Исследования проведены на базе клинико-диагностической лаборатории областного клинического кожно-венерологического диспансера (главный врач д.м.н, О. Р. Зиганшин), медицинского центра «Ситимед» (г. Челябинск), лаборатории «Прогрессивные медицинские технологии» (г. Челябинск). Пациентам был выставлен диагноз А.60.0 (МКБ-10)-Герпетическая инфекция половых органов и мочеполового тракта, рецидивирующее течение, средняя степень тяжести. Методом проточной цитофлюориметрии исследовали субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови с помощью набора моноклональных антител. В процессе исследования было определено абсолютное и относительное содержание $CD3^+$-, $CD4^+$-, $CD8^+$- $CD16^+$- $CD19^+$-$HLA\text{-}DR^+$-клеток, $CD3^-HLA\text{-}DR^+$-, $CD3^+HLA\text{-}DR^+$-, $CD3^-CD16^+$- $CD3^+CD16^+$-клеток. Оценку фагоцитарных возможностей нейтрофилов периферической крови определяли на модели поглощения частиц латекса, внутриклеточный кислородзависимый метаболизм нейтрофилов периферической крови изучали в НСТ-тесте с одновременным определением способности нейтрофилов отвечать повышением метаболической активности на стимуляцию частицами латекса и подсчетом функционального резерва нейтрофилов (ФРН) [1, 2]. Определение концентрации иммуноглобулинов и цитокинов в сыворотке крови проводилось с использованием соответствующих тест-систем для иммуноферментного анализа (ООО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Статистический анализ данных проводился при помощи пакета статистических программ STATISTICA 12.5 (StatSoft, 2014), статистически достоверными считались значения $p<0,05$.

Результаты. Оценка состояния факторов врожденного и адаптивного иммунитета периферической крови показала достоверное увеличение общего числа лейкоцитов, жизнеспособных нейтрофилов, угнетение активности НГ в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте, снижение функционального резерва нейтрофилов, нарушение продукции цитокинов, иммуноглобулинов, нарушение рецепторного пейзажа на лимфоцитах периферической крови женщин с генитальным герпесом. Сравнительный анализ динамики иммунологических показателей после проведенной комплексной терапии с применением ВЛОК выявил достоверные положительные изменения иммунологических показателей периферической крови: восстановление количественного и субпопуляционного состава лейкоцитов. Показана нормализация межклеточных взаимоотношений субпопуляций Т-лимфоцитов. Она проявлялась в повышением относительного количества $CD3^+$-клеток, иммунорегуляторного индекса, увеличением относительного и абсолютного количества $CD4^+$-, $CD3^-CD16^+$-, $CD3^-CD16^+$-$CD3^+HLA\text{-}DR^+$-клеток. Это приводило к увеличению количества иммунокомпетентных клеток в крови, нормализации роста поглотительной способности нейтрофилов по тесту с латексом, восстановление биоцидной функции этих клеток по НСТ-тесту, функционального резерва, содержания в сыворотке крови IgA, Ig M, уровня ИФН-гамма в крови. При изучении фагоцитарной активности и активности нейтрофилов в НСТ-тесте по их способности поглощать микросферы латекса и восстанавливать нитросиний тетразолий, было установлено снижение изучаемых показате-

лей до лечения и восстановление после проведённой комплексной терапии. Таким образом, применение внутрисосудистого лазерного облучения крови в терапии генитального герпеса приводит к полному или частичному восстановлению количественного и качественного состава нейтрофилов периферической крови. Восстанавливалась их поглотительная способность и кислород-зависимогый метаболизм. Отмечено повышение активности фагоцитов периферической крови по их способности захватывать частицы латекса и генерации активных форм кислорода, выраженной в повышении активности фагоцитоза нейтрофилов на 16 %, интенсивности фагоцитоза на 38 %, усилении активности нейтрофильных гранулоцитов в спонтанном НСТ-тесте на 34 %, усилении интенсивности спонтанного НСТ-теста на 19 %, увеличению функционального резерва нейтрофилов на 26 %, увеличению содержания интерферона гамма на 87 %, увеличению содержания иммуноглобулина А на 29 %. Выявленная положительная динамика иммунологических показателей свидетельствует о восстановлении потенциала факторов врождённого и адаптивного иммунитета у женщин, получавших комплексную терапию с использованием внутрисосудистого лазерного облучения крови. Анализ иммунологических показателей после проведенной комплексной терапии без использования лазеротерапии не выявил восстановления количественного и субпопуляционного состава лейкоцитов крови, нормализации субпопуляций Т-лимфоцитов, восстановления функционального статуса нейтрофилов периферической крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы и факторы мукозального иммунитета: Дисс. … докт. биол. наук.– Челябинск.– 2010.– 356 с.
2. Гизингер О. А., Летяева О. И., Долгушин И. И. НАДФ-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция лазером низкой интенсивности / О. А. Гизингер, О. И. Летяева, И. И. Долгушин // Южно-Уральский медицинский журнал.– 2015.– № 2.– С. 11-15.
3. Зиганшин О. Р. Сравнительная клинико-иммунологическая характеристика и оценка эффективности цитокиновой терапии воспалительных заболеваниях половой системы у мужчин. Автореферат дис… д-ра мед. наук. Челябинск, 2002.
4. Летяева О. И., Гизингер О. А., Зиганшин О. Р. Генитальный герпес: долгосрочные подходы к терапии «пожизненной инфекции»/ О. И. Летяева, О. А. Гизингер, О. Р. Зиганшин // Клиническая дерматология и венерология.– 2013.– №. 6.– С. 61-66.
5. Москвин С. В. Эффективность лазерной терапии / С. В. Москвин.– М., 2014.– 896 с.

ANALYSIS IMMUNOMODULATORY EFFECT OF LOW INTENSITY LASER THERAPY IN HERPESVIRUS INFECTIONS OF THE GENITOURINARY SYSTEM

Gizinger O. A.[1], Ziganshin O. R.[1], Semenova M. A.[1], Moskvin S. V.[2]

[1]South Ural State Medical University, Chelyabinsk; [2]State Research Center of Laser Medicine, Moscow, Russia

90 women at the age of 30,9±0,4 years with clinical laboratory signs of herpetic defeat of urogenital system took part in research lasting 12 months.Therapy included a preparation Valaciclovir on 500 mg ., complex therapy was carried out with use of intra vascular laser radiation of blood (wavelength of 365 nm, power of the radiation of 2 mW, an influence exposition the laser of 8 min., the number of sessions-15) along with application of a preparation Valaciclovir.Results of the study indicate a positive clinical dynamics and immunomodulatory action of intravascular laser irradiation of blood that can be recommended as a method of complex treatment of herpetic lesions of the reproductive system.

Keywords: low-intensity laser, genital herpes, urogenital system.

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ), БАКТЕРИЙ И ИХ СУПЕРНАТАНТОВ

Зурочка А. В.[1,2], Зурочка В. А.[1,2], Зуева Е. Б.[1], Добрынина М. А.[1], Дукарт В. В.[1], Белозерцева Ю. В.[3], Тяпаева Я. В.[3], Гриценко В. А.[4]

[1]Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург; [2]Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск; [3]Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург; [4]Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

В экспериментах *in vitro* изучено влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2), 20 клинических изолятов *S. aureus* (n=10) и *S. epidermidis*(n=10) и супернатантов их бульонных культур, в том числе в разных комбинациях, на секрецию 17 цитокинов нейтрофилами периферической крови 10 здоровых доноров. Показано, что синтетический пептид ZP2 стимулировал секрецию нейтрофилами большинства цитокинов. Установлено, что живые клетки *S. Aureus*, достоверно стимулировали продукцию нейтрофилами цитокинов G-CSF, IL-10, IL-17A, IL-1β, IL-2 и TNF-α, ингибировали секрецию IL-6, тогда как взаимодействие клеток с *S. epidermidis* сопровождалось снижением продукции цитокинов IL-17A, IL-6, IL-8 и MIP-1β. Выявлена вариабельность эффектов метаболитов стафилококков, с учетом их видовой принадлежности на секрецию цитокинов нейтрофилами. Охарактеризованы особенности сочетанного воздействия синтетического пептида ZP2 с живыми стафилококками и их метаболитами на секрецию нейтрофилами цитокинов. Полученные результаты указывают на сложный характер взаимоотношений фагоцитов, стафилококков разных видов и их метаболитов с вовлечением в этот процесс широкого спектра цитокинов, способных оказывать существенное влияние на течение и исход воспалительного процесса, в том числе при развитии эндогенных инфекций стафилококковой этиологии.

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), пептид активного центра, стафилококки, нейтрофилы, цитокины.

Типичным ответом на бактериальную агрессию является воспалительная реакция, в формировании которой активное участие принимают клетки иммунной системы, прежде всего фагоциты (нейтрофилы и макрофаги), синтезирующие регуляторные молекулы – цитокины. К последним, в частности, относится гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), стимулирующий пролиферацию и дифференцировку клеток миелоидного диферона [1]. Однако результаты недавних исследований показали, что ГМ-КСФ и синтетические пептиды его активного центра, в том числе пептид ZP2, помимо основной функции, обладают плейотропным эффектом в виде иммуномодулирующей, репарационной и антибактериальной активности [2], что определяет перспективность их использования в клинической практике, в частности при лечении эндогенных бактериальных инфекций разной локализации [3].

Особого внимания, заслуживает вопрос о влиянии стафилококков и продуктов их метаболизма на продукцию цитокинов нейтрофилами. Указанные бактерии, в том числе *Staphylococcus aureus* и коагулазоотрицательные

стафилококки (КОС), являются доминирующими в структуре возбудителей ряда распространенных инфекционно-воспалительных заболеваний эндогенной природы [3], а данные эффекторные клетки иммунной системы одними из первых вступают в контакт с патогенами. С другой стороны, важно иметь четкие представления о реакции нейтрофилов на совместное/сочетанное действие цитокинов, бактерий и их метаболитов, так как в условиях *in vivo* (при развитии инфекции и проведении терапии) фагоциты подвергаются комбинированному воздействию этих факторов, эффекты которого сложно прогнозируемы и могут быть достаточно вариабельны.

Целью работы явилось определение влияния синтетического пептида ZP-2 как аналога активного центра ГМ-КСФ, а также клинических штаммов стафилококков и их супернатантов, в том числе в комбинациях с указанным пептидом, на секрецию цитокинов нейтрофилами человека *in vitro*.

Материалы и методы. Объектами исследования служили нейтрофилы периферической крови 10 здоровых доноров, полученные путем градиентного центрифугирования плазмы крови на двойном градиенте фиколл-верографин плотностью 1,093-1,075 с конечной концентрацией 5×10^6 клеток/мл [4, 5]. В экспериментах использовали бактериальные взвеси 20 клинических изолятов *S. aureus* (n=10) и *S. epidermidis*(n=10), выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы и из влагалища у женщин с миомой матки, а также супернатанты их суточных бульонных культур. В опытах использовался синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ (ZP2) с химической формулой: THRNLENLEA LASERHISTYRLYSGLNHISCYSPRO. Этот пептид получен твердофазным способом на синтезаторе «AppliedBiosystems 430A». Влияние данного пептида на секрецию цитокинов нейтрофилами (концентрация 20 мкг/мл), на бактерии (соотношение клеток 1:20), их метаболиты (объемное соотношение 9:1) определяли на приборе MAGPIX-100 (USA). Исследование проводилось с использованием мультиплексных наборов компании БиоРад (США) для детекции 17 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, INF-γ, IL-13, IL-17A, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF-α, IL-8, MCP-1, MIP-1β) в супернатантах клеток после 1 часа инкубации фагоцитов с действующими агентами. Контролем служили супернатанты нейтрофилов, инкубированных в питательной среде RPNI-1640 без бактерий и пептида. Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с вычислением из 5 измерений средней арифметической и ее ошибки (M±m). О достоверности межгрупповых отличий судили по критерию Стьюдента – *t*.

Результаты. Синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 при добавлении к нейтрофилам вызывал усиление секреции следующих цитокинов: G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, INF-γ, IL-17A, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-7, TNF-α, IL-8 и MIP-1β, при этом наиболее выраженное усиление секреции выявлено для 5 цитокинов (IL-17A, IL-1β, IL-6, IL-8 и MIP-1β). Концентрации остальных цитокинов в супернатантах нейтрофилов оставались на контрольном уровне.

Контакт нейтрофилов с коагулазоположительными стафилококками (*S. aureus*) существенно не влиял на секрецию фагоцитами GM-CSF, INF-γ, интерлейкинов (IL) 4, 5, 7, 8, 12p70, 13 и MCP-1. В супернатантах незначительно снижал концентрацию MIP-1β и IL-6 (на 11,6 и 33,5 % соответственно), но достоверно стимулировал секрецию G-CSF, IL-2, IL-10, IL-17A и TNF-α в 1,3-2,0 раза, а IL-1β – в 16 раз, что в условиях *in vivo* может способствовать формированию воспалительной реакции в очаге поражения, так как большинство из них относится к цитокинам с провоспалительной активностью.

При взаимодействии нейтрофилов с коагулазонегативными стафилококками *S. epidermidis*, в супернатантах фагоцитов концентрация ряда цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF-γ, интерлейкинов (IL) 1β, 2, 4, 5, 7, 10, 12p70, 13, TNF-α и MCP-1) существенно не отличалась от контроля, а другой части цитокинов (IL-17A, IL-6, IL-8 и MIP-1β) – была значительно (в 1,4-5,4 раза) снижена. То есть, в отличие от опытов с *S. aureus* в экспериментах с *S. epidermidis* не выявлено эффекта стимуляции бактериями секреции нейтрофилами таких провоспалительных цитокинов, как IL-1β, IL-2, IL-17A и TNF-α, а снижение в супернатантах концентрации MIP-1β и IL-6 при контакте нейтрофилов с КОС было более выраженным (62,2 и 68,2 % соответственно).

В сравнении с живыми бактериями супернатанты (метаболиты) суточных бульонных культур стафилококков с учетом их видовой

принадлежности влияли несколько иначе на цитокино-секрецию нейтрофилов. Если бактериальные клетки *S. aureus* преимущественно усиливали секрецию провоспалительных цитокинов, а *S. epidermidis* – ее подавляли, то супернатанты этих бактерий оказывали на нейтрофилы однонаправленное действие, либо не изменяя, либо стимулируя в 1,8-6,6 раза секрецию нейтрофилами ряда цитокинов (IL-17A, IL-1β, IL-4, IL-6, TNF-α, IL-8 и MIP-1β). Особо следует отметить тот факт, что живые бактерии *S. epidermidis* и *S. aureus* снижали секрецию IL-6, IL-8 и MIP-1β, тогда как их метаболиты – наоборот, резко ее увеличивали в 6,4-6,6, 4,4-5,5 и 2,8-3,3 раза соответственно. В целом, в отношении этих цитокинов стимулирующий эффект метаболитов *S. aureu*s был выше, чем у *S. epidermidis*.

В условиях сочетанного воздействия на нейтрофилы синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 в комбинации с живыми стафилококками наблюдали разнообразные эффекты влияния на секрецию фагоцитами цитокинов, характер которых зависел от видовой принадлежности бактерий. Так, в экспериментах с *S. Aureus*, дополнительное введение в реакционную среду синтетического пептида ZP2 либо не изменяло, либо обеспечивало стимуляцию на 10,1-62,7 % секреции нейтрофилами цитокинов, в частности G-CSF, интерлейкинов (IL) 10, 12p70, 17A, 1β, 2, 6, 8 и MIP-1β, тогда как в опытах с *S. epidermidis* спектр таких цитокинов был вдвое уже, включая только интерлейкины (IL) 1β, 6, 8 и MIP-1β, хотя стимуляция их секреции была на сопоставимом уровне – в 1,24-2,8 раза.

При анализе эффектов комбинированного воздействия синтетического пептида ZP2 и супернатантов (метаболитов) бульонных культур стафилококков на секрецию нейтрофилами цитокинов выявлены как общие закономерности, так и межвидовые отличия. С одной стороны, метаболиты *S. aureus* и *S. epidermidis* «отменяли» активирующее действие синтетического пептида ZP2 в отношении секреции большинства цитокинов, то есть их концентрация была ниже в сравнении с вариантом, когда на фагоциты изолированно действовал аналог ГМ-КСФ. С другой стороны, внесение синтетического пептида ZP2 в реакционную среду с супернатантами *S. Aureus*, не влияло на секрецию нейтрофилами большей части цитокинов (исключение составили IL-17A и MIP-1β, секреция которых увеличилась на 18,6 и 14,0 % соответственно, а также IL-6 и IL-8, концентрация которых наоборот снизилась на 12,4 и 40,7 % соответственно), тогда как в опытах с метаболитами *S. epidermidis* в сочетании с синтетическим пептидом ZP2 наблюдалась стимуляция на 17,1-85,9 % секреции более широкой линейки цитокинов: интерлейкины 17A, 1β, 4, 6 и 8, TNF-α и MIP-1β).

Таким образом, стафилококки разных видов и их продукты жизнедеятельности оказывают вариабельное влияние на секрецию/продукцию цитокинов нейтрофилами, в том числе «интактными» или активированными синтетическим пептидом активного центра ГМ-КСФ. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях *in vivo*, в том числе при развитии инфекционно-воспалительного процесса с участием стафилококков, в очаге поражения могут складываться сложные взаимоотношения между фагоцитами, возбудителями и продуктами их метаболизма, в реализацию которых неминуемо вовлекаются цитокины, секретируемые нейтрофилами.

Работа выполнена по проектам ИИФ УрО РАН № 15-3-4-33 и ИКВС УрО РАН № 15-3-4-34 в рамках Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murphy J.M., Young I.G. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor / J. M. Murphy, I. G. Young // Vitam. Horm.– 2006.– V. 74.– P. 1-30.
2. Антибактериальные, иммунотропные и репарационные свойства пептидов активного центра ГМ-КСФ, различных дефенсинов и веществ, полученных из супернатантов $CD34^{+}45^{-}$-клеток-предшественников гемопоэза / А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, Е. Г. Костоломова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2012.– Т 6 (14), № 3 (1).– С. 78-79.
3. Некоторые биологические эффекты иммономодуляторов естественного и синтетического происхождения *in vitro* как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями / В. А. Гриценко, Д. Л. Аминин, А. В. Зурочка и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.– 2012.– № 3.– С. 1-17. [Электронныйресурс]. (URL: http://elmag.uran.ru:9673/magazine/ Numbers/2012-3/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf).
4. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных

цитофлюориметров-анализаторов» / С. В. Хайдуков, Л. А. Байдун, А. В. Зурочка и др. // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8 (17), № 4.– С. 974-992.

Wong, L., Wilson, R. D. The indentification of Fc and C3 receptors on human neutrophils / L. Wong, R. D. Wilson // J. Immunol. Meth.– 1975.– V. 7.– P. 69-76.

CYTOKINES PRODUCTION BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN RESPONSE TO A SYNTHETIC PEPTIDE OF THE ACTIVE CENTER OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR (GM-CSF), BACTERIA AND THEIR SUPERNATANTS

Zurochka A. V.[1,2], Zurochka V. A.[1,2], Zueva E. B.[1], Dobrynina M. A.[1], Dukart V. V.[1], Belozertseva Yu.P.[3], Tyapaeva Y. V.[3], GritsenkoV.A.[4]

[1]Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg; [2]South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk; [3]Orenburg State Medical University, Orenburg; [4]Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

In vitro experiments the effects of synthetic peptide of the active center of GM-CSF (ZP2), 20 clinical isolates of *S. aureus* (n=10) and *S. epidermidis* (n=10) and their supernatants of broth cultures, including in different combinations, on the secretion of 17 cytokines by peripheral blood neutrophils of 10 healthy donors were studied. It is shown that a synthetic peptide ZP2 has stimulated neutrophils by the secretion of most cytokines. It is established that living cells of *S. aureus* significantly stimulated the production by neutrophils of cytokines G-CSF, IL-10, IL-17A, IL-1β, IL-2 and TNF-α, but inhibited the secretion of IL-6, whereas the interaction of *S. epidermidis* cells was accompanied by reduced production of cytokines IL-17A, IL-6, IL-8 and MIP-1β. Revealed the variability of effects of metabolites of staphylococci based on their species on the secretion of cytokines by neutrophils. The combined effects of a synthetic peptide ZP2 with live staphylococci and their metabolites in the secretion of cytokines by neutrophils was characterized. The obtained results indicate the complex nature of the relationship between phagocytes of staphylococci of different species and their metabolites involving in this process a wide range of cytokines capable of significantly influence the course and outcome of the inflammatory process, including the development of endogenous infections caused by staphylococci.

Keywords: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), peptide of active center, the staphylococci, neutrophils, cytokines.

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПЕПТИД АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ) КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ С КОМБИНИРОВАННЫМИ ЭФФЕКТАМИ

Зурочка А. В.[1,2], Зурочка В. А.[1,2], Зуева Е. Б.[1], Добрынина М. А.[1], Дукарт В. В.[1], Гриценко В. А.[3,4]

[1]Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург; [2]Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск; [3]Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург; [4]Оренбургский научный центр УрО РАН, Оренбург, Россия

В экспериментах *in vitro* изучено влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 (химическая формула: THRNLENLEALASERHISTYRLYSGLNHISCYSPRO) на иммунокомпетентные клетки (лимфоциты, стволовые клетки, нейтрофилы, моноциты), микроорганизмы (микрококк, стафилококки, энтеробактерии) и поврежденные ткани макроорганизма при раневом процессе. Результаты исследования свидетельствовали, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 обладает выраженной иммуностимулирующей, антибактериальной и репарационной активностью. Наличие у данного синтетического пептида такого широкого спектра иммунобиологических эффектов определяет возможность его использования в качестве основы для создания новых эффективных лекарственных препаратов с комбинированными свойствами.

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), синтетический пептид активного центра, клетки иммунной системы, бактерии, репарация.

Создание новых лекарственных препаратов на основе синтетических пептидов, обладающих иммуннотропной активностью, является одним из перспективных направлений современной иммунологии. Наиболее интересными в этой связи являются биологически активные молекулы, продуцируемые иммунокомпетентными клетками для поддержания гомеостаза организма, которые могут стать основой эффективных лекарственных средств, восстанавливающих поврежденные звенья иммунной системы. В первую очередь, к таким препаратам относятся различные цитокины [1, 2], в том числе гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), уже нашедший применение в клинической практике, в частности при лечении лейкозов [3, 4]. Широкие возможности для производства новых иммунотропных препаратов открывают расшифровка молекулярной структуры и направленный химический синтез активных центров цитокинов, что убедительно продемонстрировано на примере создания синтетических аналогов активного центра ГМ-КСФ, которые обладали иммуностимулирующим действием, идентичным таковому цельной регуляторной молекулы [5, 6]. В то же время такие синтетические аналоги в сравнении с природными цитокинами могут обладать более обширным набором иммунобиологических свойств, сообщая им дополнительные полезные характеристики и повышая их иммунотерапевтический потенциал.

Целью настоящего исследования явился анализ наличия у синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 дополнительных иммунобиологических свойств.

Материалы и методы. Изучали влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) с химической формулой – TH

RNLENLEALASERHISTYRLYSGLNHISCYSPRO на иммунотропную, антибактериальную и репарационную активность. Иммунотропную активность синтетического пептида ZP2 определяли *in vitro* по его влиянию на РБТЛ, хемотаксис и хемокинез нейтрофилов и моноцитов, дифференцировку стволовых клеток, а также секрецию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека, в том числе при комбинированном воздействии на них бактерий и пептида. Его антибактериальное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов оценивали по бактерицидной активности, влиянию на кинетику развития бактериальных культур в жидкой питательной среде и их способность к биопленкообразованию. Репарационную активность синтетического пептида ZP2 оценивали по скорости заживления ран в эксперименте на животных, а также у больных после электроэкцезионной процедуры иссечения шейки матки при цервикальной интраэпителиальной дисплазии.

Результаты. Проведенные исследования позволили выявить и охарактеризовать у синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 ряд новых иммунобиологических свойств.

В частности, экспериментально установлено, что данный пептид обладает способностью усиливать пролиферацию лимфоцитов в РБТЛ, по степени сопоставимую при контакте со стандартным стимулятором ФГА и действием ряда иммуномодуляторов (дефенсины L37 и HNP, IL-2, и др.), как это было показано ранее [7]. Показано, что синтетический пептид ZP2 (в концентрации 10 мкг/мл) вызывал дифференцировку фетальных (стволовых) клеток человека с фенотипом $CD34^{+}CD45^{dim}$ (по протоколу ISHAGE) в сторону гранулоцитопоэза. Кроме того, он стимулировал хемотаксис и хемокинез гранулоцитов и моноцитов человека. Этот пептид активировал секрецию нейтрофилами периферической крови человека цитокинов: G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, INF-γ, IL-17A, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-7, TNF-α, IL-8 и MIP-1β. В то же время, обнаружено вариабельное по характеру модулирующее действие синтетического пептида ZP2 на секрецию ряда цитокинов нейтрофилами после их контакта с живыми микроорганизмами разной таксономической принадлежности (стафилококки, энтеробактерии).

В опытах *in vitro* установлено, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 обладает бактерицидной активностью в отношении широкого спектра грамположительных и грамнегативных микроорганизмов. Выявлен доза-зависимый эффект и определены особенности влияния синтетического пептида ZP2 на кинетику развития бульонных культур музейных и клинических штаммов микрококков, коагулазоположительных и коагулазоотрицательных стафилококков и энтеробактерий. Экспериментально обнаружена межвидовая вариабельность эффектов указанного пептида на способность данных бактерий формировать биопленки, однако на клинические изоляты *Staphylococcus aureus* синтетический пептид ZP2 оказывал преимущественно ингибирующее действие.

Впервые показано, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 влияет на течение репаративно-пластических процессов в ране, вызывая практически двух кратное ускорение процессов заживления ран как в эксперименте на животных, так и у больных после электроэкцезионной процедуры иссечения шейки матки при цервикальной интраэпителиальной дисплазии. При этом установлено, что под действием этого синтетического пептида не только ускорялось заживление ран, но и восстанавливалась нормальная структура ткани без образования рубцов, о чем свидетельствовали результаты гистологических исследований.

Таким образом, полученные данные отражают наличие у синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 широкого спектра иммунобиологических эффектов, что может служить фундаментом для создания на его основе лекарственных препаратов нового поколения, обладающих комбинированным, в том числе иммунотропным, антибактериальным и репарационным, действием [8].

Работа выполнена по проектам ИИФ УрО РАН № 15-3-4-33 и ИКВС УрО РАН № 15-3-4-34 в рамках Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев – СПб.: Фолиант, 2008.– 552 с.
2. Козлов В. А., Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: Руководство для врачей / В. А. Козлов, А. Г. Борисов, С. В. Смирнова и др.– Новосибирск: Наука, 2009.– 274 с.

3. Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor / A. F. Cruz, M. A. Santelises, O. R. Espinosa et al. // Med. Oncol.– 2014.– № 31.– P. 774-788.
4. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases / Van Nieuwenhuijze A., Koenders M., Roeleveld D. et al. // Molecular Immunology.– 2013.– № 56.– P. 675-682.
5. Иммунотропные и биологические эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, Ю. Г. Суховей и др. // Вестник уральской медицинской академической науки.– 2011.– № 2/2 (35).– С. 23-24.
6. Новые подходы к изучению спектра биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, М. А. Добрынина и др. // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8 (17), № 3.– С. 690-693.
7. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств синтетических пептидов активного центра GM-CSF и веществ, полученных из супернатантов $CD34^{+}CD45^{dim}$ клеток-предшественников гемопоэза / А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, Е. Г. Костоломова и др. // Цитокины и воспаление.– 2012.– Т. 11, № 2.– С. 96-99.
8. Некоторые биологические эффекты иммономодуляторов естественного и синтетического происхождения *in vitro* как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями / В. А. Гриценко, Д. Л. Аминин, А. В. Зурочка и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.– 2012.– № 3.– С. 1-17 [Электронный ресурс]. (URL: http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/ 2012-3/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf).

SYNTHETIC PEPTIDE OF THE ACTIVE CENTER OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR (GM-CSF) AS THE BASIS FOR CREATING A NEW GENERATION OF DRUGS WITH COMBINED EFFECTS

Zurochka A. V.[1,2], Zurochka V. A.[1,2], Zueva E. B.[1], Dobrynina M. A.[1], Dukart V. V.[1], Gritsenko V. A.[3,4]

[1]Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg; [2]South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk; [3]Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg; [4]Orenburg scientific center UrB RAS, Orenburg, Russia

In vitro experiments studied the effect of synthetic peptide of the active site of GM-CSF – ZP2 (chemical formula: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) on immunocompetent cells (lymphocytes, stem cells, neutrophils, monocytes), microorganisms (micrococci, staphylococci, enterobacteria) and damaged host tissue in wound process. The results of the study showed that a synthetic peptide of the active site of GM-CSF – ZP2 has expressed immunostimulating, antibacterial and reparative activity. The presence of the synthetic peptide such a wide range of biological effects determines the possibility of its use as the basis for creation of new effective drugs with combined properties.

Keywords: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), a synthetic peptide of the active center, immune cells, bacteria, tissue repair.

КЛИНИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВНУТРИСОСУДИСТОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРОВИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ

Гизингер О.А., Зиганшин О.Р., Шеметова М.А.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский медицинский университет, Челябинск, Россия

Представлены результаты лечения герпесвирусной инфекции мочеполовой системы с использованием внутрисосудистого лазерного облучения крови. В исследовании приняло участие 89 женщин в возрасте 27,09±0,17 лет с клиническими признаками генитального герпеса, вызванного ВПГ 1,2. Комплексная терапия включала использование внутрисосудистого лазерного облучения крови одновременно с применением стандартных методов терапии генитального герпеса. Показано, что включение в комплекс терапевтических мероприятий процедур внутрисосудистого лазерного облучения крови (длина волны 365 нм, мощность излучения 2 мВт, экспозиция 8 минут, количество сеансов –15) повышает этиологическую эффективность снижению риска развития рецидивов.

Ключевые слова: лазер низкой интенсивности, иммунологическая эффективность, генитальный герпес.

Актуальность. На сегодняшний день существующие методы терапии герпесвирусных инфекций сгруппированы в направления этиотропного, патогенетического и симптоматического лечения с применением химиотерапии, иммунотерапии и физиотерапии [1,5]. Неудовлетворенность эффективностью стандартных схем лечения генитального герпеса, связанных с резистентностью к ациклическим нуклеозидам, традиционно используемых в качестве средства этиотропной терапии данного заболевания побуждает к поиску адъювантных патогенетических подходов [2]. На сегодняшний день в дерматовенерологии наряду с этиотропными методами широко используются патогенетические [1,4] в частности, физиотерапевтические воздействия, например, низкоинтенсивная лазеротерапия.Положительный опыт использования низкоинтенсивных лазеров позволил внедрить в практику ряд лечебных подходов, а именно внутрисосудистой лазеротерапии [3].

Цель. Изучить клиническую и иммунологическую эффективность внутрисосудистой лазеротерапии (ВЛОК) при лечении генитального герпеса.

Материалы. Пациентам был поставлен диагноз А.60.0 (МКБ-10)-Герпетическая инфекция половых органов и мочеполового тракта, рецидивирующее течение, средняя степень тяжести. Критериями для включения больного в исследование являлись: наличие ВПГ 1 или 2 типа. (подтверждённое методом ПЦР), наличие в анамнезе герпетического поражения половых органов; клиническая картина рекуррентного герпеса половых органов в периоде продромы или обострения, при этом не более 48 часов от момента появления высыпаний, частота рецидивов от 4 до 6 в год, согласие на участие в исследовании. Результаты лечения оценивали по изменению длительности и тяжести рецидива генитального герпеса, наличию ДНК ВПГ 1,2. 49 пациенток были включены в группу стандартная терапия – валацикловир по 500 мг 2 раза в день, 40 женщин включены в группу стандартная терапия + ВЛОК, где пациенткам была назначена терапия валацикловиром и, дополнительно, на фоне противовирусной терапии им были проведены процедуры внутрисосудистого лазерного облучения крови. Оценка этиологической эффективности проведенной терапии через 6 месяцев и через 1 год после проведённой терапии.

Результаты. До начала лечения пациенток с генитальной герпетической инфекцией беспокоили зуд, жжение в области гениталий

различной интенсивности, у 66,8 % женщин отмечалась болезненность при мочеиспускании, 15,6 % женщин жаловались на слизистые выделения и дискомфорт в области наружных половых органов. В 100 % случаев пациентки были тревожны, отмечали снижение качества жизни из-за страха возникновения рецидива, боязни инфицировать полового партнера, 18,4 % отметили, что во время рецидива избегают даже дополнительных бытовых контактов с близкими. Все пациентки обратились за медицинской помощью во время очередного рецидива, из анамнеза удалось установить, что средняя продолжительность болезни составляла 3,6±0,4 года. Клинически у 100 % женщин, страдающих генитальной герпетической инфекцией, на момент осмотра выявлены эрозивные поражения гениталий, причём у 44,9 % женщин эрозии имелись в области малых половых губ, у 36,9 % – на задней спайке, у 39,8 % выявлено поражение шейки матки. У 18,9 % обследуемых поражение выявлено на задней спайке и шейке матки. Эрозии на наружных половых органах имели фестончатые края, размером от 0,33 до 1,11 см, были умеренно болезненны, кожа вокруг гиперемирована, отечна. Поражение шейки матки также сопровождалось значительным количеством слизистых выделений из влагалища и уретры.

Контрольные клинико-иммунологические исследования были проведены по истечении 6 и 12 месяцев от начала лечения. В течение 6 месяцев после приема препаратов в группе пациенток, получавших монотерапию препаратом валацикловир, рецидив герпетической инфекции отмечен у 8,09 % женщин, при этом интенсивность клинических проявлений была значительно менее выраженной, чем до лечения. В группе пациенток, получавших комплексную терапию с применением ВЛОК, рецидив был отмечен только у одной пациентки (3,3 %). За период с 7 по 12 месяц наблюдения частота рецидивов у 23,4 % пациенток из группы, получавших монотерапию препаратом валацикловир, составила в среднем 2,0±1,4 года. В группе получавших комплексную терапию с применением метода ВЛОК, за этот же период наблюдения, всего один эпизод рецидива генитального герпеса отмечен у 7,69 % женщин, причем длительность рецидива составила 3,3±1,42 дня. Оценивая приверженность пациенток к проводимой терапии, было установлено, что в группе получавших монотерапию препаратом ацикловир 32,8 % женщин нарушали предписанный режим приема препарата, объясняя причины периодической самостоятельной отмены препарата появлением тяжести в правом подреберье, дисфагией, диспепсией. В группе пациенток, получавших комплексную терапию, приверженность к лечению составила 100 %. Оценка этиологической эффективности проведенной терапии через 6 месяцев и через 1 год показала отсутствие ДНК ВПГ через 6 месяцев в группе пациентов, получавших валацикловир у 9,09 % женщин и в группе получавших комплексную терапию с применением ВЛОК у 5,69 % женщин. Частота выявления ВПГ через 1 год в группе пациенток, получавших только валацикловир, в группе валацикловир+ВЛОК составила 13,6 % и 7,09 % соответственно.

Оценка иммунологической эффективности лазеротерапии при лечении герпесвирусной инфекции гениталий показала, что применение внутрисосудистого лазерного облучения крови в комплексной терапии генитального герпеса приводит к полному или частичному восстановлению количественного и качественного состава нейтрофилов периферической крови. Усиливалась поглотительная способность и кислород-зависимый метаболизм выраженный в повышении активности фагоцитов, увеличивалось содержание ИФН-γ, иммуноглобулина А. Выявленная динамика иммунологических показателей свидетельствует о восстановлении потенциала факторов врождённого и адаптивного иммунитета у женщин, получавших комплексную терапию. Включение в комплекс терапевтических мероприятий процедур ВЛОК повышает этиологическую, иммунологическую эффективность терапии генитального герпеса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бестим и Беталейкин в комплексной терапии хронической гонококковой инфекции мочеполовых органов у женщин / Ю. В. Беспалько, О. Р. Зиганшин, И. И. Долгушин и др. // Цитокины и воспаление.– 2008.– Т. 7. № 4. С. 58-62
2. Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы и факторы мукозального иммунитета: Дисс. … докт. биол. наук.– Челябинск.– 2010.– 356 с.
3. Гизингер О. А., Зиганшина Т. А., Семенова И. В. Роль физиотерапевтических воздействий в коррекции дисфункций факторов противоинфекционной защиты организма (Обзор литературы)

/ О. А. Гизингер, Т. А. Зиганшина, И. В. Семенова // Вестник новых медицинских технологий.– 2011.– Т. 18, № 4.– С. 9-13.
4. Долгушин И. И., Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы цервикального секрета у женщин с микоплазменной инфекцией / И. И. Долгушин, О. А. Гизингер // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры.– 2008.– № 4.– С. 29-31.
5. Летяева О. И., Гизингер О. А., Зиганшин О. Р. Генитальный герпес: долгосрочные подходы к терапии «пожизненной инфекции» / О. И. Летяева, О. А. Гизингер, О. Р. Зиганшин // Клиническая дерматология и венерология.– 2013.– № . 6.– С. 61-65.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF INTRA VASCULAR LASER RADIATION OF BLOOD AT TREATMENT OF THEHERPES VIRUS INFECTIONS OF URINOGENITAL SYSTEM

Gizinger O. A., Ziganshin O. R., Shemetova M. A.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

The results of the treatment of herpes virus infections of the genitourinary system, using intravascular laser irradiation of blood. The study took 89 women aged 27,09 ± 0,17 years, with clinical signs of genital herpes caused by HSV 1,2.Combined therapy included the use of intravascular laser irradiation of blood at the same time using standard methods of treatment of genital herpes.It was shown that included in the complex therapeutic interventions procedures intravascular laser blood irradiation (wavelength 365 nm, output power 2 mW, exposure 8 minutes, the number of sessions –15) increases the efficiency of the etiological treatment of genital herpes caused by HSV 1,2, reduce relapse risk and improve the quality of life.

Keywords: laser of low intensity, immunological efficiency, genital herpes.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА ТОЛЩИНУ ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ

Селедцова Н. В., Овсянникова Т. В.

ФБГУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Проведено исследование влияния внутриматочного введения препарата Г-КСФ (филграстим) на толщину эндометрия у пациенток с бесплодием и гипоплазией эндометрия. Показано, что введение препарата Г-КСФ в полость матки в фазу пролиферации сопровождается утолщением эндометрия к периоду «имплантационного окна». Для достижения толщины эндометрия 9 мм требовалось различное количество введений препарата (от 1 до 3). Внутриматочное введение филграстима характеризовалось отсутствием системных побочных эффектов, имеющих место при подкожном и внутривенном введении.

Ключевые слова: гипоплазия эндометрия, филграстим, бесплодие, Г-КСФ.

Одной из важнейших проблем современной репродуктологии является низкая частота наступления беременности у пациенток с «тонким эндометрием». По данным большинства исследователей минимальная толщина эндометрия, необходимая для наступления беременности – 7 мм, предпочтительная – более 9 мм. В лечении «тонкого эндометрия» используют препараты эстрогенов, аспирин, L-аргинин, и другие, однако в ряде случаев

их применение оказывается неэффективным, в связи с чем продолжается поиск новых путей воздействия на эндометрий [1]. В этом свете особый интерес могут представлять ростовые факторы. Недавно было показано, что в фазу средней секреции в сыворотке крови женщин определяется высокий уровень гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) [2]. Г-КСФ является гемопоэтическим цитокином, однако рецепторы для него обнаружены и в эндотелиальных клетках, трофобласте [3]. Известно, что Г-КСФ влияет на дифференцировку дендритных клеток, способствуя продукции Th-2 цитокинов, активации регуляторных Т-клеток [4], что имеет большое значение на этапе имплантации. Совсем недавно на экспериментальных моделях животных было показано, что при подкожном введении Г-КСФ способствует регенерации клеток эндометрия [5].

Исходя из вышеперечисленного, **целью нашей работы** стало изучить влияние внутриматочного введения Г-КСФ на толщину эндометрия у пациенток с бесплодием и гипоплазией эндометрия.

Материалы и методы. В исследование были включены пациентки с бесплодием и гипоплазией эндометрия (n=16). Возраст составил 32,8 ± 1,0 лет, длительность бесплодия 5,7 ± 0,8 лет. Критерии включения: возраст 18-45 лет, толщина эндометрия в предшествующих циклах менее 7 мм в фазу средней секреции, отсутствие противопоказаний к введению Г-КСФ (хроническая нейтропения, злокачественные опухоли, в том числе в анамнезе, острые инфекции и декомпенсация хронических заболеваний). Из гинекологической патологии в группе преобладали хронический эндометрит, аденомиоз, миома тела матки, синдром поликистозных яичников. У трех пациенток имели место внематочные беременности, у двух – синдром потери плода, также еще 4 пациентки имели самопроизвольные выкидыши в анамнезе. В 100 % случаев в спермограмме супругов пациенток регистрировались отклонения в виде астенотератозооспермии, вискозипатии. Таким образом, помимо гипоплазии эндометрия причинами бесплодия являлись мужской фактор, ановуляции (35 % пациенток) и/или трубно-перитонеальный фактор (25 %). Первичное бесплодие регистрировалось у 50 % супружеских пар. 9 из 16 пациенток в анамнезе имели неудачные попытки ВРТ.

Введение филграстима проводилось с информированного согласия пациенток. До начала лечения и через 2-3 дня после лечения проводили развернутый анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи. Мониторинг толщины эндометрия проводился с помощью динамического ультразвукового исследования. Филграстим («Нейпомакс», ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА») вводили в полость матки в объеме 1 мл в виде стерильного раствора 0,3мг/мл (30 млн. ЕД) при достижении доминирующего фолликула (ДФ) 16 мм и толщине эндометрия менее 7 мм с помощью подключичного катетера. Оценку толщины эндометрия проводили через 2 суток после очередного введения. При достижении толщины эндометрия 9 мм введение препарата прекращалось. Максимальное число введений препарата составило 3 раза. Препарат использовался в протоколе индукции овуляции (n=3), в сочетании с искусственной инсеминацией (n=8), протоколе ЭКО (n=3) и естественных циклах (n=2).

Статистическая обработка проводилась с использованием «STATISTICA 6.0». Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. Толщина эндометрия до введения филграстима составила 4,6±0,5 мм, и варьировала от 2,1 до 7,0 мм. Через 2 суток после первого введения данный показатель составил 8,1±0,6 мм, что достоверно выше, чем до введения (p_U<0,01). При этом толщина эндометрия варьировала от 5,0 до 13,4 мм, и у 5-ти пациенток из 16 (31 %) толщина эндометрия превысила 9 мм. Остальным пациенткам повторно был введен филграстим в полость матки, что совпало с днем введения преовуляторной дозы хорионического гонадотропина. Измерение срединного М-эхо через 2 дня после второго введения препарата Г-КСФ показало, что толщина эндометрия в группе пациенток, которым филграстим был введен повторно, составила 8,35 ±0,6 мм, что достоверно выше, чем до повторного введения (5,7 ± 0,5 мм). После повторного введения препарата у одной пациентки толщина эндометрия составила 12,5 мм, у остальных не достигла 9 мм, в связи с чем было принято решение о третьем введении препарата Г-КСФ. Через 3 дня оценка толщины эндометрия показала достоверное

увеличение с 7,5 ± 0,2 мм (до третьей инфузии филграстима) до 10,8 ± 1,2 мм. При этом толщина варьировала от 7,7 до 15,0 мм, и лишь у одной пациентки не достигла 9 мм. Сравнение толщины эндометрия в период «окна имплантации» у пациенток в цикле лечения показало достоверное отличие от аналогичного показателя в контрольном цикле (11,1±0,5 против 6,8±0,2 мм). Характерно, что не было выявлено побочных эффектов в виде болей в мышцах или костях, дизурии, транзиторной артериальной гипотензии, аллергических реакций. Также не было достоверного изменения со стороны лабораторных показателей после введение препарата. Из субъективных ощущений пациентки в 100 % случаев отмечали небольшую болезненность в период введения и мажущие кровянистые выделения в течение 1-2 суток после введения.

Заключение. Таким образом, препарат Г-КСФ при внутриматочном введении в фазу пролиферации у пациенток с гипоплазией эндометрия приводит к увеличению срединного М-эхо к периоду «имплантационного окна». Для достижения толщины эндометрия 9 мм требуется различное количество введений препарата (от 1 до 3). Внутриматочное введение филграстима характеризуется отсутствием побочных эффектов, имеющих место при подкожном и внутривенном введении. Полученные результаты позволяют рассматривать препарат Г-КСФ в качестве перспективного средства для лечения гипоплазии эндометрия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis / A. Kasius, J. G. Smit, H. L. Torrance et al. // Hum Reprod Update.– 2014.– V. 20(4).– P. 530-541.
2. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? / A. Salmassi, A. G. Schmutzler, S. Schaefer et al. // Hum Reprod.– 2005.– V. 20(9).– P. 2434-2440.
3. Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells / H. Uzumaki, T. Okabe, N. Sasaki et al. // Proc Natl Acad Sci U S A.– 1989.– V. 86(23).– P. 9323-9326.
4. CCL22-producing CD 8α- myeloid dendritic cells mediate regulatory T cell recruitment in response to G-CSF treatment / E. Layseca-Espinosa, S. Korniotis, R. Montandon et al. // J Immunol.– 2013.– V.191(5).– P. 2266-2272.
5. Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of thin endometrium in experimental rats / J. Zhao, T. Tian, Q. Zhang et al. // PLoS One. 2013.– V. 8(12).– e82375.

THE INFLUENCE OF GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR ON THE THICKNESS OF THE ENDOMETRIUM IN PATIENTS WITH INFERTILITY

Seledtsova N. V., Ovsyannikova T. V.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

We studied the effect of intrauterine injection of G-CSF (filgrastim) on endometrial thickness in patients with infertility and endometrial hypoplasia.It has been shown that the administration of G-CSF into the uterine cavity in the phase of proliferation is accompanied by a thickening of the endometrium to theperiodofimplantation window". To achieve endometrial thickness of 9 mm required a different number of administrations of the drug (1 to 3). Intrauterine administration of filgrastim was characterized by the absence of systemic side effects occurring in subcutaneous and intravenous administration.

Keywords: endometrial hypoplasia, filgrastim, infertility, G-CSF.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА NF-kB ОРИДОНИНА НА АКТИВАЦИЮ МАКРОФАГОВ И ЛОКАЛЬНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ ТН-1 И ТН-2 ТИПА

Трофимова Е. С., Данилец М. Г., Лигачёва А. А., Шерстобоев Е. Ю.

НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга, Томск, Россия

Проведено исследование влияния ингибитора NF-kB оридонина на активность макрофагов *in vitro*, а также на локальное воспаление Th1- и Th2-типа. Показано, что оридонин снижает как пролиферацию макрофагов, так и продукцию ими оксида азота, а также снижает отёк, индуцированный эритроцитами барана (Th1-воспаление), и локальную реакцию гиперчувствительности немедленного типа, вызванную введением овальбумина (Th2-воспаление). Противовоспалительное действие оридонина было сравнимо с таковым у вольтарена.

Ключевые слова: оридонин, NO, NF-kB, макрофаги, локальное воспаление.

Известно, что нуклеофильный фактор NF-kB играет решающую роль в иммунных и воспалительных реакциях. Он является провоспалительным фактором транскрипции и регулирует экспрессию более чем 500 генов, отвечающих за трансформацию и пролиферацию клеток, ангиогенез и метастазирование опухолей, продукцию провоспалительных цитокинов, молекул адгезии, хемокинов, факторов роста и индуцибельных ферментов таких как циклооксигеназа 2 (COX2) и NO-синтаза (iNOS) [1]. С другой стороны, большое количество агентов может активировать NF-κB как при классическом (Th1), так и альтернативном (Th2) пути поляризации клеток иммунной системы и, с этой точки зрения, внутриклеточный сигнальный каскад, запускаемый нуклеофильным фактором, представляет собой потенциальную мишень для фармакологического вмешательства. Оридонин, тетрациклиновый дитерпеноид, выделенный из Rabdosiarubescens и являющийся ингибитором NF-κB, через активацию рецептора IL-1β ингибирует фосфорилирование сигнальных молекул ERK1/2 и JNK, пролиферацию клеток, запускает апоптоз клеток через активацию caspase-3, caspase-9, увеличивает концентрацию реактивных форм кислорода [2]. Действие оридонина связывают с блокадой NF-κB-сигнального пути, в частности, с нарушением связывания NF-κB с ДНК [3].

В связи с этим **целью данной работы** является изучение влияния ингибитора NF-κB оридонина на активацию макрофагов *in vitro* и локальное воспаление Th1- и Th2-типа.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили на 110 мышах линий C57BL/6 и BALB/c обоего пола в возрасте 7-8 недель. Животные содержались в стандартных конвенциональных условиях. Экспериментальные исследования осуществлялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.) и были одобрены Институтской комиссией по биоэтике на соответствие принципам гуманного обращения с животными.

Влияние оридонина на активность макрофагальных клеток оценивали *in vitro* в культуре перитонеальных макрофагов (Мф) интактных мышей линии C57BL/6. Полученные после адгезии Мф ($3{,}0\times10^6$ клеток/мл) культивировали (48 ч, 37 °C, 100 % влажности, 5 % CO_2) в стандартной полной культуральной среде в плоскодонных 96-луночных планшетах со средой (контроль) или в присутствии оридонина («Calbiochem», США) в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 50 мкМ. Концентрацию нитритов определяли колориметрически с использованием многоканального спектрофотометра Titertek Multiskan® MCC («Labsystems», Финляндия) в супернатантах клеток при помощи

реактива Грейса, а пролиферацию – в лизате клеток после инкубации с МТТ («Calbiochem», США).

При изучении влияния оридонина на локальное воспаление в качестве вещества сравнения использовали вольтарен («НовартисФарма АГ»). Th1-тип иммунного ответа моделировали на мышах линии С57BL/6 однократным введением 10^8 эритроцитов барана (ЭБ, «ЭКОлаб», РФ) внутрибрюшинно в объёме 0,2 мл физиологического раствора (ФР), Th2-тип иммунного ответа – на мышах линии BALB/c трёхкратным введением (с интервалом 14 суток) под кожу бедра 100 мкг овальбумина (OVA) и 5 мг гидроокиси алюминия (оба «Sigma», США) в 0,1 мл ФР. Th1-локальное воспаление изучали на 6-е сутки, а Th2 – на 7-е сутки после иммунизации, для чего вводили в «контрольную» и «опытную» лапы вольтарен (980 мкМ) или оридонин (5 и 50 мкМ), в «опытную лапу» также вводили 107 ЭБ (Th1-воспаление) или 20 мкг OVA (Th2-воспаление) в общем объеме 0,05 мл. Мышам контрольной группы в «контрольную лапу» вводили эквивалентное количество ФР, а в «опытную лапу» соответствующие количества ЭБ или OVA. Местную реакцию оценивали через 24 часа (Th1-воспаление) и 4 ч (Th2-воспаление) как разницу между контрольной и опытной лапой и выражали в мг. Концентрации исследуемых веществ, не вызывающие воспалительной реакции, были подобраны в предварительных экспериментах.

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6.0, используя однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Даннета.Различия показателей считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Проведённое исследование показало, что оридонин эффективно влиял на NO-продуцирующие свойства макрофагов в концентрации 5 и 50 мкМ, концентрация нитритов достоверно снижалась по сравнению с контролем в 1,9 и 2,5 раза соответственно. Культивирование Мф с оридонином оказывало ингибирующее действие на пролиферативные свойства клеток только в концентрации 50 мкМ, снижая значения показателя в 2,5 раза по сравнению с контролем. Концентрации оридонина 0,05 и 0,5 мкМ не оказывали значимого влияния на пролиферацию Мф и продукцию ими оксида азота.

На модели локального воспаления Th1-типа оридонин проявлял выраженное противовоспалительное действие сравнимое с действием вольтарена. Так, введение в лапу вольтарена снижало отёк в 2,9 раза, а оридонина в концентрации 50 мкМ – в 2,4 раза. Оридонин в концентрации 5 мкМ не влиял на величину реакции воспаления.

Оридонин также снижал локальную реакцию гиперчувствительности немедленного типа (Th2-воспаление), вызванную введением овальбумина, в 3 раза. Изучаемый ингибитор подавлял местную воспалительную реакцию в 2,2 и 1,4 раза в концентрациях 5 и 50 мкМ соответственно. При этом действие оридонина в концентрации 5 мкМ не отличалось от действия вольтарена, что позволяет сделать вывод о большей эффективности низких доз ингибитора при подавлении локального воспаления Th2-типа.

Таким образом, оридонин оказывает влияние на функциональную активность Мф, снижая как пролиферацию клеток, так и продукцию ими оксида азота, что может свидетельствовать о тесной взаимосвязи процесса активации антигенпрезентирующих клеток и NF-κB-зависимого сигналинга. Кроме того, оридонин снижает локальное воспаление Th1- и Th2-типа, что также подтверждает участие NF-κB-сигнального пути в развитии этих типов иммунного ответа. Регуляция сигнального каскада NF-κB является перспективным направлением для создания новых противовоспалительных средств, а ингибитор оридонин является перспективной молекулой для коррекции внутриклеточного сигналинга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. New insights into the role of Nuclear factor-kappa B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases / F. Chen, V. Castranova, X. Shi et al. // Clinical Chemistry. 1999. V. 45. P. 7-17.
2. Shang C. H., Zhang Q. Q., Zhou J. H. Oridonin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes / C. H. Shang, Q. Q. Zhang, J. H. Zhou // Inflammation.– 2016. [Epub ahead of print] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26923246.
3. Oridonin, a diterpenoid purified from Rabdosia rubescens, inhibits the proliferation of cells from lymphoid malignancies in association with blockade of the NF-kappa B signal pathways / T. Ikezoe, Y. Yang, K. Bandobashi et al. // Molecular Cancer Therapeutics.– 2005.– V. 4, N 4.– P. 578-586.

EFFECT OF NF-kB INHIBITOR ORIDONIN ON MACROPHAGE ACTIVATION AND LOCAL TH1 AND TH2 TYPE INFLAMMATION

Trofimova E. S., Danilets M. G., Ligacheva A. A., Sherstoboev E. Yu.

RIP and RM named after E. D. Goldberg, Tomsk, Russia

We studied the effect of NF-κBinhibitor oridonin on macrophage activation *in vitro* and local Th1- and Th2-type inflammation. Oridonin was shown to reduce macrophages proliferation and NO-production and edema caused by sheep erythrocytes (Th1-type inflammation) and local immediate-type hypersensitivity response caused by ovalbumin (Th2-type inflammation). The anti-inflammatory effects of oridonin were similar to those of voltaren.

Keywords: oridonin, NO, NF-kB, macrophages, local inflammation.

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ОЗОНИДОВ В СОСТАВЕ ОЗОНИРОВАННОГО ОЛИВКОВОГО МАСЛА *IN VITRO*

Щетинин С. А., Шишкова Ю. С., Коркмазов М. Ю.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

Цель: определить бактерицидную активность на модели с грам (+) и грам (–) микроорганизмов озонированного рафинированного оливкового масла с различным перекисным числом для терапии воспалительных заболеваний слизистых ЛОР-органов. С учетом результатов микробиологического и физико-химического исследования наиболее оптимальным в терапии воспалительных заболеваний ЛОР-органов является использование озонированного оливкового масла с перекисным числом 420 meq O_2/кг.

Ключевые слова: озонированное масло, биоцидность, микрофлора.

Актуальность. Поиск адъювантных подходов и разработка алгоритмов, способных выявить и ликвидировать клинические и иммунологические нарушения при воспалительных заболеваниях, связан с недостаточной клинической эффективностью существующих схем терапии, развитием резистентности к антимикробным препаратам, наличием побочных действий и аллергических реакций на используемые лекарственные средства [1]. Озонотерапия с успехом применяется для лечения хронических воспалительных заболеваний различных органов и систем [4]. В то же время, недооцененным является использование озонированных масел в терапии воспалительных заболеваний слизистых оболочек, в частности, в оториноларингологии [3]. Предметом дискуссий является механизм иммунотропных и дозозависимых эффектов озонированных растительных масел [5]. Полагают, что высокий окислительно-восстановительный потенциал озонидов является одним из ключевых факторов повышения иммунологической эффективности обеспечивающих бактерицидный, фунгицидный и противовирусный эффекты [2].

Цель: определить бактерицидную активность озонированного рафинированного оливкового масла с различным перекисным числом для терапии воспалительных заболеваний слизистых ЛОР-органов.

Материалы и методы. Озонирование рафинированного оливкового масла («Borges Extra Virgin», производитель: Aceites Borges, Испания) происходило с использованием озонатора «Медозон» по ТУ 9444-001-11441871-97 (ООО фирма «МЕДОЗОН», Москва), рег. удо-

стоверение № ФСР 2011/11135, по схеме: 100 мл. каждого масла барботировали в течение 20 минут со скоростью газового потока 1л/мин., при концентрациях подаваемого озона в озонокислородной смеси (ОКС) 3, 10 и 30 мг/л.

Определение перекисного числа (ПЧ) в 10 образцах, озонированного и неозонированного оливкового масла, проводилось в соответствии с ГОСТ ISO 3960-2013 методом йодометрического титрования, в основе которого лежал метод окисления озоном йодида до йода с последующим титрованием раствора серноватокислого натрия и расчетом перекисного числа.

Изучение бактерицидных свойств озонированного масла проводили на модели *S. aureus* АТСС № 25923 как представителя грам (+) микрофлоры, и *E. coli* штамм М-17 как представителя грам (–) микрофлоры. В день проведения эксперимента готовили 5 рядов по 4 пробирки в каждом с 0,9 мл. взвеси суточной культуры *S. aureus* АТСС № 25923 и *E. coli* штамм М-17 в концентрациях 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 КОЕ/мл. физиологического раствора хлорида натрия соответственно. Затем в первый ряд вносили 0,1 мл неозонированного оливкового масла, во второй – 0,1 мл озонированного оливкового масла с ПЧ 420 meq O_2/кг, в третий – 0,1 мл озонированного оливкового масла с ПЧ 635 meq O_2/кг, в четвёртый ряд – 0,1 мл озонированного оливкового масла с ПЧ 969 meq O_2/кг. Для контроля жизнеспособности бактериальной культуры *S. aureus* АТСС № 25923 и *E. coli* штамм М-17 в пятый ряд вносили 0,1 мл. стерильного физиологического раствора хлорида натрия. Инкубацию проводили при температуре 37°С в течение 20 минут с дальнейшим высевом на пластинчатый МПА по 0,1 мл тестируемых суспензий, чашки с посевами инкубировали при температуре 37°С в течение 24 часов и подсчитывали количество выросших колоний, результаты выражали в КОЕ/мл.

Результаты. До проведения озонирования ПЧ оливкового масла было 1,69 meqO_2/кг. Показатели ПЧ оливкового озонированного масла при концентрации озона 3 мкг/л в ОКС были 420 meq O_2/кг, при концентрации озона 10 мкг/л – 635 meq O_2/кг, при концентрации озона 30 мкг/л – 969 meq O_2/кг.

При изучении бактерицидности в отношении грам (+) и грам (–) микроорганизмов, нами было использовано озонированное оливковое масло с ПЧ 420 meq O_2/кг, 635 meq O_2/кг, 969 meq O_2/кг. Результаты исследований бактерицидности *in vitro* показали, что неозонированное оливковое масло не обладает бактерицидными свойствами, о данном факте свидетельствует 100 % рост бактериальной культуры *S. aureus* АТСС № 25923 и *E. col*i штамм М-17 (более 10 КОЕ/мл). При добавлении к бактериальной взвеси озонированного рафинированного оливкового масла с различным ПЧ наблюдался абсолютный микробоцидный эффект по отношению к *S. aureus* вне зависимости от величины ПЧ. Аналогично, при добавлении к бактериальной взвеси *E. coli* штамм М-17 озонированного рафинированного оливкового масла с различным ПЧ, также наблюдался абсолютный микробоцидный эффект. Результаты проведённых исследований выявили абсолютную бактерицидность рафинированного оливкового масла с ПЧ 420 meq O_2/кг, 635 meqO_2/кг и 969meqO_2/кг. 100 % бактерицидность в отношении микроорганизмов связана, по данным ряда авторов, с непосредственным влиянием МФК на цитоплазму и ядерный аппарат бактерий, вызывая инактивацию энзимов бактериальных клеток [4].

Вывод. Учитывая результаты микробиологических исследований, а также литературных данных о деструктивных воздействиях высоких концентраций озонидов на клетки и ткани, проявляющихся жжением и сухостью слизистой, для терапии воспалительных заболеваний ЛОР-органов целесообразно использование озонированного оливкового масла с ПЧ 420 meq O2/кг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на состояние местного иммунитета репродуктивной системы у женщин с хламидийной инфекцией. Дис. … канд. биол. наук. Челябинск, 2004.
2. Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы и факторы мукозального иммунитета / О. А. Гизингер // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Челябинская государственная медицинская академия.– Челябинск.– 2010.
3. Гизингер О. А., Коркмазов М. Ю., Щетинин С. А. Комплексное лечение и профилактика обострений хронического и рецидивирующего аденоидита у часто болеющих детей / О. А. Гизингер, М. Ю. Коркмазов, С. А. Щетинин // Инфектология.– 2015.– Т. 7.– № 4.– С. 43-46.
4. Масленников О. В., Конторщикова К. Н., Шахов Б. Е. Руководство по озонотерапии / О. В. Мас-

ленников, К. Н. Конторщикова, Б. Е. Шахов. – Нижний Новгород: Издательство «Исток», 2015. – 346 с.
5. Щетинин С. А., Коркмазов М. Ю., Гизингер О. А. Возможности оптимизации консервативной терапии хронического аденоидита у детей с использованием озонированного масла в комплексном лечении / С. А. Щетинин, М. Ю. Коркмазов, О. А. Гизингер // Российская оториноларингология. – 2015. – № 4(77). – С. 110-114.

STUDY OF BACTERICIDAL PROPERTIES OF DIFFERENT CONCENTRATION OFOZONIDES OF OZONATED OLIVE OIL *IN VITRO*

Shchetinin S. A., Shishkova Y. S., Korkmazov M. Y.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

Objective: To study of bactericidal activity of ozonated olive oil on model with Gram-positiv and Gram-negativ microorganisms with different size of peroxide value for the treatment of inflammatory diseases of the mucous membranes of upper respiratory tract. Based on the results of microbiological and physical and chemical analysis of the optimal in the treatment of inflammatory diseases of upper respiratory tract is the use of ozonated olive oil with a peroxide value of 420 meq O_2 / kg.

Keywords: ozonated oil, bactericidal, microflora.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА ПОЛУДАН ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОНЪЮНКТИВИТЕ В МАГНИТНОМ ПОЛЕ ПОВЫШЕННОЙ НАПРЯЖЁННОСТИ

Медведева М. В., Ярмамедов Д. М.

ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет Минздрава России, Курск, Россия

Развитие конъюнктивита в условиях магнитного поля повышенной напряженности имеет ряд особенностей. В сравнительном аспекте изучен ряд иммунологических показателей при лечении экспериментального конъюнктивита с применением полудана. Было выявлено, что использование препарата полудан в таких условиях повышает активность фагоцитарной системы, снижая выраженность воспалительного процесса.

Ключевые слова: конъюнктивит, магнитное поле, Курская магнитная аномалия, иммуномодулятор, полудан.

Конъюнктивиты составляют до 2/3 в структуре воспалительных заболеваний глаз [1]. Лечение пациентов с конъюнктивитом в первую очередь направлено на устранение провоцирующего агента, а также на повышение антиинфекционной резистентности организма.

К иммуностимулирующим препаратам в офтальмологической практике относится полудан, действие которого связанно с интерфероногенной активностью. Полудан оказывает противовирусное и иммуностимулирующее действие за счёт стимуляции выработки эндогенного интерферона α и в меньшей степени интерферона β и γ. Одним из факторов, определяющим течение заболеваний переднего отрезка глаза являются факторы внешней среды, такие как экологическая обстановка, и, в частности, геомагнитный фон. В экспериментальной модели на животных выявлена, однонаправленность морфофункциональных из-

менений при возмущении геомагнитного поля Земли, а также при действии искусственных источников магнитного поля с различной напряжённостью. Интенсивное магнитное поле влияет на морфологические и биохимические показатели крови, вызывая снижение параметров неспецифической резистентности.

Целью данной работы являлся анализ динамики иммунологических показателей в сыворотке крови у морских свинок с экспериментальным конъюнктивитом в условиях действия магнитных полей различной напряжённости.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на 30 морских свинках массой тела 700-900 г. с экспериментальным конъюнктивитом. Патологический процесс вызвали путём инфицирования конъюнктивы глаза взвесью суточной агаровой культуры *Staphylococcus aureus* (2×10^9 микробных тел/мл). Животные были разделены на три группы. Первая группа (контрольная) состояла из 10 условно здоровых животных, которые на протяжении всего эксперимента находились в условиях действия фонового геомагнитного поля напряжённостью 0,5 эрстеда. Две другие группы животных (экспериментальная и группа сравнения) по 10 морских свинок в каждой были помещены в установку, генерирующую аномально высокий уровень магнитного поля в 3 эрстеда, который соответствует значениям зоны Курской магнитной аномалии, за две недели до начала эксперимента и находились в ней в течение всего опыта. После двухнедельной экспозиции в установке у животных экспериментальной группы и группы сравнения был вызван экспериментальный конъюнктивит [2]. При этом экспериментальная группа получала лечение в виде ежедневного 15-минутного форсажа глазных капель препарата полудан с концентрацией 1 ЕД в инфицированный глаз. Группа сравнения лечения не получала. Для оценки параметров антиинфекционной защиты производился внутрижелудочковый забор крови в объёме 5 мл на третьи и четырнадцатые сутки после инфицирования. Оценивали состояние фагоцитарного звена, рассчитывали фагоцитарный показатель, а также проводили нитросиний тетрозолий тест спонтанный и стимулированный [3]. Эксперименты проводились в соответствии с положениями Страсбургской Конвенции по защите прав позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (1986 г).

Обработка результатов исследования проводилась методами непараметрической статистики [4]. При оценке отличий между количественными данными внутри групп использовался критерий Вилкоксона. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. К третьим суткам после инфицирования конъюнктивы глаза взвесью золотистого стафилококка у животных, как группы сравнения, так и экспериментальной группы, сформировался воспалительный процесс. К концу срока наблюдения в группе сравнения были отмечены изменения со стороны фагоцитарного показателя и системы кислородзависимой бактерицидности фагоцитов: значения фагоцитарного показателя увеличились с 57,20±3,92 % до 61,80±3,27 % ($p\leq0.05$). Показатели спонтанного НСТ-теста уменьшились на 17,2 % – с 0,29±0,03 до 0,24±0,02 ($p\leq0.05$). При анализе стимулированного НСТ-теста была выявлена схожая динамика – уменьшение на 12,5 %, т.е. с 0,32±0,04 до 0,28±0,02 ($p\leq0.05$). При этом клинические проявления патологического процесса были достаточно выражены. В ходе изучения аналогичных показателей в экспериментальной группе, получавшей инстилляции полудана на протяжении 10 суток, к 14 суткам было также отмечено повышение фагоцитарного показателя по сравнению с 3 сутками – с 58,1±3,34 % до 61,2±4,05 % ($p\leq0.05$). При этом в отличие от группы сравнения значения спонтанного НСТ-теста увеличились на 7,4 % – с 0,268±0,02 до 0,293±0,04 ($p\leq0.05$). Значения стимулированного теста с хлоридом нитросинего тетрозолия увеличились на 6,9 %, т.е. с 0,29±0,03 до 0,31±0,04 ($p\leq0.05$), что сопровождалось снижением выраженности воспалительного процесса по сравнению с животными группы сравнения.

Вывод. Таким образом, было выявлено, что при развитии конъюнктивита в условиях непрерывного длительного воздействия магнитного поля, которое значительно превышает фоновые значения геомагнитного поля, отмечается усиление фагоцитарного процесса. Использование иммуностимулирующего препарата полудан в таких условиях повышает активность кислородзависимых бактерицидных систем, снижая выраженность воспалительного процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Нероев, В.В., Майчук, Ю.Ф. Заболевания конъюнктивы. «Краткое издание национального руководства по офтальмологии» / В.В. Нероев, Ю.Ф. Майчук.– Москва.– 2014.– 407 с.

Медведева, М.В., Биляк, А.С. Воздействие препарата полудан на иммунологические и биохимические показатели крови животных с экспериментальным конъюнктивитом в магнитном поле повышенной напряжённости / М.В. Медведева, А.С. Биляк // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».– 2015.– № 4.– С. 104-107.

Виксман, М.Е., Маянский, А.Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия. Метод. рек. / М.Е. Виксман, А.Н. Маянский.– Казань, 1979.– 14 с.

Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета программ Statistica / О.Ю. Реброва.– Москва: Медиасфера, 2002.– 312 с.

IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BLOOD OF ANIMALS ON THE BACKGROUND EFFECTS OF THE DRUG POLUDAN WITH EXPERIMENTAL CONJUNCTIVITIS MAGNETIC FIELD HIGH TENSION

Medvedeva M.V., Yarmamedov D.M.

Kursk State Medical University Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia

Development of conjunctivitis in a magnetic field of high tension has a number of features. The comparative aspect studied a number of immunological parameters in experimental conjunctivitis with Poludan. It was found that the use of the drug in Poludanum these conditions increases the activity of the phagocytic system, reducing the severity of inflammation.

Keywords: conjunctivitis, magnetic field, Kursk magnetic anomaly, immunomodulator, Poludanum.

МЕТОДОЛОГИЯ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ АКТИВАТОРА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА В ПРЕПАРАТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Кривых М.А., Корнилова О.Г.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия

Проведен обзор методических подходов к определению содержания активатора прекалликреина в инфузионных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека. Показана необходимость разработки национального стандарта качества на методику определения активатора прекалликреина.

Ключевые слова: активатор прекалликреина; хромогенный субстрат; препараты крови человека; иммуноглобулины; альбумин.

Активатор прекалликреина (АП) является биологически активным фрагментом фактора свертывания крови XII (фактора Хагемана). Присутствие АП в препаратах крови человека связано с возможным гипотензивным эффектом при внутривенном введении. АП активирует прекалликреин, переводя его в калликреин, который, в свою очередь, вызывает активацию кининового пути по принципу положительной обратной связи и приводит

к вазодилатации и гипотензии [1, 2]. Содержание АП является одним из важных показателей качества, определяющих специфическую безопасность таких инфузионных препаратов крови человека, как альбумин и иммуноглобулины. Требования, касающиеся содержания АП были установлены Европейской фармакопеей (ЕФ) в 1998 г. [2]. В настоящее время ЕФ установлены требования по содержанию АП в инфузионных препаратах крови человека на уровне не более 35 МЕ/мл (для препаратов иммуноглобулинов требования указаны для растворов с концентрацией белка 30 г/л) [3]. Всемирная организация здравоохранения также рекомендует проводить определение содержания АП в некоторых препаратах крови человека, включая альбумин (Материалы ВОЗ, 1992).

Целью исследования являлось изучение методологии оценки содержания активатора прекалликреина в препаратах альбумина и иммуноглобулинов человека.

В настоящее время в России зарегистрировано 19 наименований инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека (13 наименований зарубежного производства) и 29 – альбумина человека, 9 из них зарубежного производства [4]. Отечественными производителями инфузионных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека не предусмотрен контроль качества по содержанию АП. Нормативные требования содержания АП в указанных препаратах зарубежного производства находятся на уровне от «не более 10 МЕ/мл» до «не более 35 МЕ/мл». В соответствии с монографией ЕФ содержание АП определяют спектрофотометрическим методом с хромогенным субстратом [3].

Метод определения основан на превращении прекалликреина в калликреин в присутствии АП, образовавшийся калликреин способен отщеплять хромофор (п-нитроанилина) от синтетического хромогенного субстрата, что позволяет определять скорость протеолиза спектрофотометрическим методом. Скорость образования п-нитроанилина в реакционной смеси прямо пропорциональна содержанию АП в исследуемом образце. Содержание АП вычисляют путем сравнения со стандартным образцом (СО), калиброванным в МЕ.

Определение проводят в несколько этапов: на первом этапе к определенному количеству исследуемого образца и соответствующего разведения СО добавляют определенное количество прекалликреина (рекомендуемое соотношение образец/прекалликреин составляет 1:9, необходимо для исключения ошибок, связанных с изменением ионной силы и значением pH инкубационной смеси) с последующей инкубацией при 37 °С в течение заданного времени [3]. Буферный раствор с pH 8,0±0,05 и 0,15 М натрия хлорида создает надлежащую ионную силу [2].Проведенный анализ методических подходов к определению АП позволил выявить различия в соотношении образец/прекалликреин инкубационной смеси (от 1:4 до 1:10) на первом этапе образования калликреина. Время инкубации также варьирует, несмотря на то, что инкубация при 37 °С в течение 10 мин является наиболее распространенной, отдельные производители увеличили инкубационный период до 45 мин. Возможно данное увеличение было оптимизировано для конкретного метода или характеристик прекалликреина, используемых производителями. Однако, существует опасность того, что более длинные периоды инкубации могут исчерпывать прекалликреин и привести к неадекватной оценке содержания АП [1, 2].

Использование прекалликреина собственного изготовления, согласно ЕФ, указано в методиках 77 % инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека и 67 % препаратов альбумина человека зарубежного производства, включенных в Госреестр ЛС [4]. Качество прекалликреина устанавливают путем измерения отсутствия калликреиновой активности [3]. Прекалликреин из коммерческих источников (CoachromDiagnostica, American-Diagnostica Gmbh и др.) используется в методиках 23 % инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека и 33 % препаратов альбумина человека зарубежного производства, хотя неизвестно, насколько сравнимы используемые прекалликреины.

На втором этапе смесь или ее часть инкубируют в присутствии, по меньшей мере, равного объема раствора подходящего хромогенного субстрата, обладающего известной специфичностью к калликреину. Во всех исследованных методиках определения АП используется хромогенный субстрат S-2302 производства Chromogenix.

Учет результатов проводят во временном интервале от 2 до 10 мин, регистрируя скорость изменения оптического поглощения в минуту (кинетический метод) при длине волны 405 нм

или по конечной точке с использованием 50 % раствора уксусной кислоты. Исследуемый образец и СО также должны быть измерены на наличие калликреина в отсутствие прекалликреина (контрольный образец, содержащий буфер вместо прекалликреина), с целью внесения соответствующих поправок при расчете содержания АП. По калибровочной кривой, построенной с использованием значений, полученных для СО и его соответствующих концентраций, определяют содержание АП в исследуемом образце в МЕ/мл.

Фармакопейной статьей «Альбумин человека» (ФС.3.3.2.006.15) Государственной фармакопеи РФ XIII издания установлены требования по содержанию АП на уровне не более 35 МЕ/мл хромогенным методом.

Таким образом, разработка национального стандарта качества на методику определения АП является актуальной задачей. Важно разработать простой, удобный и воспроизводимый анализ для выявления АП в отечественных инфузионных препаратах крови человека. Для оптимизации условий определения АП необходимо изучать эффекты pH, ионной силы, прекалликреина и времени реакции. Объем исследуемых образцов, их концентрацию и время инкубации выбирать таким образом, чтобы зависимость регистрируемой скорости реакции от концентрации АП имела линейный характер в интервале значений калибровочной кривой (от 2 до 35 МЕ/мл).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. An international collaborative study to replace the 1st international standard for Prekallikrein activator / C. Longstaff, M. E. Behr-Gross, A. Daas et al. // Vox. Sang. – 2005. – V. 88. – P. 143-151.
2. An improved, reliable and practical kinetic assay for the detection of prekallikrein activator in blood products / I. S. Shin, Y. B. Shim, C. M. Hong, et al. // Arch. Pharm. Res. – 2002. – V. 25. N 4. – P. 505-510.
3. European Pharmacopoeia 8.5. [Электронныйресурс] URL: http://online6.edqm.eu/ep805/# (датаобращения: 01.03.2016).
4. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx (дата обращения: 25.02.2016).

EVALUATION METHODOLOGY OF PREKALLIKREIN ACTIVATOR IN THE PREPARATION OF HUMAN BLOOD

Krivykh M. A., Kornilova O. G.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The report introduces a review of methodological approaches to the determination of the content of prekallikrein activator infusion preparations in immunoglobulin and human albumin. The main cause to deliver a report is the necessity of the development of national quality standards on the methodology for determining the prekallikrein activator.

Keywords: prekallikrein activator; chromogenic substrate; human blood products; immunoglobulin; albumin.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ: МЕТОДЫ И КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ

Корнилова О. Г., Кривых М. А., Кудашева Э. Ю., Борисевич И. В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия

Рассмотрены проблемы оценки специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения. Представлены методы и критерии оценки содержания гемагглютининов, анти-D антител, активатора прекалликреина, уровня антикомплементарной активности и тромбогенного потенциала, обеспечивающие адекватную оценку возможного риска возникновения нежелательных эффектов, вызванных инфузионной терапией препаратами иммуноглобулинов человека.

Ключевые слова: препараты иммуноглобулинов человека, специфическая безопасность, методы и критерии оценки.

Безопасность внутривенного применения препаратов иммуноглобулинов человека является одной из приоритетных составляющих оценки их качества. Инфузии этих препаратов могут спровоцировать активацию системы комплемента с образованием анафилатоксинов, активацию калликреин-кининовой, плазминовой систем и системы свертывания крови, изменение реологических свойств крови, а также инициировать внутрисосудистый гемолиз. Для минимизации риска развития возможных нежелательных эффектов при применении к препаратам иммуноглобулинов человека для внутривенного введения (ИГВВ) предъявляют высокие требования специфической безопасности.

Целью исследований явился анализ методов и критериев оценки специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения.

Специфическая безопасность препаратов ИГВВ – это характеристика препарата, основанная на сравнительном анализе его эффективности и риска причинения вреда здоровью, связанного с влиянием на системы гемостаза, комплемента и калликреин-кининовую. Это влияние может быть обусловлено остаточным содержанием в готовом препарате таких компонентов плазмы крови, как анти-D антитела, гемагглютинины, активатор прекалликреина, активированные факторы свертывания крови и др. или конформационно измененных в процессе производства и/или хранения молекул иммуноглобулинов.

Показателями специфической безопасности ИГВВ являются: «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-D антитела», «Активатор прекалликреина». Международные требования по этим показателям сформулированы в Европейской фармакопее, а также отражены в рекомендациях ВОЗ [1,2]. Отечественными производителями контроль специфической безопасности препаратов ИГВВ осуществляется только по антикомплементарной активности (АКА), некоторые – по содержанию гемагглютининов.

Введение в действие национальных стандартов качества на ИГВВ и методы их контроля [3] позволит гармонизировать с международными требования к отечественным препаратам по показателям специфической безопасности и улучшить переносимость инфузий препаратов иммуноглобулинов человека.

Критерии оценки специфической безопасности препаратов ИГВВ обусловленыфакторами потенциальной опасности, связанной с их негативным влиянием на системы гемостаза, комплемента и калликреин-кининовую. Уро-

вень АКА препаратов ИГВВ зависит от наличия конформационных изменений молекулы иммуноглобулина в процессе производства и/или хранения. Содержание анти-А и анти-В гемагглютининов обусловлено соответствующим превалированием в производственном пуле плазмы доноров с группой крови I(0), II(A) и/или III(B). Наличие анти-D антител связано с использованием плазмы Rh(–) доноров, имеющих эти антиэритроцитарные антитела. Активатор прекалликреина, являющийся биологически активным фрагментом фактора свертывания крови XII, присутствует в препаратах ИГВВ вследствие его неполного удаления в ходе технологического процесса.

Метод оценки АКА препаратов ИГВВ, основанный на реакции связывания комплемента, позволяет установить способность высокомолекулярных и денатурированных белков (агрегатов), присутствующих в препаратах ИГВВ, связывать комплемент в отсутствие комплексов антиген-антитело. Значение этого критерия соответствует допустимому пределу АКА – не более 1 CH50 на 1 мг иммуноглобулина для внутривенного введения.

Содержание гемагглютининов IgG определяют в реакции непрямой гемагглютинации. Значение критерия, подтверждающее отсутствие агглютинации А и В эритроцитов в разведении препарата ИГВВ 1:64, позволяет исключить вне сосудистые реакции вызванные посредством активизации макрофагов. Содержание гемагглютининов IgM, определяют в реакции прямой гемагглютинации. Значение критерия, подтверждающее отсутствие агглютинации А и В эритроцитов в разведении препарата ИГВВ 1:64, значительно снижает риск возникновения интраваскулярного гемолиза.

Модифицированная реакция Кумбса с использование бычьего сывороточного альбумина и эритроцитов, обработанных папаином, позволяет выявить анти-D антитела, в том числе неполные (IgG). Содержание антирезусных антител, не превышающее 0,0475 МЕ/мл, является максимально допустимым, которое при внутривенном введении не приводит к развитию гемолитических осложнений. Значение критерия определяют относительно стандартного образца содержания анти-D антител, выявляя максимальное разведение препарата, в котором может наблюдаться агглютинация резус-положительных эритроцитов (не более 1:8).

Активность активатора прекалликреина (АП), присутствующего в препаратах ИГВВ, выявляют спектрофотометрическим методом с использованием хромогенного субстрата. Значение критерия соответствует содержанию активатора прекалликреина, не превышающему 35 МЕ/мл, которое минимизирует гипотензивный эффект, связанный с влиянием на калликреин-кининовую систему при инфузиях ИГВВ.

В связи с появлением новых данных о возможных тромбоэмболических осложнениях иммуноглобулинотерапии, которые связаны с контаминацией препаратов тромбинообразующими агентами, появилась настоятельная необходимость оценки тромбогенного потенциала препаратов ИГВВ на этапах фармацевтической разработки. Критериями оценки является остаточное содержание факторов свертывания крови II, VII, IX, X, калликреина в количестве не более 50 мМЕ/мл, XIa – не более 10 мМЕ/мл, влияние препарата на изменение неактивированного частичного тромбопластинового времени стандартной (нормальной) плазмы человека, изменение кинетики генерации тромбина.

Таким образом, критерии и методы оценки содержания гемагглютининов, анти-D антител, активатора прекалликреина и АКА, тромбогенного потенциала, гармонизированные с международными требованиями, позволяют адеватно оценить специфическую безопасность препаратов ИГВВ и исключить возникновение нежелательных эффектов иммуноглобулинотерапии, связанных с влиянием на системы гемостаза, комплемента и калликреин-кининовую.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. EuropeanPharmacopoeia 8.5 [Электронный ресурс]: http://online6.edqm.eu/ep805/# (дата обращения: 01.03.2016).
2. WHO. Technical Report Series – 1992.– № 840.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс]: URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/ (дата обращения: 01.03.2016).

SPECIFIC SAFETY OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS PREPARATIONS FOR INTRAVENOUS ADMINISTRATION: METHODS AND EVALUATION CRITERIA

Kornilova O. G., Krivykh M. A., Kudasheva E. Yu., Borisevich I. V.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The problems of specific safety of human immunoglobulin preparations for intravenous administration are considered in the article. There are presented methods and evaluation criteria of haemagglutinins, anti-D antibodies, prekallikrein activator, level of anticomplementary activity and thrombogenic potential content, providing adequate valuation of adverse effects potential risk, caused by human immunoglobulin preparations infusion therapy.

Keywords: Human immunoglobulin preparations, the problems of specific safety, methods and evaluation criteria.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РЕАКТИВНЫХ АРТРИТОВ

Журавлева М. О.

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург, Россия

У пациентов РеА определены изменения уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, в плазме крови до и после назначения антибиотиков, а также показатели клинической, воспалительной и функциональной активности. Применение сумамеда приводит к более значительному снижению концентрации маркеров воспалительной активноси при РеА: СОЭ, СРБ, ФНО-α, ИФН-g, ИЛ-6, ИЛ-8. Значимо снизились показатели клинической (утренней скованности, числа болезненных и припухших суставов, выраженности боли по ВАШ) воспалительной (СОЭ, СРБ, DAS 28) и функциональной активности (индексу BASDAI, функциональной недостаточности суставов).

Ключевые слова: реактивный артрит, антибиотики, цитокины.

Одной из актуальных проблем современной ревматологии является лечение воспалительных заболеваний суставов. Реактивный артрит (РеА) является одним из наиболее распространенных и социально значимых ревматических заболеваний с частотой встречаемости Российской Федерации, по данным Минздрава России 99,0 на 100 тыс. детского населения и 42,8 на 100 тыс. взрослого населения [1].

РеА – заболевание со сложным генезом. Тригерными факторами считают микроорганизмы, для которых присущ облигатный (хламидии, некоторые виды вирусов) или факультативный (йерсинии, шигеллы, микоплазмы, кампилобактерии, сальмонеллы, др.) паразитизм [2]. Обнаружение в сыворотке и синовиальной жидкости больных РеА циркулирующих бактериальных АГ и фрагментов ДНК и РНК микробов дало толчок к формированию принципиально новых взглядов на РеА. В настоящее время к РеА относят воспалительные негнойные заболевания суставов, развивающиеся вследствие иммунных нарушений после кишечной или урогенитальной инфекции [3].

В основе патогенеза РеА лежит дисбаланс цитокинов. Важную роль в эрадикации ин-

фекционных агентов, особенно в случае с внутриклеточными бактериями, играют провоспалительные цитокины Th1 типа, такие как интерферон гамма (ИФ-γ) и фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-α) [4]. В других исследованиях было показано, что при РеА антибактериальный Th1-иммунный ответ (продукция ИФ-γ, ФНО-α, ИЛ-2 и ИЛ-12) снижен в пользу Th2–иммунного ответа (синтез ИЛ-4 и ИЛ-10) [2, 5]. Для лечения РеА этиологически и патогенетически показано назначение антибиотиков тетрациклинового ряда, макролидов, фторхинолонов.

Цель исследования: изучить клинико-иммунологические особенности антибиотикотерапии реактивных артритов.

Материалы и методы. Обследовано 110 больных РеА. Всем было проведено физикальное, лабораторное, рентгенологическое, ультразвуковое, иммунологическое, микробиологическое обследование. Диагноз ставился на основании критериев, принятых на III Международном совещании по РеА в Берлине в 1996 г. Больные были разделены на 2 группы по 55 человек в каждой. Пациенты I группы получали доксициклин по 100 мг 2 раза в день, II группы – азитромицин (сумамед) по 500 мг в течение 3 дней в неделю, курс лечения – 1 месяц. Кроме того все больные получали найз по 100 мг 2 раза в день, антимикотическую терапию (флюконазол 150 мг в неделю), местное лечение миромистином с первого дня антибактериальной терапии. Группы были сопоставимы по полу, возрасту, характеру течения заболевания и степени функциональной недостаточности суставов. Преобладали люди трудоспособного возраста со II степенью функциональной недостаточности и высокой степенью активности поDAS 28 и индексу BASDAI.

Признаки синовиита отмечались при ультразвуковом исследовании у всех обследованных, периартрита более чем у половины. У всех была обнаружена хламидийная инфекция, у половины она сочеталась с микоплазмами и уреаплазмами, у 2 человек с иерсиниями. Эффективность оценивалась по изменению клинико-лабораторных показателей воспаления, индексу BASDAI.

Определение концентраций ФНО-α, ИФН-γ, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ИЛ-4 проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа в сыворотке крови с использованием наборов реагентов ООО «Цитокин» (Россия). Статистическую обработку материала выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 6,0. Результаты выражали в видесредней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m), медианы (Me), нижних (Q25) и верхних (Q75) квартилей. Значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок и непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. После назначения обоих антибиотиков у всех больных исчезли признаки угенитального воспаления, отсутствовали хламидии в мазках из уретры и влагалища и при ПЦР. Во всех группах больных РеА наблюдалось достоверное (p=0,0001) сокращение утренней скованности, уменьшение числа болезненных и припухших суставов, выраженности боли по ВАШ. Показатели воспалительной и функциональной активности значимо снизились в обеих группах. СОЭ в I группе до лечения было 15,9±1,93 мм/ч, а после – 10,1±3,0 мм/ч, во II группе – 14,7±1,6 и 10,8±2,5 мм/ч соответственно. СРБ после антибиотикотерапии у всех больных РеА стал отрицательным. DAS 28 в I группе в среднем составил 4,17±0,1 баллов до и 2,48±0,2 баллов после лечения, во II группе – 4,15±0,1 и 3,09±0,3 балла, BASDAI 6,0±0,2 и 2,97±0,4в I группе, 5,9±0,2 и 3,9±0,5 баллов во II группе соответственно.

Антибиотикотерапия у пациентов РеА привела к достоверному снижению содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Уровень ФНОα до лечения составил 26,32±2,38 пг/мл, после терапии – 12,95± 1,92 пг/мл, p=0,0001. Отмечалось значимое снижение содержания ИЛ-8 с 211,64±42,8 пг/мл до 148,95±81,9 пг/мл; ИЛ-6 с 10,98±1,85 пг/мл до 8,67±2,91 пг/мл, p=0,001; ИФН-γ с 107,95± 42,2 пг/мл до 77,26±22,5 пг/мл, p=0,02. Однако при назначении доксициклина достоверно снизились только концентрации ФНОα и ИФН-γ с 22,75±3,5 до 11,22±3,0 пг/мл (p=0,0001) и с 84,06±44,2 до 44,01±5,1 пг/мл (p=0,02) соответственно. Лечение сумамедом привело к статистически значимому (p=0,0001) снижению уровней всех изучаемых провоспалительных цитокинов.

Антибактериальная терапия при РеА влияла и на содержание в сыворотке противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-10). Отмечалось снижение уровней ИЛ-10 и повышение

ИЛ-4. У пациентовII группыданные показатели менялись достоверно (p=0,0001), а у больных I группы – не значительно (p>0,05).

Таким образом, назначение антибиотикотерапии обеспечивает достоверное снижение провоспалительных цитокинов. Показатели клинической, воспалительной и функциональной активности РеА значимо снизились в обеих группах. Применение сумамеда приводит к значительному снижению концентрации маркеров воспалительной активноси при РеА: СОЭ, СРБ, ФНО-α, ИФН-γ, ИЛ-6, ИЛ-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Реактивные артриты / Б. С. Белов, С. В. Шубин, Р. М. Балабанова и др. // Научно-практическая ревматология.– 2015.– № 4.– С. 414-420.
2. Изучение цитокинового статуса больных реактивным артритом / А. М. Лила, Т. Г. Шемеровская, Т. В. Гапонова и др. // Медицинская иммунология.– 2008.– № 2.– С. 167-172.
3. Kwiatkowska B., Filipowicz-Sosnowska A. Reactive arthritis / B. Kwiatkowska, A. Filipowicz-Sosnowska // Pol Arch Med Wewn.– 2009.– V. 119(1-2).– P. 60-65.
4. Chou C. T., Huo A. P., Chang H. N. Cytokine produ ction from periphera l blood mononuclear cells in patients with ank ylosing spondylitis and their first-degree relatives / C. T. Chou, A. P. Huo, H. N. Chang // Arch. Med.Res.– 2007.– 38 (1).– P. 190-195.
5. Журавлева М. О., Филиппова Ю. В. Уровни цитокинов в крови пациентов с реактивным артритом в зависимости от длительности течения заболевания / М. О. Журавлева, Ю. В. Филиппова // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9. № 2 (18).– С. 448-450.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF PATHOGENETIC THERAPY OF REACTIVE ARTHRITIS

Zhuravleva M. O.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

In patients Rea identified changes in levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in plasma before and after antibiotic treatment, as well as indicators of clinical, functional and inflammatory activity. The application of Sumamed leads to more significant decrease in the concentration of inflammatory markers in aktivnosti Rea: ESR, CRP, TNF-α, IFN-g, IL-6, IL-8. Significantly lower clinical (morning stiffness, number of painful and swollen joints, intensity of pain on VAS) inflammation (ESR, CRP, DAS 28) and functional activity (BASDAI index, functional insufficiency of the joints).

Keywords: reactive arthritis, antibiotics, cytokines.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ КОМПОЗИЦИОННОГО ПРЕПАРАТА ДС РНК ФАГАφ6 и ИФН-АЛЬФА-2b

Сысоева Г. М., Батенева А. В., Гамалей С. Г., Лебедев Л. Р., Даниленко Е. Д.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Бердск, Россия

В экспериментах на мышах проведено исследование влияния композиционного препарата, содержащего дсРНК фага φ6 и рекомбинантный ИФН-альфа-2b человека на синтез интерферона и метаболическую активность перитонеальных макрофагов. Установлено, что композиционный препарат обладает способностью повышать синтез интерферона и активность перитонеальных макрофагов, при этом эффект композиции был более длительным по сравнению с препаратом сравнения дсРНК.

Ключевые слова: дсРНК, ИФН-альфа, мыши, индукция ИФН, макрофаги.

В настоящее время накоплен значительный положительный опыт применения препаратов интерферонов и их индукторов в клинической практике для профилактики и лечения вирусных инфекций. В качестве противовирусных препаратов в нашей стране и за рубежом активно исследуются индукторы интерферона, действующим началом которых являются двуспиральные РНК (дсРНК) синтетического и природного происхождения [1]. В экспериментальных исследованиях показано, что выраженными интерферон-индуцирующими и противовирусными свойствами обладает и дсРНК, полученная из фага φ6 [3]. С другой стороны, известно, что эффект индуктора интерферона может усиливаться при его сочетанном применении с интерферонами [4]. В связи с этим, можно предположить, что сочетание в одном препарате интерферона и его индуктора перспективно с точки зрения создания нового эффективного противовирусного средства.

Целью данной работы являлась оценка влияния композиционного препарата, содержащего индуктор интерферона дсРНК фага φ6 и рекомбинантный интерферон альфа-2b человека, на активность факторов системы неспецифической противовирусной устойчивости мышей.

Материалы и методы. В работе исследовали композиционный препарат фаговой дсРНК и рекомбинантный интерферон-альфа-2b (ИФН-альфа-2b) человека с содержанием основных компонентов 0,8 мг/мл и 10^3 МЕ/мл, соответственно. В качестве препаратов сравнения использовали препарат дсРНК фага φ6 (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Бердск Новосибирской области) и ИФН-альфа-2b (субстанция препарата Реаферон, ЗАО «Вектор-Медика», пгт. Кольцово Новосибирской области), в концентрациях эквивалентных концентрациям в композиционном препарате. Выделение и очистку дсРНК фага проводили по методу [2] с модификациями. Исследование проведено на 84 белых беспородных мышах, самцах, массой 18-22 г. Композиционный препарат и препараты сравнения вводили однократно внутрибрюшинно в дозах 8 мг/кг или 0,8 мг/кг (по дсРНК) и 10 тыс.МЕ/кг (по ИФН) в объеме 0,2 мл на 20 г веса тела животных. Через 5 и 24 ч после введения у мышей забирали на анализ кровь и перитонеальные макрофаги. Концентрацию ИФН-альфа в сыворотке крови мышей определяли иммуноферментным методом с помощью коммерческого набора «MouseIFN-alphaPlatinumELISA» («eBioscience», Австрия). Оценку окислительно-восстановительной активности макрофагов проводили на монослойной культуре перитонеальных макрофагов с помощью НСТ-теста [5]. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ “Statgraphics, Vers.5.0” (Statistical Graphics Corp., USA). Достоверность обнаруженных межгрупповых различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Введение композиции дсРНК фага φ6 и ИФН-альфа-2b в дозе 8 мг/кг (по дсРНК), также как и дсРНК фага, приводило к значительному усилению синтеза ИФН-альфа животных в этих группах мышей уже через 5 ч после введения. Концентрация ИФН-альфа в сыворотке крови животных опытной группы и группы сравнения достигала 1495±496 и 1500±500 пг/мл, соответственно. Через сутки после введения содержание ИФН снижалось, хотя и оставалось на высоком уровне. Следует отметить, что значения ИФН-альфа в крови мышей через сутки после введения композиционного препарата в 2,2 раза превышали значения показателя в группе животных, получивших инъекцию дсРНК (480±35 и 220±116 пг/мл, соответственно). Содержание ИФН в сыворотке крови мышей, которым вводили препарат ИФН-альфа-2b (10тыс. МЕ/кг), в течение всего периода наблюдения не отличалось от нуля. Снижение дозы дсРНК в композиционном препарате в 10 раз (до 0,8 мг/кг по дсРНК), также как и препарата дсРНК, не отражалось на интенсивности продукции эндогенного ИФН-альфа в первые часы после введения. Содержание ИФН в крови животных этих групп составляло 1102±153 и 1268±50 пг/мл, соответственно, через сутки значения показателя мало отличались от контрольных. Пролонгации ИФН-индуцирующего эффекта в этом случае не наблюдали, что, возможно, связано с более низкой концентрацией дсРНК в композиции. Таким образом, композиционный препарат, содержащий дсРНК фага φ6 и рекомбинантный ИФН-альфа-2b, обладает способностью усиливать продукцию интерферона в течение более длительного времени, чем дсРНК. При этом эффект препарата зависел от концентрации входящих в его состав компонентов и дозы введения.

Композиционный препарат повышал число макрофагов перитонеального экссудата мы-

шей (5 ч после введения) и их окислительно-восстановительную активность (через 5 и 24 ч после введения). Увеличение значений показателя НСТ-теста в эти сроки составило 164 и 147 %, соответственно, по сравнению с показателем контроля. Повышение уровня окислительно-восстановительной активности перитонеальных макрофагов наблюдали и после введения препарата дсРНК, однако, статистически значимое увеличение показателя в этом случае было обнаружено лишь через сутки после введения. Увеличение метаболической активности макрофагов в группах мышей, которым вводили препарат дсРНК/ИФН-альфа-2b либо дсРНК в дозе 0,8 мг/кг, также как и при введении большей дозы препаратов, наблюдали через сутки после введения. Повышение показателя в этих группах животных составило, соответственно, 164 % и 175 % по сравнению с показателями контроля. То есть, уменьшение дозы индуктора интерферона не приводило к снижению значений метаболической активности макрофагов, однако модулирующий эффект ИФН в этом случае не проявлялся.

Полученные данные свидетельствуют о том, что композиционный препарат, содержащий дсРНК фага φ6 и рекомбинантный ИФН-альфа-2b человека, обладает способностью усиливать продукцию интерферона и метаболическую активность макрофагов мышей. При этом эффект композиции был более длительным по сравнению с дсРНК и зависел от концентрации дсРНК в составе препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Результаты и перспективы использования индукторов интерферона в лечении инфекционных болезней / Ф. И. Ершов, А. А. Шульдяков, М. Г. Романцов и др. // Вестник РАМН.– 2013.– № 10.– С. 46-52.
2. Выделение и очистка двуспиральной рибонуклеиновой кислоты из киллерного штамма дрожжей Saccharomycescerevisiae / Л. Р. Лебедев, Ю. С. Аликин, Е. Ю. Рослякова и др. // Биофарм. ж.– 2014.– Т. 6, № 6.– С. 32-38.
3. Носик Н. Н., Пугачев В. Г., Ершов Ф. И. Двунитевая РНК фага Ф6: интерферон-индуцирующие и противовирусные свойства / Н. Н. Носик, В. Г. Пугачев, Ф. И. Ершов // Антибиотики и химиотерапия.– 1990.– Т. 35.– № 3.– С. 25-27.
4. Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models / J. D. Morrey, C. W. Day, J. G. Julander et al. // Antivir. Chem. Chemother.– 2004.– V.15, N.2.– P. 101-109.
5. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon / G. A. Rook, J. Steel, S. Umar et al. // J. Immunol. Methods.– 1985.– V. 82, № 1.– P. 161-167.

THE STUDY OF THE IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF THE COMPOSITE DRUG BASED ON DCRNA OF PHAGE φ6 AND RECOMBINANT HUMAN IFN-ALPHA-2b

Sysoeva G. M., Bateneva A. V., Gamaley S. G., Lebedev L. R., Danilenko E. D.

Institute of Medical Biotechnology, FSBI SRC VB «Vector», Berdsk, Novosibirsk Region, Russia

The effects of the composite drug containing the bacteriophage dsRNA and recombinant human IFN-alpha-2b on interferon synthesis and the metabolic activity of peritoneal macrophages were studied in experiments in mice. The composite drug was found to be capable of increasing the synthesis of interferon and the activity of peritoneal macrophages, the effect of the composition was more prolonged as compared with the reference drug dsRNA.

Keywords: dsRNA, IFN-alpha, mice, synthesis of IFN, macrophages.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА «ДЕРИНАТ» У ПОСТРАДАВШИХ С ТРАВМАТИЧЕСКИМ ШОКОМ

Малышев М. Е, Арискина О. Б., Громов М. И., Пивоварова Л. П., Осипова И. В., Хабирова Т. Г., Кизявка М. И.

ГБУ СПбНИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия

Исследовали иммуномодулирующее влияние препарата «Деринат» при лечении пострадавших с сочетанной травмой, сопровождающейся шоком. При применении дерината в комплексной терапии больных с сочетанной травмой наблюдали повышение содержания в крови $CD25^+$-лимфоцитов, В-лимфоцитов, повышением содержания IgG и усилением бактерицидных свойств нейтрофильных гранулоцитов.

Ключевые слова: иммунотерапия, иммуномодуляторы, травматический шок.

Актуальность. Многофакторная иммуносупрессия является неотъемлемой составляющей патогенеза травматической болезни. Развитие иммуносупрессии обусловлено такими системными процессами как гипоксия, гипоперфузия, реперфузия, метаболические нарушения, оксидативный стресс. Степень выраженности иммунологической недостаточности при сочетанной травме, сопровождающейся шоком, столь значительна, что самостоятельно организм пострадавшего не может компенсировать многочисленные морфофункциональные расстройства в иммунной системе [1]. Это требует проведения иммунокоррекции. Применение препарата «Деринат», вызывающего активацию миело- и эритропоэза, направлено на восстановление не только количественного дефицита эритроцитов и моноцитов в крови, но и функциональной недостаточности фагоцитов крови.

Цель исследования. Изучение иммуномодулирующего влияния препарата «Деринат» при лечении пострадавших с сочетанной травмой, сопровождающейся шоком.

Материалы и методы. Обследовали 35 пострадавших с сочетанной механической травмой и шоком II и III степени (средний возраст – 34,8). Пациенты находились на лечении в отделении сочетанной травмы ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе. Больные были разделены на 2 группы: пациенты, получавшие Деринат наряду со стандартной терапией (основная группа – 15 чел.), пациенты со стандартной терапией, не получавшие Деринат (контрольная группа – 20 чел.). Деринат (ЗАО «Техномедсервис», РФ) 75 мг (5мл 1,5 % раствора) вводили больным через 24 часа после травмы, с интервалом в 1 день (всего 5 инъекций). Во время введения препарата и наблюдения его эффектов у пациентов обеих групп не применяли эритроцитсодержащие компоненты крови для коррекции анемии. Исследование крови пострадавших проводили при поступлении в противошоковое отделение, через 24 часа, на 3, 5 и 10 сутки после травмы.

Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа («Вектор-Бест»). Оксидантную активность клеток крови пострадавших оценивали по уровню хемилюминесценции (ХЛ) крови (люминометр 1251, BIO-ORBIT). Фенотипирование моноцитов и лимфоцитов крови проводили с помощью иммуноцитохимического метода (моноклональные антитела Novocastra).

Результаты. Иммуностимулирующий эффект Дерината связан с его способностью активировать клетки моноцитарно-макрофагальной системы. Следствием активации клеток этой системы является повышение функциональной активности всех звеньев иммунитета [2].

Лабораторные показатели как клеточного, так и гуморального иммунитета при поступлении достоверно не отличались у пострадавших обеих групп. Однако у пациентов

основной группы наблюдалась более выраженная анемия – число эритроцитов – 2,7 (2,4; 3,1)×10^{12}/л, по сравнению с 3,1 (2,9; 3,6)×10^{12}/л у пострадавших контрольной группы. Однако уже на 3 сутки после применения Дерината было отмечено выравнивание показателей содержания эритроцитов в обеих группах.

При оценке клеточного иммунитета было отмечено, что содержание $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$-лимфоцитов у больных основной группы и группы сравнения практически не различалось. Однако, в группе с применением Дерината уже на 3 сутки после введения препарата наблюдали повышение относительного содержания $CD20^+$ (В-лимфоцитов) до 30 %, что было достоверно выше показателей группы сравнения. Аналогично, содержание активированных $CD25^+$-лимфоцитов было достоверно выше в основной группе, начиная с 3 суток и вплоть до 10 суток.

Также, на 3 сутки исследования в группе с применением Дерината отмечали достоверное повышение IgG в сыворотке крови (12,8 (10,2; 14,5) г/л) по сравнению с группой сравнения (6,0 (4,2; 8,9) г/л). Содержание IgA и IgM в обеих группах достоверно не отличалось.

Применение Дерината приводило к повышению бактерицидной активности нейтрофильных гранулоцитов. Начиная с 3 суток, уровень стимулированной зимозаном хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов пострадавших основной группы достоверно превышал уровень хемилюминесценции нейтрофилов группы сравнения. Терапия Деринатом также способствовала достоверному увеличению количества НГ, содержащих дефензины 1-3 типа, начиная с 3 суток после травмы.

Выводы. Применение Дерината у пострадавших с сочетанной травмой, сопровождающейся шоком II-III степени, показало выраженное иммуномодулирующее действие препарата, связанное с увеличением популяции $CD25^+$-лимфоцитов, В-лимфоцитов, повышением содержания IgG и усилением бактерицидных свойств нейтрофильных гранулоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Состояние моноцитопоэза и функциональная активность моноцитов при сочетанной травме / Л. П. Пивоварова, М. Е. Малышев, О. Б. Арискина и др. // Инфекции в хирургии.– 2013.– Т. 10, № 3.– С. 19-22.
2. Каплина Э. Н., Вайнберг Ю. П. Деринат – природный иммуномодулятор для детей и взрослых / Э. Н. Каплина, Ю. П. Вайнберг.– Москва: Научная книга, 2005.– 216 с.

USE OF IMMUNOMODULATORS "DERINAT" IN PATIENTS WITH TRAUMATIC SHOCK

Malyshev M. E., Ariskina O. B., Gromov M. I., Pivovarova L. P., Osipova I. V., Habirova T. G., Kizyavka M. I.

Saint-Peterburg I. I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency, St. Petersburg, Russia

We studied the immunomodulatory effect of the drug «Derinat» in the treatment of patients with combined trauma, accompanied by shock. When using derinat in the treatment of patients with combined trauma observed increase in blood $CD25^+$ lymphocytes and B lymphocytes, increased IgG content in blood, increasing the bactericidal activity of neutrophils.

Keywords: immunotherapy, immunomodulators, traumatic shock.

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* НА ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ЦИНКОМ

Сизенцов А. Н., Афонина Е. Ю., Егорова К. И., Ефремова А. В.

ФГБОУ ВПО Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

В публикации представлены данные о влиянии пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* на бета-литическую и лизоцимную активность сыворотки крови лабораторных животных при создании экспериментальной интоксикации сульфатом цинка. Полученные данные свидетельствуют об эффективном использовании пробиотиков с целью стимуляции показателей неспецифической резистентности, а также предотвращают иммунодефицитные состояния возникающие вследствие интоксикации ионами цинка.

Ключевые слова: неспецифическая резистентность, интоксикация медью, пробиотики.

В современной медицине широко используют препараты цинка для повышения иммунобиологической реактивности организма, улучшения обмена веществ. Дефицит цинка развивается при многих заболеваниях и состояниях и обуславливает потерю аппетита, снижение скорости роста, нарушения адаптации к темноте, нейропсихические нарушения, изменения состава крови, остеомаляция и др.

Цинк является элементом 2 группы периодической системы. Атомный номер 30, относится к числу относительно широко распространенных металлов в биосфере Земли.

Цинк относится к непереходным металлам. Непереходные металлы не окисляются до более высокого состояния, чем двухвалентное. Цинк растворяется в щелочах и аммиаке. Большинство солей цинка растворяется в воде. Вместе с медью и свинцом цинк занимает первое место среди рассеянных элементов по интенсивности поглощения. В среднем с атмосферными осадками ежегодно выпадает на 1 кв. км поверхности Земли 72 кг цинка – в 3 раза больше, чем свинца, и в 12 раз больше, чем меди. Серьезным источником поступления цинка в воду является вымывание его горячей водой из оцинкованных водопроводных труб – до 1.2-2.9 мг с поверхности 1 кв. дм в сутки.

Избыточное поступление цинка в организм животных сопровождается падением содержания кальция не только в крови, но и в костях, одновременно нарушалось усвоение фосфора, в результате развивается остеопороз. Помимо этого цинк в высоких концентрациях является активатором кристаллизации [1].

На основании вышеизложенных данных перед нами была поставлена следующая **цель:** изучить эффективность применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* в системе выведения из организма избыточных содержаний цинка. Проводилась оценка гематологических, биохимических показателей крови и показателей неспецифической резистентности, а так же исследования патоморфологических изменений органов-мишеней и содержания цинка в различных тканях животного.

Для исследования возможностей выведения ионов цинка нами были выбраны пробиотические препараты, так как входящие в их состав бактерии рода *Bacillus* обладают уникальной способностью к биоаккумуляции металлов [2, 3]. В качестве пробиотических препаратов нами были использованы: Споробактерин (*Bacillussubtilis 534*), Бактисубтил (*Bacilluscereus IP 5832*), Ветом-2 (*Bacillussubtilis ВКПМ B 7048* и *Bacilluslicheniformis ВКПМ*

B 7038). В качестве токсиканта использовали – $ZnSO_4$ (сульфат цинка). Все исследования были выполнены на модели групп-аналогов лабораторных животных (крыс) породы «Вистер». Экспериментальная часть была выполнена на базе экспериментально-биологической клиники (вивария) Оренбургского государственного университета.

С целью проведения исследования из 96 особей крыс было сформировано восемь групп – пять контрольных и три опытных. Первая контрольная группа получала основной рацион ($К_0$), вторая – основной рацион с добавлением сульфата цинка из расчёта 150 мг/кг веса тела ($К_1$), третья – основной рацион с добавлением «Споробактерина» ($К_2$), четвертая – основной рацион с добавлением «Ветома-2» ($К_3$), пятая – основной рацион с добавлением «Бактисубтила» ($К_4$). Три опытные группы получали основной рацион с добавлением сульфата железа и пробиотиков – «Ветом-2» ($О_1$), «Споробактерин» ($О_2$), «Бактисубтил» ($О_3$).

Исследования выполнялись аналогично исследования по изучению биоаккумулирующей способности бактерий рода *Bacillus* при интоксикации свинцом и кадмием [2].

В качестве показателей естественной резистентности нами выбраны лизоцимная активность сыворотки крови и активность бета-лизинов [4]. Методика выполнения: Определение лизоцимной активности по О. В. Бухарину. Бета-литическую активность определяли фотонефелометрическим методом по О. В. Бухарину.

Лизоцимная активность сыворотки крови лабораторных животных опытных групп ($О_1$, $О_2$, $О_3$) и контрольной группы металла ($К_1$) на протяжении всего опыта с различной степенью достоверности была выше, чем у животных контрольных групп пробиотиков. Так на 7 день эксперимента у крыс опытной группы $О_3$, которой задавали «Ветом-2» и цинк регистрировалось наибольшее увеличение уровня лизоцимной активности по сравнению с контролем «Ветома-2» на 82 %, к 21 дню исследования этот показатель у особей опытной группы превышал его в контроле на 40 %.

У опытной группы $О_1$ лизоцимная активность на 7 день опыта превышала соответствующий контроль на 24 %, а на 21 день – 19,1 %. Аналогичные показатели опытной группы $О_2$ на 7 и 21 дни исследования составляли 58,9 % и 9,8 % соответственно.

С показателями бета-лизинов прослеживалась аналогичная лизоцимной активности динамика. Повышение уровня наблюдалось у группы контроля металла ($К_1$) и опытных групп ($О_1$, $О_2$, $О_3$) начиная с седьмого и по двадцать первый дни эксперимента.

Наибольшее повышение показателей пришлось на группы контролей металлов. Так, на 7 день опыта контроль цинка по сравнению с фоновым значением отличался на 90,3 %, а на 21 день – 81,7 %.

Опытные группы $О_1$ и $О_3$ к концу исследования по динамике практически не отличались от фонового значения. Группа $О_2$ на завершающем этапе опыта превышали фоновую группу $К_0$ на 34,3 %.

Из полученных данных следует, что пробиотики способствуют стимулирующему действию по отношению к факторам неспецифической резистентности – лизоцимной активности и бета-литической активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The use of probiotic preparations on basis of bacteria of a genus Bacillus during intoxication of lead and zinc / A. Sizentsov, O. Kvan, A. Vishnyakov at al. // Life Science Journal.– 2014.– V. 11 (10).– P 18-20.
2. Сизенцов А. Н., Барышева Е. С., Бабушкина А. Е. Способность пробиотических препаратов на основе бактерий рода *bacillus* к биоаккумуляции ионов тяжелых металлов в организме лабораторных животных / А. Н. Сизенцов, Е. С. Барышева, А. Е. Бабушкина // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9 (18), № 2 (1).– С. 33-34.
3. Сизенцов А. Н. Эффективность применения пробиотических препаратов при интоксикации цинком / А. Н. Сизенцов // Вестник ветеринарии.– 2013.– № 2 (65).– С. 34-36.
4. Барышева Е. С., Сизенцов А. Н., Климова Т. А. Влияние пробиотических препаратов на основе бактерий рода *bacillus* на показатели неспецифического иммунитета при интоксикации железом / Е. С. Барышева, А. Н. Сизенцов, Т. А. Климова // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9 (18), № 2 (1) – С. 684-685.

INFLUENCE OF PRO-BIOTIC PREPARATIONS ON THE BASIS OF SORT *BACILLUS* BACTERIA ON INDICATORS OF NONSPECIFIC IMMUNITY AT INTOXICATION ZINC

Sizentsov A. N., Afonina E. Y., Egorova K. I., Efremova A. V.

Orenburg State University, Orenburg, Russia

Data on influence of probiotic preparations on the basis of sort *Bacillus* bacteria on beta and lytic and lysozyme activity of serum of blood of laboratory animals at creation of experimental intoxication are presented in the publication by zinc sulfate. The obtained data testify to effective use of probiotics for the purpose of stimulation of indicators of a nonspecific resistance, and also prevent the immunodeficiency arising in intoxication consequence zinc ions.

Keywords: nonspecific resistance, intoxication copper, probiotics.

ОЦЕНКА БИОАККУМУЛИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ИОНОВ ЦИНКА И МЕДИ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS* ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Сизенцов А. Н., Афонина Е. Ю., Егорова К. И., Ефремова А. В.

ФГБОУ ВПО Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

В публикации представлены данные по изучению биоаккумулирующей способности пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* ионов цинка и меди при создании экспериментальной интоксикации. Полученные данные свидетельствуют о эффективном использовании пробиотиков с целью снижения уровня ионов тяжелых металлов в различных тканях лабораторных животных. В ходе эксперимента было установлено, что интенсивность извлечения как ионов цинка и меди составляет более 50 %, при этом наиболее эффективными являются препараты Споробактерин и Бактисубтил.

Ключевые слова: Bacillus, биоаккумуляция, медь, цинк, пробиотики.

К наиболее опасным поллютантам, формирующимся в процессе жизнедеятельности человека, относятся тяжелые металлы. Особенно это выражено на территориях с развитой цветной металлургией. Для всех тяжелых металлов характерна их способность к аккумуляции [1].

Медь и цинк являются жизненно важными эссенциальными элементами. Например, медь входит в состав многих витаминов, гормонов, ферментов, дыхательных пигментов, участвует в процессах обмена веществ, в тканевом дыхании и т.д. . Их избыточное накопление также приводит к негативным влиянием на организм и как следствие к развитию патологических состояний.

Основными проявления избытка меди являются функциональные расстройства нервной системы, в частности депрессия, бессонница, ухудшение памяти; влияние пыли и окиси меди может приводить к слезоточивости, раздражение конъюнктивы и слизистых оболочек, слабости, болях в мышцах, желудочно-кишечным расстройствам, нарушения функций почек и печени, с вторичным повреждением головного мозга; увеличение риска развития атеросклероза.

К основным проявлениям избытка цинка можно отнести: нарушение функций иммунной системы, аутоиммунные реакции; болевая чувствительность желудка, тошнота, нарушения состояния кожи, волос, ногтей; ослабление функций предстательной железы, поджелудочной железы и печени.

Важным является то, что входящие в состав пробиотических препаратов микроорганизмы рода *Bacillus*, являются самоэлиминирующимися антагонистами и способны оказывать антитоксическое действие, проявляющееся в активном выведении токсичных веществ из организма, в частности тяжелых металлов [1, 2].

На основании вышеизложенных данных перед нами была поставлена **цель:** изучить эффективность применения пробиотиков на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* при интоксикации цинком и медью.

Для исследования возможностей выведения ионов цинка и меди нами были выбраны пробиотические препараты, так как входящие в их состав бактерии рода *Bacillus* обладают уникальной способностью к биоаккумуляции металлов [3, 4]. В качестве пробиотических препаратов нами были использованы: Споробактерин (*Bacillussubtilis 534*), Бактисубтил (*BacilluscereusIP 5832*), Ветом-2 (*Bacillussubtilis ВКПМ B 7048* и *Bacilluslicheniformis ВКПМ B 7038*).В качестве токсиканта использовали соли тяжелых металлов: сульфат цинка и сульфат меди. При выборе металлов исходили из того, что они являются наиболее распространенными загрязнителями окружающей среды. Все исследования были выполнены на модели групп-аналогов лабораторных животных (крыс) породы «Вистер».

С целью проведения исследования из 144 особей было сформировано двенадцать групп – шесть контрольных и шесть опытных. $К_0$ – получала основной рацион, $К_1$ – основной рацион с добавлением сульфата цинка из расчёта 150 мг/кг веса тела, $К_2$ – основной рацион с добавлением сульфата меди из расчёта 150 мг/кг веса тела, $К_3$ – основной рацион с добавлением «Споробактерин», $К_4$ – основной рацион с добавлением «Бактисубтила», $К_5$ – основной рацион с добавлением «Ветом-2», три опытные группы получали основной рацион с добавлением сульфата цинка и пробиотиков – «Споробактерин» ($О_1$), «Бактисубтил» ($О_2$), «Ветом-2» ($О_3$), и три опытные группы – основной рацион с добавлением сульфата меди и пробиотиков – $О_4$, $О_5$ и $О_6$, соответственно. Дозировки пробиотиков соответствовали аннотациям препаратов. Подопытные животные находились в одинаковых условиях содержания.

Исследования выполнялись аналогично исследования по изучению биоаккумулирующей способности бактерий рода *Bacillus* при интоксикации свинцом и кадмием [1].

В ходе проведенных экспериментальных исследований было установлено, что наибольшей биоаккумулирующей способностью по отношению к ионам меди обладает костная ткань, а цинка – костная и мышечная ткани соответственно. На протяжении всего эксперимента в контрольных и опытных группах отмечается снижение концентрации ионов исследуемых металлов. Однако для всех опытных групп процент выведения по сравнению с контрольными группами $К_1$, $К_2$, был значительно выше и суммарные значения для ионов цинка во всех изучаемых тканях к 21 дню исследования составили 60,5 % для группы $О_1$, 47,9 % – $О_2$ и 35,2 % – $О_3$. Для ионов меди аналогичные значения в опытных группах составили для группы $О_4$ – 53 %, для групп $О_5$ и $О_6$ – 59 % и 48 %, соответственно.

В результате исследования установили, что препараты пробиотиков содержащие бактерий рода *Bacillus* способствуют снижению концентрации ионов цинка и меди во всех исследуемых тканях, при этом наибольшей аккумулирующей способностью по отношению к их накоплению обладает костная и мышечная ткань.

Наиболее эффективным из исследуемых препаратов при интоксикации ионами цинка является препарат Споробактерин, а при интоксикации медью Бактисубтил. Наименее эффективным в отношении обоих металлов оказался препарат Ветом-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сизенцов А. Н., Барышева Е. С., Бабушкина А. Е. Способность пробиотических препаратов на основе бактерий рода *bacillus* к биоаккумуляции ионов тяжелых металлов в организме лабораторных животных / А. Н. Сизенцов, Е. С. Барышева, А. Е. Бабушкина // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9 (18), № 2 (1).– С. 33-34.
2. Эффективность применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* при

лечении экспериментальной интоксикации медью / А. Н. Сизенцов, Е. Ю. Исайкина, О. В. Кван и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3.
3. Сизенцов А. Н. Эффективность применения пробиотических препаратов при интоксикации цинком / А. Н. Сизенцов // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 2 (65). – С. 34-36.
4. The use of probiotic preparations on basis of bacteria of a genus Bacillus during intoxication of lead and zinc / A. Sizentsov, O. Kvan, A. Vishnyakov at al. // Life Science Journal. – 2014. – V. 11 (10). – P. 18-20.

ASSESSMENT OF THE BIOACCUMULATING ABILITY OF IONS OF ZINC AND COPPER BACTERIA OF THE SORT *BACILLUS* OF THE PROBIOTIC PREPARATIONS WHICH ARE A PART IN THE ORGANISM OF LABORATORY ANIMALS

Sizentsov A. N., Afonina E. Yu., Egorova K. I., Efremova A. V.

Orenburg State University, Orenburg, Russia

Data on studying of the bioaccumulating ability of probiotic preparations on the basis of bacteria of the sort *Bacillus* of ions of zinc and copper at creation of experimental intoxication are presented in the publication. The obtained data testify to effective use of probiotics for the purpose of decrease in level of ions of heavy metals in various tissues of laboratory animals. During experiment it was established that intensity of extraction as ions of zinc and copper makes more than 50 %, thus the most effective are preparations Sporobakterin and Baktisubtil.

Keywords: Bacillus, bioaccumulation, copper, zinc, probiotic.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОКОРРЕГИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА, АССОЦИИРОВАННЫХ С АНАЭРОБНО-МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Антимирова Е. А., Прокопьев Д. С., Летяева О. И., Ковалев Д. А., Дольникова О. А.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия

Проведено открытое, рандомизированное, клинико-иммунологическое, исследование 108 женщин репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта, ассоциированных с анаэробно-микоплазменной инфекцией. Показано, что присутствие в генитальном тракте анаэробно-микоплазменных ассоциаций сопровождается нарушениями в системе локального иммунитета, изменением качественного и количественного состава резидентной микрофлоры. Локальное применение в составе комплексной терапии препарата полиоксидоний способствует эффективному разрешению клинических симптомов и устранению дисфункций в локальном иммунном статусе.

Ключевые слова: анаэробно-микоплазменная инфекция, урогенитальный тракт, мукозальный иммунитет, полиоксидоний.

Микоплазмы, являются комменсалами урогенитального тракта и способны вызывать инфекционно-воспалительный процесс лишь при определенных неблагоприятных условиях. К этим условиям относится в том числе, ассоциация с другими условно-патогенными ми-

кроорганизмами [1]. Патогенность *G. vaginalis, Mobiluncusspp.* и других анаэробных бактерий значительно возрастает в составе биопленок, что приводит не только к неудачам терапии, но и развитию акушерско-гинекологической патологии [2]. Большинство лекарственных препаратов, применяемых в лечении урогенитальных инфекций, оказываются неэффективными в случае хронического рецидивирующего процесса, либо при наличии микробных ассоциаций. В этой ситуации, использование иммунокорригирующих препаратов, является обоснованным [3]. Препарат полиоксидоний (азоксимера бромид) является иммуномодулирующим, антиоксидантным, детоксицирующим средством.

Цель работы: оценить клинико-иммунологическую эффективность, обоснованность применения препарата полиоксидоний® в комплексной терапии воспалительных заболеваний урогенитального тракта женщин, ассоциированных с анаэробно-микоплазменной инфекцией.

Материалы и методы. В период с 2012 по 2015 год обследованы 108 пациенток, в возрасте от 18 до 36 лет, средний возраст 27,7±0,3 г. Микроскопии подвергались нативные и окрашенные по Граму мазки. Для выявления *U.urealyticum*, *U.parvum*, *M.hominis* и анаэробных бактерий проводилось исследование методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием тест – системы «Флороценоз». Диагноз выставлялся на основании жалоб пациентки, клинико-лабораторных признаков воспалительного процесса и выявлении *U.urealyticum*, *U.parvum*, *M.hominis*. Пациентки, с диагнозом N 72.0; B96.8 (цервицит, ассоциированный *U.urealyticum*, *U.parvum*, *M.hominis*) были рандомизированы на две группы: «базис + полиоксидоний» (n=67), у которых в составе комплексной терапии был использован полиоксидоний®. Препарат был назначен по 6мг вагинально ежедневно № 10. И группу «базис» (n=41). Базисная терапия включала прием доксициклина моногидрата по 100 мг два раза в день № 10, орнидазол 500 мг два раза в день № 5. Группу сравнения составили 50 практически здоровых женщин.

Результаты и обсуждение: терапевтический эффект оценивали через месяц (первый контрольный визит) и 6 месяцев (второй контрольный визит) после проведенной терапии. В первый контрольный визит у пациенток группы «базис+полиоксидоний» в 82,9 % (55 пациенток) было отмечено разрешение симптомов воспаления. В группе «базис» у 25 % пациенток сохранялись клинические признаки воспалительного процесса. Во время второго контрольного визита оценивали эффективность этиотропной терапии, разрешение воспалительного процесса, показатели локального иммунитета. В группе «базис» этиологическая эффективность составила 90 %. Разрешение симптомов воспаления отмечено у 27 (65,8 %), анаэробные бактерии выявлены у 9 (21,9 %) пациенток. В группе «базис+полиоксидоний» этиологическое излечение было достигнуто у 64 (95,7 %) пациенток, клинические признаки воспаления и анаэробные бактерии выявлены у двух пациенток (2,9 %). У женщин, использовавших в комплексной терапии полиоксидоний®, было отмечено более выраженное снижение числа лейкоцитов в цервикальной слизи с $15,8\pm0,6\times10^9$ до $5,9\pm0,3\times10^9$, количества жизнеспособных нейтрофилов с 8,6±0,5 % до 4,1±0,2 %. Уровень секреторной активности нейтрофилов, до лечения, был значительно меньше чем у здоровых женщин, и составлял: дефенсины – 0,14±0,23 (0,19±0,09), BPI – 0,45±0,021 (0,97±0,31), лизоцим – 0,012±0,002 (0,028±0,01), лактоферрин – 0,05±0,020 нг/мл (0,13±0,02). Использование иммунотропной терапии позволило нормализовать эти показатели: уровень дефенсинов в группе «базис» после проведенной терапии составил 0,14± 0,02 нг/мл, в группе «базис+полиоксидоний» 0,18±0,06 нг/мл, показатели BPI установлен на уровне 0,64±0,3 нг/мл и 0,80±0,36 нг/мл соответственно. Такая же тенденция наблюдалась и в изменении уровня лизоцима и лактоферрина. Уровень лизоцима в группе «базис» составил 0,019±0,03 нг/мл, в группе «базис+ полиоксидоний» 0,024±0,03 нг/мл. Показатель лактоферрина в группе «базис» составил после лечения 0,07±0,03 нг/мл, в группе «базис+ полиоксидоний» до 0,11±0,01 нг/мл.

Изучение концентрации IgA в цервикальном секрете показало достоверное снижение его уровня во всех группах до начала лечения. В результате проведенной терапии отмечено повышение этого показателя. Более выраженная динамика отмечена у пациенток, использовавших полиоксидоний (p=0,01). Уровень IgG в цервикальной слизи, повышенный до начала лечения в обеих группах, в процессе терапии

достоверно снижался (p<0,05). В группе «базис» уровень IgG снизился в 1,25 раза. В группе «базис+полиоксидоний» в 1,7 раза.

По результатам бактериологического исследования после окончания лечения было установлено снижение роста условно-патогенной микрофлоры, уменьшение количества возбудителей участвующих в ассоциации. В группе «базис» количество условно-патогенной флоры не менялось, оставаясь достоверно повышенным. Во второй контрольный визит в группе «базис+полиоксидоний» качественный и количественный состав условно-патогенных микроорганизмов не отличался от показателей здоровых женщин.

Выводы: локальное применение полиоксидония в составе комплексной терапии воспалительных заболеваний урогенитального тракта женщин способствует нормализации факторов местной противоинфекционной защиты, что позволяет повысить эффективность лечениями удлинить срок ремиссии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зиганшин О.Р., Летяева О.И. Влияние ультразвуковой кавитации на цитокиновый статус цервикального секрета пациенток с микоплазменной инфекцией урогенитального тракта / О.Р. Зиганшин, О.И. Летяева // Российский иммунологический журнал.– 2013.– Т. 7, № 2-3.– С. 27-29.
2. Летяева О.И., Долгушин И.И. Клинико-микробиологическое обоснование комплексной терапии воспалительных заболеваний урогенитального тракта негонококковой этиологии у женщин репродуктивного возраста / О.И. Летяева, И.И. Долгушин // Акушерство и гинекология.– 2013.– № 6.– С. 60-64.
3. Применение Полиоксидония в составе комплексной терапии воспалительных заболеваний урогенитального тракта / А.В. Караулов, Б.В. Пинегин, Н.М. Ильина и др. // Consiliummedicum. Женское здоровье.– 2009.– Т. 11, № 6.– С. 28-32.

THE EFFECTIVENESS OF IMMUNOCORRECTIVE THERAPY IN THE TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES OF THE UROGENITAL TRACT ASSOCIATED WITH ANAEROBIC – MYCOPLASMA INFECTION

Antimirova E.A., Prokopev D.S., Letyaeva O.I., Kovalev D.A., Dolnikova O.A.

South Ural state medical University, Chelyabinsk, Russia

An open, randomized, clinical and immunological, microbiological, research 108 reproductive age women with inflammatory diseases of the lower section of reproductive tract associated with anaerobic – mycoplasma infection. It is shown that the presence of the genital tract mixed infection accompanied by abuses of the system mucosal immunity, the change of the qualitative and quantitative composition of the resident microflora. Application of the integrated drug therapy polyoxidonium per vaginum contributes to a more rapid resolution of symptoms of inflammation, redress the imbalance in the local immune status.

Keywords: opportunistic microorganisms, reproductive tract, mucosal immunity, polyoxidonium.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ АКТИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ К АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЕ НА АЛКОГОЛЬНУЮ МОТИВАЦИЮ У КРЫС WISTAR

Павшинцев В. В.[1], Митькин Н. А.[2], Кушнир Е. А.[3], Ловать М. Л.[1]

[1]Биологический факультет МГУ им.М.В. Ломоносова; [2]Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; [3]ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», Москва, Россия

Использование иммунологических методов коррекции различных заболеваний в настоящее время становятся все более распространенным. Повышенная у больных алкоголизмом активность Алкогольдегидрогеназы (фермента, окисляющего этанол) также способствует окислению некоторых нейромедиаторов (например, дофамина и серотонина, к которому данный фермент имеет сродство), что приводит к стойким депрессивным состояниям и вносит вклад в формирование патологической тяги к приему этанола. Суть работы заключалась в активной иммунизация к алкогольдегидрогеназе хронически алкоголизированных крыс SPF категории. Впоследствии измерялся уровень потребления 15 % раствора этанола по методу свободного выбора с водой, а также влияние активной иммунизации на поведенческие и биохимические параметры.

Ключевые слова: биология алкоголизма, иммунизация, алкогольдегидрогеназа, АДГ.

Метод активной иммунизации к эндогенным белкам (инверсной иммунорегуляции) представляет большой интерес в связи с возможностью длительной и прицельной модуляции функций организма. В качестве успешного примера использования данной технологии можно привести иммунизацию к фактору некроза опухоли, показавшую эффективность и безопасность на всех этапах доклинических испытаний, а также на первом этапе клиники [1]. Все это позволяет говорить о перспективности технологии инверсной иммунорегуляции в целом.

В настоящей работе в качестве мишени для воздействия был выбран ключевой фермент метаболизма этанола – алкогольдегидрогеназа (АДГ). Известно, что АДГ принимает участие в метаболизме дофамина, норадреналина и серотонина [2, 3], а ассоциированный с хроническим алкоголизмом повышенный уровень АДГ (в том числе в сыворотке крови) [4] может сильно влиять на метаболизм данных нейрорегуляторов, тем самым поддерживая патологическую алкогольную мотивацию. В качестве антигена для введения использовалась лошадиная изоформа АДГ, имеющая высокую степень гомологии с крысиными изоформами. Способ введения: подкожно, троекратно, раз в неделю, в смеси с иммуномодулятором «Полиоксидний». Для эксперимента крысы стока WistarSPF категории хронически алкоголизировались 15 % этанолом на протяжении 6 месяцев по методу свободного выбора и на этапе иммунизации имели стойкую алкогольную мотивацию.

Активная иммунизация приводила к образованию высокого титра антител к АДГ в сыворотке животных, а также к значимому снижению потребления алкоголя (более чем на 30 %) в последующие две недели после введения веществ. При этом иммунизация не приводила к каким-либо выраженным негативным изменениям поведенческих параметров (тревожности, депрессивности, снижению двигательной активности), а также биохимического состава крови по сравнению с интактными животными. Более того, иммунизация алкоголизированных животных вызывала восстановление вызванных потреблением этанола поведенческих нарушений (тревожности и депрессивности) до уровня интактного контроля, что, предположительно, может быть связано с нормализацией обмена нейромедиаторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Therapeutic vaccination with TNF-kinoid in TNF antagonist-resistant rheumatoid arthritis: a phase II randomized, controlled clinical trial / P. Durez, P. Vandepapeliere, P. Miranda et al. // PloSone.– 2014.– V. 9. № 12.– e113465.
2. Meiser J., Weindl D., Hiller K. Complexity of dopamine metabolism / J. Meiser, D. Weindl, K. Hiller // Cell Commun Signal.– 2013.– V. 11. № 1.– P. 34.
3. Influence of reboxetine on salivary MHPG concentration and cognitive symptoms among patients with alcohol-related Korsakoff's syndrome / T. Reuster, J. Buechler, P. Winiecki et al. // Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.– 2003.– V. 28.– P. 974-978.
4. Kravos M., Malešič I., Levanič S. Serum alcohol dehydrogenase levels in patients with mental disorders / M. Kravos, I. Malešič, S. Levanič // Clinicachimicaacta.– 2005.– V. 361. № 1.– P. 86-94.

STUDY OFACTIVE IMMUNIZATION AGAINST ALCOHOL DEHYDROGENASE INFLUENCE ON ALCOHOLIC MOTIVATION IN WISTAR RATS

Pavshintsev V. V.[1], Mitkin N. A.[2], Kushnir E. A.[3], Lovat M. L.[1]

[1]M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology; [2]Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; [3]Mitoengineering Inst., MSU, Moscow, Russia

Correction of pathological conditions using immunological methods is an advancing approach of modern medicine. Increased alcohol dehydrogenase (ADH, ethanol oxidizing enzyme) activity in patients with alcohol addiction is also associated with oxidation of some types of neurotransmitters (such as dopamine and serotonin) which have affinity to ADH. This side effect of excessive ADH activity leadsto persistent depressive condition and formation of pathological ethanol craving. In this study we used active immunization against alcohol dehydrogenase in chronically alcoholized SPF rats to decrease the excess ADH activity. After immunization weestimated the level of 15 % ethanolconsumption (using two bottles method) and behavioral and biochemical parametersof experimental animals.

Keywords: biology of alcoholism, immunization, alcohol dehydrogenase, ADH.

РАЗРАБОТКА АДРЕСНОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОСТНЫХ ОНКОПАТОЛОГИЙ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА ЧЕЛОВЕКА

Гамалей С. Г., Батенева А. В., Лебедев Л. Р., Волосникова Е. А., Левагина Г. М., Даниленко Е. Д.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Бердск, Россия

На экспериментальной модели костных метастазов мышей показано, что ФНО-альфа в составе конъюгата или молекулярной конструкции с алендроновой кислотой быстро элиминировался из русла крови и более интенсивно накапливался в клетках метастатического узла по сравнению с исходным белком. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использованного подхода для разработки нового средства лечения костных метастазов.

Ключевые слова: ФНО-альфа, алендроновая кислота, костные метастазы, мыши.

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) продолжает привлекать интерес исследователей для создания противоопухолевых препаратов. Помимо противоопухолевого и иммуномодулирующего действия, ФНО-альфа принимает активное участие в регуляции процессов ремоделирования кости, обеспечивает поддержание баланса между активностью остеобластов и остеокластов [1], и, следовательно, представляет интерес с точки зрения его использования для лечения метастазов опухолей в костную систему. С этой целью важно решить вопрос доставки лекарственного вещества в патологический очаг кости. Потенциальными средствами направленной доставки терапевтических агентов в кость являются бифосфонаты, молекулы которых способны взаимодействовать с ионами кальция, обеспечивая их высокую аффинность к костной ткани [2].

Ранее нами были разработаны методы получения конъюгатов ФНО-альфа и аминобифосфоната алендроновой кислоты, а также конструкций, содержащих в центральной части двуспиральную рибонуклеиновую кислоту из дрожжей *Sac. cerevisiae*, а также ФНО-альфа и алендроновую кислоту – в составе полисахаридной оболочки [3, 4]. Показано, что ФНО-альфа в конъюгатах и конструкциях с бифосфонатом отличался более высоким сродством к гидроксиапатиту, аналогу минерального матрикса кости.

Целью данной работы являлось изучение накопления ФНО-альфа в составе конъюгата или конструкции в ткани метастатических узлов мышей в условиях экспериментальной модели костных метастазов.

Материалы и методы. Конъюгат ФНО-альфа и алендроновой кислоты (АЛН) был получен с использованием 1-этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимида (EDC) методом твердофазного синтеза на гидроксилапатите [3] и имел следующие количественные характеристики: содержание белка 0,76 мг/мл, алендроновой кислоты – 14,9 мкг/мл, специфическая активность – $2{,}0\times10^8$ МЕ/мг. Конструкцию, содержащую ФНО-альфа и АЛН, получали в соответствии с описанным в [4]. Содержание белка в конструкции составляло 2,33 мг/мл, алендроновой кислоты – 800 мкг/мл, специфическая активность была равна $0{,}83\times10^7$ МЕ/мг.

Костные метастазы моделировали у мышей линии DBA/2 перевивкой в хвостовую вену клеток лимфоцитарного лейкоза L1210/1 в дозе 30 клеток/мышь. Препараты конъюгата или конструкции вводили на 13 сутки после инокуляции опухолевых клеток однократно внутривенно в дозе 6 мкг/кг по белку в объеме 0,5 мл. В качестве препарата сравнения использовали субстанцию ФНО-альфа. Контролем служили мыши с опухолью без введения препаратов. Через 1, 4 или 24 ч после введения препаратов у мышей забирали кровь и теменные кости черепа (область локализации метастазов) и определяли содержание ФНО-альфа в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов теменных костей иммуноферментным методом.

Результаты исследования. Исследование показало, что концентрация ФНО-альфа в области метастатического узла у мышей, получавших конъюгат ФНО-альфа с АЛН, через час после введения в 4,2 раза превышала показатель контроля (5512 ± 1180 и 1324 ± 152 пг/г, соответственно). Через сутки после введения конъюгата содержание ФНО-альфа в опухоли снижалось, однако и в этот период было в 2 раза выше показателя контроля. Следует отметить, что введение препарата сравнения ФНО-альфа не приводило к значимому увеличению его содержания в ткани опухоли ни в один из сроков наблюдения.

Динамика изменения содержания ФНО-альфа в сыворотке крови мышей опытной группы мало отличалась от динамики показателя в группе сравнения. Повышение концентрации цитокина в обоих случаях наблюдали через час после введения препаратов (до 31,8 ± 17,2 и 31,8 ± 8,6 пг/мл, соответственно), через сутки значения показателя в этих группах, также как в контроле, не отличались от нуля.

Аналогичные результаты были получены при исследовании динамики изменения ФНО-альфа в крови и ткани опухоли после введения ФНО-альфа в составе конструкции с алендроновой кислотой. Через 4 часа после введения в группе мышей, получивших инъекцию препарата молекулярной конструкции, наблюдали повышение содержания ФНО-альфа в ткани опухоли, значительно (в 2,5 раза) превышавшее его уровень в контрольной группе (11,3 ± 1,2 и 4,70 ± 0,47 нг/г, соответственно). Содержание ФНО-альфа в гомогенатах опухолевой ткани животных, которым вводили препарат сравнения, в этот период не отличалось от показателя контроля. Повышенный по сравнению с контролем уровень ФНО-альфа

в крови через 4 часа после введения был обнаружен лишь в группе мышей, которой вводили конструкцию и только у одного животного из пяти, что может свидетельствовать о быстрой элиминации ФНО-альфа из русла крови мышей.

Полученные данные свидетельствуют о более выраженной способности ФНО-альфа в составе конъюгата либо конструкции с алендроновой кислотой накапливаться в тканях метастатического узла теменных костей мышей, по сравнению с исходным белком. Уровень цитокина в костных метастазах животных, которым вводили препараты конъюгата или конструкции, существенно превышал их содержание в крови. Эти данные позволяют говорить о перспективности использованного подхода для дальнейшей разработки на основе рекомбинантного фактора некроза опухоли альфа и алендроновой кислоты лекарственного средства лечения костных метастазов опухолей.

Статья подготовлена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», тема «Разработка адресного терапевтического средства для лечения костных метастазов опухолей на основе бифосфонатов и белков-цитокинов» (соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0061 от 27.06.2014 г.). Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0061.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1α,25-Dihydroxyvitamin D3-26,23-lactam analogues function as vitamin D receptor antagonists in human and rodent cells / S. Ishizuka, N. Kurihara, Y. Hiruma et al. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol.– 2008.– V.110.– P. 269-277.
2. Zoledronic acid: an unending tale for an antiresorptive agent / M. Caraglia, M. Marra, S. Naviglio et al. // Expert. Opin. Pharmacother.– 2010.– V. 11, N.1.– P. 141-154.
3. Противоопухолевое средство / А.И. Закабунин, Е.Д. Даниленко, Е.А. Волосникова и др.– Заявка № 2015133400 от 10.08.2015.
4. Противоопухолевое средство на основе фактора некроза опухоли с тропностью к костной ткани / Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Телегина Ю.В. и др. // Биомед. химия.– 2015.– Т. 61, вып.5.– С. 652-656.

THE DEVELOPMENT OF TARGETED DRUG BASED ON RECOMBINANT HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA FOR TREATMENT OF BONE CANCER

Gamaley S.G., Bateneva A.V., Lebedev L.R., Volosnikova E.A., Levagina G.M., Danilenko E.D.

Institute of Medical Biotechnology, FBRI SRC VB «Vector», Berdsk, Russia

In an experimental mouse model of bone metastases it has been shown that TNF-alpha as part of conjugate or molecular construction with alendronic acid was rapidly eliminated from the blood stream and accumulated more intensely in the cells of metastases as compared to the initial protein. The data suggest the prospects of this approach for developing a new drug for bone metastasis treatment.

Keywords: TNF-alpha, alendronate, bone metastases, mice.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНТЕРФЕРОНО- И ИММУНОТЕРАПИИ У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕВОЧЕК С НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ХРОНИЧЕСКИМИ РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ ВУЛЬВОВАГИНИТАМИ

Ковалева С. В.[1], Нестерова И. В.[2], Асланян И. Э.[1], Тулендинова А. И.[1]

[1]ГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ, Москва;
[2]ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия

Неспецифические хронические вульвовагиниты – критерий иммунокомпро-метированности, особенно у девочек раннего возраста. Выявлены особенности иммунопатогенеза данной патологии. Разработана программа интерфероно- и иммунотерапии, продемонстрировавшая позитивную клиническую эффективность: уменьшилась выраженность и длительность обострения хронического вульвовагинита, их частота на фоне значительного сокращения заболеваемости ОРВИ.

Ключевые слова: иммунокомпрометированные дети, иммунотерапия, вульвовагинит.

Актуальность охраны репродуктивного здоровья детей и подростков не вызывает сомнений. Первое место в структуре гинекологических заболеваний девочек занимают хронические вульвовагиниты (ХВ), их максимальная доля приходится на возраст 2-7 лет. В этот период иммунная система (ИС) ребенка уязвима, т.к. находится в стадии функционального становления. Под влиянием повторных ОРВИ, дисбиотических нарушений слизистых, хронической соматической и эндокринной патологии могут возникнуть срывы и развиваться дисбаланс в работе ИС – дебют состояния иммунокопрометированности (ИК) [1, 2, 3]. Одним из клинических проявлений ИК является ХВ, характерными особенностями которого являются: непрерывное течение воспалительного процесса с короткими периодами ремиссии, резистентность, либо непродолжительное улучшение на фоне традиционной терапии. ХВ способствуют формированию синехий, рубцовых изменений во влагалище, присоединению аллергического компонента и, как следствие, нарушению репродуктивных функций [2]. В этой связи представляет интерес уточнение особенностей иммунопатогенеза ХВ у девочек и разработка новых рациональных методов иммунотерапии. Ранее нами были описаны критерии ИК и показана хорошая клинико-иммунологическая эффективность, программы комбинированной интерфероно- и иммунотерапии у ИК детей с повторными ОРВИ [1,3].

Цель: оценить особенности функционирования ИС у иммунокомпрометированных девочек с рецидивирующим неспецифическим хроническим вульвовагинитом, и, на этой основе, разработать программу эффективной комбинированной интерфероно- и иммунотерапии.

Материалы и методы. Обследовано 25 девочек от 2 до 4 лет с рецидивирующим неспецифическим ХВ в стадии обострения. Из них 10 девочек имели клинико-иммунологические признаки иммунной недостаточности, сопровождающейся ОРВИ (более 8 раз в год) и частыми обострениями ХВ, которым разработана и проведена программа иммунотерапии. Контрольную группу составили 12 условно-здоровых девочек 2-4 лет. Проводилось исследование Т-, В-лимфоцитов, естественных киллерных клеток (ЕКК), фагоцитарной (%ФАН, ФЧ, ФИ,%П, ИП) и микробицидной (NBT-тест) функции нейтрофильных гранулоцитов (НГ), уровня сывороточных IgA, IgM, IgG, IgE (ИФА).

Результаты. Выявлено достоверное снижение абсолютного содержания $CD3^+CD8^+$(Тц), $CD3^-CD16^+CD56^+$(ЕКК) у девочек с ХВ, что свидетельствует о несостоятельности иммунной защиты от патогенов с клиническими проявлениями в виде частой заболеваемости респираторными инфекциями и атопией. На фоне достоверного уменьшения абсолютных значений $CD3^-CD19^+$- (Вл) установлено снижение в 2 раза уровня IgA и IgG ($p<0,05$) и в 1,5 раза IgM ($p<0,05$) в крови. Снижение IgA, IgM, IgG может быть связано с переключением на синтез IgE, и проявлениями атопического дерматита (АД), атопического вульвовагинита. Уменьшение IgA способствует проницаемости слизистых оболочек для аллергенов, антигенемии, повышению титра реагиновых антител (IgE, IgG4). Отмечено, что у 63 % девочек ХВ протекал в сочетании с АД. При этом, показатели общего IgE в 63 % случаев не отличались, а в 37 % случаев значительно превышали контрольные значения: 112,51±28,6 МЕ/мл против 26,83±5,47 МЕ/мл ($p<0,05$). Дефицит IgA, IgG, IgM способствует поддержанию воспалительного процесса и создает предпосылки для обострения ХВ с короткими межрецидивными периодами, яркими или стертыми клиническими проявлениями. При этом реализуются IgE-зависимые или IgE-независимые механизмы формирования атопии ввиду чрезмерной нагрузки инфекционными и неинфекционными антигенами. При исследовании фагоцитарной функции НГ у девочек с ХВ отмечалось снижение в 1,4 раза %ФАН ($p<0,05$),%П и ИП не отличались от контроля ($p>0,05$). Активность NADPH-оксидаз в спонтанном NBT-тесте, повышалась (в 3,9 раз) – адекватное реагирование НГ в ответ на развитие воспалительного процесса. Дополнительная нагрузка *St.aureus* выявила истощение резервных возможностей НГ у исследуемой группы, проявляющееся отсутствием ответа NADPH-оксидаз ($p>0,05$). Дефектное функционирование первой аварийной линии защиты – системы НГ, не способствует купированию воспалительного процесса и может приводить к рецидивированию ХВ, что следует учитывать при диагностике и лечении девочек с данной патологией. Таким образом, у девочек с ХВ установлены дефицит Тц, Вл, ЕКК, сывороточных IgA, IgM, IgG, дефекты фагоцитарной активности НГ, проявляющиеся депрессией поглотительной способности и напряженностью микробицидного кислородзависимого потенциала. Учитывая выявленные дефекты ИС у иммунокомпрометированных девочек с ХВ, нами разработана программа комбинированной иммунотерапии продолжительностью 2,5 месяца с использованием локальной (мазь/гель) и системной (суппозитории) терапии интерфероном a2b в комбинации с антиоксидантами (виферон) и иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида (ликопид). В результате проведенного лечения получен позитивный клинический эффект, заключающийся как в уменьшении остроты процесса, продолжительности обострений, в среднем на 3-5 дней, так и сокращении частоты обострений ХВ на фоне значительного уменьшения заболеваемости ОРВИ.

Выводы.

1. Выявленые особенности иммунопатогенеза хронического неспецифического вульвовагинита у девочек: дефицит цитотоксических Т лимфоцитов, Вл, ЕКК, дефекты системы НГ, дефицит IgA, IgM, IgG – обуславливают упорное рецидивирование и резистентность к традиционной терапии.

2. Использование разработанной программы интерферono- и иммунотерапии, с включением виферона и ликопида, позволило получить хороший протективный и позитивный клинический эффект у иммунокомпрометированных девочек с хроническим неспецифическим, упорно-рецидивирующим вульвовагинитом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ клинической эффективности интерферонотерапии у детей с повторными респираторными инфекциями / И. В. Нестерова, С. В. Ковалёва, Е. И. Клещенко и др. // Педиатрия. – 2014. – Т. 93. – № 2. – С. 62-67.
2. Уварова Е. В., Батырова З. К. Физиология и патология наружных половых органов у девочек в периоде детства / Е. В. Уварова, З. К. Батырова // Репродуктивное здоровье детей и подростков. – 2012. – № 4. – С. 35-50.
3. Оптимизация тактики интерферono- и иммунотерапии в реабилитации иммунокомпрометированных детей с повторными респираторными и герпетическими вирусными инфекциями / И. В. Нестерова, С. В. Ковалева, Г. А. Чудилова и др. // Педиатрия. – 2014. – Т. 93, № 3. – С. 66-72

CLINICAL EFFICACY OF IMMUNOTHERAPY IN IMMUNOCOMPROMISED CHILDREN WITH CHRONIC VULVOVAGINITIS

Kovaleva S.V.[1], Nesterova I.V.[2], Aslanian I.E.[1], Tulendinova A.I.[1]

[1]SBEI HPE Kuban State Medical University of Health Ministry of Russia, Krasnodar;
[2]SBEI HPE Russian University of Peoples Friendship of Ministry of education and science of Russian Federation, Moscow, Russia.

Non-specific chronic vulvovaginitis are clinical indicators of the immune deficiency, especially in young girls. Dysfunctions of various parts of the immune system were detected in this disease. The program of interferon and immunotherapy was created. This program of interferon and immunotherapy allowed to reduce the severity and duration of acute exacerbations of chronic vulvovaginitis, their frequency on the background of a significant reduction in the incidence of ARI.

Keywords: immunocompromised children, immunotherapy, vulvovaginitis.

ОЗОНОТЕРАПИЯ В ЛЕЧЕНИИ ПРИСТУПОВ МИГРЕНИ

Цигулева О.А., Восканян Л.Р.

ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

Озонотерапия мигрени проводилась в виде внутривенных капельных инфузий; курс лечения состоял из 10 процедур. Озонотерапия в составе комплексной терапии применялась в основной группе (68 человек). 20 больных с мигренью составили контрольную группу. Оценка результатов осуществлялась по шкалам интенсивности головной боли и выраженности тревоги, а также по показателям допплерометрии и иммунограммы. Опыт применения инфузий озона во время мигренозного пароксизма свидетельствовал о четкой связи между временем с момента возникновения головной боли до начала процедуры озонотерапии и ее эффективностью. Также озонотерапия способствовала улучшению показателей имуннограммы. Выявлено снижение воспалительных цитокинов (ИЛ-2 и ИЛ-6) и рост противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10) у 80 % больных основной группы.

Ключевые слова: мигрень, озонотерапия, цитокины, иммунологические сдвиги, допплерометрия.

Существующие патофизиологические концепции мигрени свидетельствуют о том, что в ее патогенезе большую роль играет мембранный фактор [4]. Речь идет о нарушении функционирования клеточных мембран, определяющем развитие соответствующих биохимических и нейрофизиологических и иммунных сдвигов [1,2]. Основным фактором дестабилизации клеточных мембран является активация свободнорадикальных реакций в рамках развития оксидативного стресса [3].

Целью нашей работы являлось изучение перекисного окисления липидов (ПОЛ) и иммунных реакций, а также чувствительность нейрорецепторов, определяющих адекватный характер нейротрансмиссии. Особое внимание было обращено на изучение влияния озонотерапии на частоту и протяженность головной боли, длительность периода ремиссии.

Нами оценены 68 пациентов (первая группа), у большинства из которых (64 %) имелась мигрень без ауры и у 36 % – с аурой. В структуре ауры доминировали зрительные нарушения и парестезии. Средний возраст больных составил 29,3 года. Среди пациентов преобладали женщины (71 %). Частота мигренозных атак варьировала от 5-6 в год до 2-3 в неделю. Оценивались клиниченские параметры,

клинико-биохимические анализы, результаты допплерометрии, иммунограммы.

Во всех случаях были выявлены признаки генерализованных вегетативных нарушений, свидетельствовавшие о дисфункции надсегментарных отделов вегетативной нервной системы. Чаще других встречались вазомоторные (59 %) и секреторные (41 %) нарушения; проявления расстройства терморегуляции имелись у 52 % больных, гипервентиляционный и кардиалгический синдромы – соответственно у 26 и 22 %.

Иммунологические сдвиги в виде высокой активности провоспалительных цитокинов: ИЛ-2, ИЛ-6 определены у 73 %. Различные дисфункциональные изменения Т- и В-клеточного иммунитета – у 52 %.

Контрольную (вторую) группу составили 20 пациентов с мигренью, имеющие аналогичные нейро-биохимические и иммунологические сдвиги.

Пациенты контрольной группы получали только базовую терапию: танакан, нифедипин, эрготамин.

В первой группе, кроме базисной, использовалась озонотерапия. Применялась методика внутривенных капельных инфузий физиологического раствора, обработанного в течение 20 мин озонокислородной смесью, с концентрацией озона 1200 мкг/л. Курс состоял из 10 процедур.

Имеющиеся в литературе данные [5] свидетельствуют о том, что низкие концентрации озона повышают функциональную активность мембран и интенсивность трансмембранного транспорта. Возможно, снижение активности оксидативного стресса благоприятно отражается на цитокиновом профиле, оценивая уровень ИЛ-2 и ИЛ-6 мы нашли их нормализацию и увеличение уровня ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 у 80 % больных.

Интенсивность головной боли оценивали по данным визуальной аналоговой шкалы, реактивную и личностную тревожность – с помощью теста Спилбергера – Ханина. Молекулярные продукты ПОЛ в крови определяли спектрофотометрическим методом. Также проводилась контрольная транскраниальная ультразвуковая допплерография.

Установлено, что применение внутривенных капельных инфузий озона в повышает эффективность терапии мигрени на 37 %. В основной группе положительная динамика частоты, выраженности и характера цефалгий к концу курса лечения наблюдалась у 87 % больных, в контрольной группе – у 50 %, то есть в первой была выше на 37 % ($p<0,05$). Инфузии озонированного физиологического раствора, проводившиеся в межприступном периоде, обеспечили у 58 % обследованных отсутствие мигренозных пароксизмов на протяжении 3-5 мес. Среди пациентов контрольной группы 93 % отмечали возобновление приступов головной боли уже через 1-1,5 месяца.

Опыт применения инфузий озона во время мигренозного пароксизма свидетельствует о четкой связи между временем с момента возникновения головной боли до начала процедуры озонотерапии и ее эффективностью. Чем раньше пациентам вводился указанный раствор, тем менее интенсивной в последующем была головная боль. В контрольной группе также наблюдалась тенденция к уменьшению головной боли, однако, согласно данным визуальной аналоговой шкалы, она не достигала степени достоверности. У этих пациентов для облегчения состояния в 2 раза чаще приходилось менять базовые противомигренозные препараты.

По данным транскраниальной ультразвуковой допплерографии, линейная скорость кровотока существенно различалась при мигрени с аурой и мигрени без ауры. Эти различия достигали степени достоверности в бассейнах средней (соответственно 105,6; 5,1 и 84,3; 4,4 м/с; $p<0,05$) и передней (78,4; 3,5 и 60,3; 2,7 м/с; $p<0,05$) мозговых артерий.

При мигрени без ауры в основной и контрольной группах на фоне терапии наблюдалась тенденция к повышению линейной скорости кровотока. При этом, в контрольной группе отмечался ее значительный прирост (на 21 %; $p<0,05$), что само по себе указывало на возросшую вероятность развития очередного приступа мигрени, то у пациентов, прошедших курс озонотерапии, отмечались более мягкий тонический эффект и повышение устойчивости сосудистого тонуса, независимо от давности последнего приступа мигрени. При мигрени с аурой инфузии озона приводили к некоторому снижению скорости кровотока (на 9 %; $p>0,05$), тогда как в контрольной группе сохранялась тенденция к усилению церебральной вазоконстрикции на фоне сглаживания межполушарной асимметрии кровотока.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют об оптимизации взаимоотношений между суммарной активностью ферментных и неферментных антиоксидантных систем на фоне озонотерапии, с переходом свободнорадикальных реакций на качественно новый, более безопасный уровень. Мембраностабилизирующее действие озонированного физиологического раствора эффективно дополняется его положительным влиянием на механизмы вегетативной регуляции сосудистого тонуса. Озонотерапия также способствует нормализации показателей иммунной системы: выявлено снижение уровнявоспалительных цитокинов (ИЛ-2 и ИЛ-6) и рост противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10) у 80 % больных основной группы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейн А. М., Колосова О. А. Мигрень. / А. М. Вейн, О. А. Колосова. – М: Медицина, 1997.
2. Вейн А. М., Авруцкий М. Я. Боль и обезболивание. / А. М. Вейн, М. Я. Авруцкий. – М: Медицина, 1997.
3. Ерин А. Н., Гуляева Н. В., Никушин Е. В. Свободнорадикальные механизмы в церебральных патологиях. / А. Н. Ерин, Н. В. Гуляева, Е. В. Никушин // Бюл. экспер. биол. – 1997. – V. 10, № 118. – P. 343-348.
4. Blau J. N. Migraine, clinical, therapeutic, conceptual and research aspects. / J. N. Blau. – Charman and Hall. London, 1997. – 76 p.
5. Bocci V. Ozone as bioregulator / V. Bocci // Pharmacology and toxicology of ozonetherapy today. J Biol Regul Homeostat Agents. – 1997. – V.10 (2/3). – P. 22-31.

OZONE THERAPY IN THE TREATMENT OF MIGRAIN ATTACKS

Tsiguleva O. A., Voskanyan L. R.

Altai State Medical University, Barnaul, Russia

Ozone therapy of migraine was carried out in the form of intravenous drip infusions of ozonated saline solution with ozone; treatment consisted of 10 sessions. Ozone therapy in the complex therapy of migraine was used in the study group (68 people). 20 people in the control group. Evaluation was carried out on the scale of the intensity of the headache and the severity of the alarm, as well as in terms of Doppler and immunogram. Experience with infusion of ozone during migraine paroxysm testified to the clear links between the time since the emergence of headache prior to the procedure, ozone therapy and its effectiveness. Also, ozone therapy has helped to improve imunnogorammy indicators. Showed a reduction of inflammatory cytokines (IL-2 and IL-6) and anti-growth (IL-4, IL-5, IL-10) in 80 % of patients of the main group.

Keywords: migraine, ozone therapy, cytokines, immunological changes, doppler

ПРОБЛЕМА ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Кормщикова Е. С.[1], Росина Е. В.[1], Парамонов И. В.[1], Рылов А. В.[1], Кудашева Э. Ю.[2]

[1]ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России», Киров; [2]ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия

В статье рассмотрены проблемы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина против клещевого энцефалита. Дана характеристика методов определения специфических IgG в реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментном анализе. Установлена целесообразность разработки стандартного образца содержания антител к вирусу клещевого энцефалита для оценки специфической активности иммунной плазмы и выпускаемых в стране препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, специфическая активность, препараты иммуноглобулинов человека против клещевого энцефалита, иммунная плазма, реакция торможения гемагглютинации, иммуноферментный анализ, стандартный образец, валидация аналитических методик.

Вирусный клещевой энцефалит (КЭ) – природно-очаговая инфекция, эпидемиологическая значимость которой на территории РФ определяется высоким удельным весом инвалидизации и летальностью. Доказано, что наиболее эффективный способ защиты от данной инфекции – иммунизация вакциной КЭ. Вместе с тем, в РФ в условиях низкого уровня охвата населения вакцинацией основным средством экстренной профилактики и этиотропного лечения является иммуноглобулин (ИГ) человека против КЭ.

Протективное действие препарата обусловлено биологической активностью антител – иммуноглобулинов класса G (IgG) к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ). При введении пациенту специфических IgG образуются стойкие иммунные комплексы, нейтрализующие вирус, при этом не исключается запуск остальных механизмов противовирусного иммунитета: опсонофагоцитарных реакций в результате взаимодействия с Fc- и C3b-рецепторами на поверхности фагоцитирующих клеток, активации клеток-киллеров [1].

Государственный реестр лекарственных средств Министерства здравоохранения РФ включает 12 препаратов ИГ человека против КЭ, выпускаемых филиалами ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ и учреждениями Службы крови России. Сырьем для их производства является плазма крови здоровых доноров, иммунизированных вакцинами преимущественно отечественного производства ГУП ИПВЭ им. М. П. Чумакова РАМН и филиалом ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Томск.

Специфическая активность (СА) ИГ человека против КЭ – важный индикатор его биологических свойств, который позволяет прогнозировать протективный эффект при терапевтическом использовании. Несомненно, наиболее информативно СА характеризует количественное содержание IgG к ВКЭ в единице объема, выраженное в Международных единицах. Следует отметить, что методы оценки СА биологических препаратов при условии использования соответствующих стандартных образцов (СО), откалиброванных по отношению к Международным СО (при наличии последних), не регламентированы. Вместе с тем, разработанные и аттестованные с использованием СО аналитические методы позволяют выполнять задачи стандартизации,

единообразия обозначения результатов, оценки стабильности проведения лабораторных исследований, воспроизведения и передачи размеров величин, характеризующих иммунобиологические свойства вещества [2].

Оценку СА препаратов ИГ против КЭ и при скрининге сырья отечественные производители традиционно осуществляют иммунологическим методом в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием набора реагентов «Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ».

Полученные результаты интерпретируют в титрах и устанавливают требования – не менее 1:10 для котловой загрузки и не менее 1:80 для готовых препаратов специфических иммуноглобулинов.

Определение антител в РТГА – достаточно трудоемкий процесс. Длительность постановки составляет 1,5 рабочих дня, в реакции используется весьма лабильный биологический материал – свежие эритроциты гуся. Образцы перед анализом подвергаются многоэтапной пробоподготовке. Значительна ошибка метода (± шаг двукратного титрования), результаты дискретны, высока доля субъективности в визуальной оценке аналитического сигнала.

Альтернативой РТГА является другой иммунологический метод – иммуноферментный анализ (ИФА), который широко используется при оценке эффективности проводимой вакцинации против КЭ и является одним из лабораторных способов верификации развития инфекции. Метод нетрудоемкий, сигнал реакции детектируется соответствующим оборудованием и обрабатывается автоматически, результаты линейны в аналитическом диапазоне, а время их получения не превышает 3,5 часа.

В настоящее время применение указанных методов в оценке СА исходного сырья и препаратов ИГ человека против КЭ имеет ряд важных недостатков: отсутствует стандартизация методов, так как использование СО не предусмотрено; результат определения выражается либо в титре РТГА – максимальном разведении образца, в котором визуально детектируется блокирующее действие IgG в отношении диагностикума КЭ, либо в единицах ИФА, при этом каждый производитель тест-систем использует свой эквивалент измерения и систему оценки результата.

Кроме того, для применения ИФА при определении СА сырья и препаратов ИГ требуется проведение испытаний пригодности метода в соответствии с ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», изложенной в ГФ РФ XIII издания. Однако, оценка правильности, внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности не представляется возможной без использования СО содержания антител к ВКЭ, который в настоящее время отсутствует в РФ и в перечне международных стандартных образцов для проведения экспертизы качества препаратов крови ВОЗ (NIBSC) и стандартов ЕФ (BRP). Метрологическая характеристика такого образца в вируснейтрализующих единицах позволит разработать информативную систему оценки СА, унифицировать результаты определения IgG к ВКЭ, полученные с применением различных коммерческих наборов реагентов.

Таким образом, оценку специфической активности препаратов ИГ человека против КЭ возможно проводить с использованием доступных иммунологических методов РТГА и ИФА. Требуется разработка СО содержания антител к ВКЭ и аттестация его специфической активности указанными методами, что позволит решить проблему стандартизации методов оценки специфической активности препаратов ИГ человека против КЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Отечественный препарат иммуноглобулина человека для экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита / Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов, М. С. Воробьева и др. // Иммунология. – 2015. – № 6 (36). – С. 353-357.
2. Стандартные образцы как средство метрологического обеспечения аналитических методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) / И. В. Борисевич, В. Г. Петухов, Р. А. Волкова и др. // Научно-практический журнал «Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение». – 2010. – № 4(40). – С. 8-10.

PROBLEM OF ASSESSING SPECIFIC ACTIVITY OF HUMAN TICK-BORNE ENCEPHALITIS IMMUNOGLOBULIN

Kormshchikova E. S.[1], Rosina E. V.[1], Paramonov I. V.[1], Rylov A. V.[1], Kudasheva E. Yu.[2]

[1]Federal State Institution of Science «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency», Kirov; [2]Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The article describes the problem of assessing specific activity of human tick-borne encephalitis immunoglobulin. IgG antibody levels determined by hemagglutination inhibition (HI) and enzyme immunoassay (ELISA). Preparation and establishment standard sample of anti-tick borne encephalitis Immunoglobulin for characterization specific activity, validation is necessary. This standard will be using in screening of immune plasma and quality control of tick-borne encephalitis immunoglobulin.

Keywords: tick-borne encephalitis, specific activity, human tick-borne encephalitis immunoglobulin, immune plasma, hemagglutination inhibition, enzyme immunoassay, standard sample, validation of analytical method.

РАЗРАБОТКА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Fc-ФУНКЦИИ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Росина Е. В.[1], Кормщикова Е. С.[1], Парамонов И. В.[1], Рылов А. В.[1], Кудашева Э. Ю.[2]

[1]ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России», Киров; [2]ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия

В статье рассмотрен вопрос оценки Fc-функции отечественных иммуноглобулинов человека. Предложена методика определения эффекторных функций антител, основанная на реакции связывания комплемента комплексами антиген-антитело.

Ключевые слова: иммуноглобулины человека, Fc-функция.

Одним из методов оценки функциональной активности препаратов иммуноглобулинов человека, является изучение их Fc- функции, которая определяется уровнем сохранности активности Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулина (ИГ). Ведь именно обеспечение сохранности активности этого фрагмента белка в процессе промышленного выделения фракции иммуноглобулина из плазмы крови человека обуславливает неспецифические эффекторные функции основного активного компонента препаратов ИГ (IgG) – нейтрализацию антителами патогенных свойств антигена самим фактом связывания в комплекс, элиминацию и деструкцию комплексов антиген-антитело фагоцитами и др. [1].

В соответствии с международными регуляторными документами изучение сохранности активности Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулина (ИГ) рекомендовано на этапах фармацевтической разработки препаратов ИГ и при обосновании условий и сроков их хранения [2].

Методика определения Fc-функции препаратов ИГ человека регламентированна Европейской Фармакопей и основана на реакции связывания комплемента с использованием

антигена краснухи [3]. Она трудоемка, предусматривает использование барбиталового буферного раствора, танированных эритроцитов человека и антигена краснухи (инактивированного) с установленным содержанием гемагглютининов. Отсутствие в нашей стране антигена краснухи с содержанием более 256 гемагглютинирующих единиц обуславливает трудности в проведении исследований отечественными производителями, т.к. реагент импортного производства имеет ограниченный срок годности, высокую стоимость и длительный период поставки. Следовательно, разработка отечественной методики определения Fc-функции препаратов ИГ с использованием доступных коммерческих реактивов и реагентов является на сегодняшний день актуальной задачей.

В лаборатории препаратов крови ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России» осуществляется разработка методики определения Fc-функции препаратов ИГ человека с использованием альтернативного антигена.

Основа разрабатываемой методики – классическая иммунологическая реакция связывания комплемента (образование комплекса антиген-антитело с последующей фиксацией комплемента). Индикатором реакции служит гемолитическая система, состоящая из суспензии эритроцитов барана, сенсибилизированных специфическими антителами кролика (гемолитической сывороткой). Экспериментально обоснован выбор оптимальных концентраций компонентов, обеспечивающих требуемый уровень гемолиза суспензии эритроцитов барана в ходе реакции. В качестве антигена предложено использование доступных вакцин отечественного производства – против вирусов кори и краснухи.

Методика предусматривает приготовление проб исследуемого препарата с различным содержанием белка, к которым добавляется раствор антигена (вакцины). Параллельно ставятся контрольные пробы, в которых антиген заменен адекватным объемом физиологического раствора натрия хлорида 0,9 %.

Комплемент, добавленный в пробы, фиксируется антителами, находящимися в комплексе с антигеном. Свободный комплемент определяется внесением индикатора – гемолитической системы. Гемолиз эритроцитов свидетельствует о наличии в пробе свободного комплемента, а его отсутствие или торможение – об образовании комплексов антиген-антитело-комплемент. Оценку Fc-функции исследуемого препарата ИГ проводят по разности степеней гемолиза проб контрольной и содержащей антиген при одинаковом содержании белка.

Таким образом, разрабатываемая методика определения Fc-функции препаратов ИГ человека научно обоснована, информативна и может быть рекомендована для апробации отечественным производителям при оценке функциональной активности препаратов ИГ человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Препараты, полученные из крови человека и животных, в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности / М. В. Супотницкий, А. А. Елапов, И. В. Борисевич и др. // Биопрепараты. – 2015. – № 3 (55). – С. 33-48.
2. Human normal immunoglobulin for intravenous administration 01/2012:0918 [Электронный ресурс]. URL: http://online6.edqm.eu/ep805/# (датаобращения: 30.03.2016).
3. Test for Fc-function of immunoglobulin 07/2009: 20709 [Электронныйресурс]. URL: http://online6.edqm.eu/ep805/# (дата обращения: 30.03.2016).

THE DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF FC-FUNCTION HUMAN IMMUNOGLOBULIN SOLUTION

Rosina E. V.[1], Kormshchikova E. S.[1], Rylov A. V.[1], Paramonov I. V.[1], Kudasheva E. Yu.[2],

[1]Federal State Institut «Kirov scientific research institute of hematology and blood transfusion Federal medical-biological agency », Kirov; [2]Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The questions of determining the Fc-function human immunoglobulin solution were considered in the article. We suggested the method of determining the antibody effector functions, based on the fixation of complement by complexes "antigen-antibody".

Keywords: Human immunoglobulin, Fc-function.

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ И АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ

Осиков М. В., Симонян Е. В., Саедгалина О. Т.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

Исследование выполнено на 90 белых нелинейных половозрелых крысах. Термическую травму (ТТ) IIIA степени и площадью 4 % моделировалипутем погружения участка кожи в воду с температурой 98-99°С. Эритропоэтин (ЭПО) вводили внутрибрюшинно в дозе 500 МЕ/кг ежедневно. Исследования проводили на 5, 8 сутки ТТ. Установлено, что при ТТ на 5 и 8 сутки наблюдается снижение в крови количества $CD3^+$ и $CD45RA^+$ лимфоцитов, увеличивается количество клеток с признаками апоптоза и некроза. Применение ЭПО при ТТ приводит к увеличению количества $CD3^+$ и $CD45RA^+$ лимфоцитов на 5 и 8 сутки, снижению количества клеток с ранними признаками, поздними признаками апоптоза и признаками некроза.

Ключевые слова: термическая травма, лимфоциты, апоптоз, эритропоэтин.

Термическая травма (ТТ) занимает внушительное место среди ожоговых поражений. Некоторые патогенетические механизмы, лежащие в ее основе, приводят к развитию вторичного иммунодефицита, инфекционных осложнений, сепсиса, полиорганной недостаточности и высокой смертности [5]. Одним из таких механизмов является гибель иммунокомпетентных клеток, в частности лимфоцитов, в периферической крови путем некроза и/или апоптоза. В связи с этим, обязательным компонентом консервативной терапии ТТ является применение иммуномодулирующих препаратов. Ранее нами продемонстрированы плейотропные, в том числе иммунотропные, эффекты эритропоэтина (ЭПО) в клинических и в экспериментальных условиях при различной патологии [1, 2, 3].

Цель работы. Исследовать влияние ЭПО на количественный состав и апоптоз лимфоцитов в периферической крови в динамике экспериментальной ТТ.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 90 белых нелинейных половозрелых крысах массой 250±20 г. при строгом соблюдении требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных. Все животные случайным образом разделены на 3 группы: 1 – интактные (n=10), 2 – с ТТ (n=40), 3 – с ТТ, которым внутрибрюшинно вводили ЭПО (n=40). ТТ IIIA степени и площадью 4 % моделировали путем погружения участка межлопаточной области крысы в очищенную воду 98-99°С на 12 с. Глубину ожога оценивали морфологическими методами. ЭПО («Эпостим», МНН: эпоэтин бета, ООО «Фармапарк», Россия) вводили в дозе 500 МЕ/кг ежедневно. Исследования проводили на 5 и 8 сутки На проточном цитофлуориметре «Navios» («BeckmanCoulter», США) в периферической крови с использованием специфических крысиных моноклональных антител производителя «ELISAKit» (Китай) определяли $CD3^+$ (преимущественно Т-лимфоциты) и $CD45RA^+$ (преимущественно В-лимфоциты) и маркеры гибели лимфоцитов при окрашивании клеток аннексином V и 7-аминоактиномицином D. Дифференцировали интактные клетки (Annexin-5-$FITC^-$/7-AAD^-), клетки с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-$FITC^+$/7-AAD^-), клетки с поздними признаками апоптоза, признаками некроза (Annexin-5-$FITC^+$/7-AAD^+). Результаты обрабатывали с использованием программы «Statistica 10.0 forWindows».

Результаты исследования. Установлено, что при ТТ на 5 и 8 сутки наблюдается значимое снижение количества $CD3^+$ (соответственно $1,90\pm0,15\times10^9$/л; $1,62\pm0,38\times10^9$/л; в контрольной группе $3,14\pm0,12\times10^9$/л; $p<0,01$) и $CD45RA^+$ (соответственно $0,85\pm0,09\times10^9$/л; $0,90\pm0,07\times10^9$/л; в контрольной группе $2,22\pm0,14\times10^9$/л; $p<0,01$) лимфоцитов в крови. При исследовании гибели лимфоцитов в крови при ТТ выявлено, что количество клеток с ранними признаками апоптоза увеличивается на 5 и 8 сутки эксперимента (соответственно 13,28±2,48 % и 22,26±1,89 %; в контрольной группе 6,66± 0,79 %; $p<0,01$). Содержание лимфоцитов с поздними признаками апоптоза, признаками некроза увеличивается на 5 и 8сутки относительно группы интактных животных (соответственно 0,53±0,12 %; 10,70±3,90 %; в интактной группе 0,16±0,04 %; $p<0,01$). Количество интактных лимфоцитов снижается на 5 и 8 сутки ТТ (86,13±2,58 % и 66,56±5,60 % соответственно; 93,16±0,16 % в группе контроля; $p<0,01$). Полагаем, что активация гибели лимфоцитов в крови при ТТ обеспечивается повышением концентрации проапоптогенных цитокинов (ТНФ-альфа), свободными радикалами в условиях оксидативного стресса и другими факторами. Кроме того, механизм лимфоцитопении при ТТ может быть связан с ограничением лимфоцитопоэза, потреблением лимфоцитов в очаге повреждения.

Применение ЭПО при ТТ на 5 и 8 сутки эксперимента приводит к увеличению количества в периферической крови $CD3^+$ (соответственно $2,98\pm0,19\times10^9$/л; $8,50\pm1,84\times10^9$/л; $p<0,01$) и $CD45RA^+$ (соответственно $1,22\pm0,06\times10^9$/л; $5,34\pm0,92\times10^9$/л; $p<0,01$) лимфоцитов. При исследовании маркеров гибели лимфоцитов в крови при ТТ в условиях введения ЭПО установлено, что на 5 сутки количество интактных клеток, клеток с ранними признаками апоптоза, с поздними признаками апоптоза статистически значимо не отличается от аналогичных показателей в группе животных с ТТ. На 8 сутки ТТ применение ЭПО приводит к значительному снижению количества клеток с ранними признаками апоптоза (7,90±0,77 %; $p<0,01$), с поздними признаками апоптоза, признаками некроза (0,14±0,05 %; $p<0,01$). Как следствие наблюдается увеличение количества интактных клеток на 8 сутки эксперимента (91,94±0,80 %; $p<0,01$).

Механизм иммунотропного действия ЭПО может быть связан с антиоксидантным эффектом ЭПО, ограничением пероксидации мембранных фосфолипидов и инициации гибели лимфоцитов путем апоптоза и некроза. Кроме того, нельзя исключть прямой пролиферацию-стимулирующий эффект ЭПО на клетки-предшественницы в костном мозге и тимусе. По данным некоторых авторов, ЭПО взаимодействует с киназными рецепторами, активируя их, тем самым запуская процессы транскрипции [4]. Наконец, ограничение в условиях применения ЭПО зоны вторичной альтерации в очаге ТТ, а также стимуляция репаративных процессов приведут к снижению генерации медиаторов воспаления, в том числе цитокинов с проапоптогенным эффектом. Следствием указанных механизмов действия ЭПО будет восстановление количества лимфоцитов в крови, ограничение инфекционных осложнений, ускорение репаративных процессов в очаге повреждения после ТТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Осиков М. В., Григорьев Т. А., Федосов А. А. Роль эритропоэтина в реализации тромбоцитарно-клеточных взаимодействий в крови при хронической почечной недостаточности / М. В. Осиков, Т. А. Григорьев, А. А. Федосов // Фундаментальные исследования.– 2012.– № 10-2.– С. 285-289.
2. Влияние эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов / М. В. Осиков, Т. А. Григорьев, А. А. Федосов и др. // Современные проблемы науки и образования.– 2012.– № 6.; URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=7450 (дата обращения: 26.03.2016).
3. Осиков М. В., Григорьев Т. А. Влияние эритропоэтина на активность систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности / М. В. Осиков, Т. А. Григорьев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2012.– Т. 153, № 1.– С. 27-30.
4. Irrera N. Epoetin Alpha and Epoetin Zeta: A Comparative Study on Stimulation of Angiogenesis and Wound Repair in an Experimental Model of Burn Injury / N. Irrera // Injury.– 2015.– V. 11.– P. 12-20.
5. Rani M., Zhang Q., Schwacha M. G. Gamma delta T-cells regulate wound myeloid cell activity after burn / M. Rani, Q. Zhang, M. G. Schwacha // Shock.– 2014.– V. 42, № 2.– P. 133-141.

EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON THE QUANTITATIVE COMPOSITION AND APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD IN DYNAMIC OF EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

Osikov M. V., Simonyan E. V., Saedgalina O. T.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

The study has performed on 90 white non adult rats. Thermal injury (TI) IIIA degree and area of 4% was simulated by immersing an area of skin in water at 98-990 C. Erythropoietin (EPO) administered intraperitoneally at a dose of 500 IU/kg daily. Research leaded on 5 and 8 days of TI. It is found that on 5 and 8 days of TI occur the decrease of the amount of $CD3^+$, $CD45RA^+$ lymphocytes, and increases of the number of cells with signs of apoptosis and signs of necrosis. The using of EPO in TI increases the number of $CD3^+$ and $CD45RA^+$ lymphocytes on days 5 and 8, decreases in the number of cells with early signs, late signs of apoptosis and signs of necrosis.

Keywords: thermal injury, lymphocytes, apoptosis, erythropoietin.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ (ИДО) НА ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ

Попова Н. А.[1,2], Николин В. П.[1], Каледин В. И.[1], Лушникова Е. Л.[3]

[1]Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН; [2]Новосибирский национальный исследовательский университет; [3]ФГБНУ институт молекулярной патологии и патоморфологии, Новосибирск, Россия

В экспериментах на мышах с перевиваемыми опухолями показано, что результаты иммуномодулирующего влияния ингибиторов индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО) неоднозначны, так как зависят от многих факторов – взаимоотношения опухоли и организма на разных стадиях опухолевой прогрессии, от степени иммунной привилегии опухолевого роста и т.п.

Ключевые слова: противоопухолевый иммунитет, ингибирование, индоламин-2,3-диоксигеназа.

Известно, что в клетках многих опухолей, а также в инфильтрирующих их макрофагах экспрессируется фермент индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО), катаболизирующий триптофан по кинурениновому пути, в результате чего создается локальный дефицит этой незаменимой аминокислоты и избыток токсичных для Т-лимфоцитов продуктов метаболизма, приводящие к подавлению противоопухолевого иммунитета. Следовательно, высокая экспрессия в опухолях ИДО может рассматриваться как один из способов ускользания опухолей от иммунной атаки. В связи с этим есть основания считать ИДО возможной мишенью иммунотерапии опухолей, и что препараты, ингибирующие активность ИДО, могут преодолевать иммунорезистентность опухолей.

Нами в экспериментах на животных – опухоленосителях исследовано влияние ряда ингибиторов ИДО на рост опухолей, характеризующихся разной степенью иммуногенности. В первой серии экспериментов использованы мыши линии С3НА и штамм перевиваемой несингенной иммуногенной гепатокарциномы Г-29. Опухоль происходит от мыши линии СВА, но прививается у 100% мышей линии

С3НА, у значительной части которых в последующем прекращает рост и отторгается. В качестве ингибитора ИДО использовали синтетический аналог триптофана – 1-метил-D-триптофан (1-МТ), который вводили через сутки после внутримышечной трансплантации опухоли в место прививки. Образующиеся в мышцах бедра опухоли периодически измеряли штанген-циркулем. Вопреки ожиданиям в этом эксперименте мы наблюдали стимуляцию роста опухолей в группе мышей, получавших 1-МТ по сравнению с контрольной группой. В контрольной группе у 37,5 % мышей опухоли прогрессивно росли, а у остальных после непродолжительного роста регрессировали, то у мышей, получавших 1-МТ, трансплантаты опухолей росли с момента прививки и к месячному сроку достигли объема 6,0±13 $см^3$, в это же время в контрольной группе объем опухолей составил 0,5 $см^3$.

В следующем эксперименте в качестве ингибитора ИДО мы использовали применяющийся в клинике малотоксичный противовоспалительный агент этилпитруват. Эксперимент поставлен на мышах линии С3НА, отторгнувших опухоль ГА-1 после первичной трансплантации небольшой дозой клеток (5×10^5). Затем опухоль привили повторно большей дозой клеток (25×10^5). Этилпируват вводили одной группе внутрибрюшинно дважды в день в течение 20 суток, другой – в район локализации опухоли в течение 10 дней. Опухоли, возникшие у 100 % экспериментальных мышей, регрессировали у всех животных через 26 дней, причем в группе с этилпируватом с несколько большей скоростью. Через месяц после регрессии опухолей мышей использовали повторно, трансплантровав еще большую дозу клеток (5×10^6) и начали лечение путем ежедневного местного введения этилпирувата. Через 6 дней опухоли возникли в обеих группах, но динамика их роста была замедленной в группе с этилпируватом по сравнению с контролем. Таким образом, мы показали, что у предиммунизированных животных хроническое или местное введение ингибитора ИДО этилпирувата вызывает ускоренное отторжение повторных трансплантатов опухоли ГА-1 [2]. Хроническое пероральное введение этилпирувата продемонстрировало аналогичный эффект [3]. Представляло интерес, можно ли подавив иммунорезистентность опухоли с помощью ингибиторов ИДО, увеличить эффективность воздействия противоопухолевых препаратов. С этой целью провели испытание влияния двух ингибиторов – этилпирувата и синтезированного в Институте органической химии амидоксима на противоопухолевый эффект циклофосфана. Эксперименты поставлены на мышах ICR с иммуногенной опухолью аденокарциномой Эрлиха. Показано, что этилпируват и амидоксим при введении мышам порознь и совместно усиливают терапевтический эффект циклофосфана. Неожиданными получились результаты аналогичного эксперимента, в котором в качестве терапевтического агента использовали препарат циклоплатам. В этом случае ингибиторы ИДО не улучшали, а ухудшали результаты противоопухолевой терапии.

Таким образом, нами показано, что эффект ингибиторов ИДО может быть прямо противоположным в зависимости от применения их на разных стадиях взаимоотношений организма и опухоли – торможение роста уже устоявшихся опухолей и стимуляция при первичном контакте опухоли с организмом. Это предположение в полной мере может относится и к клиническим ситуациям, когда устанавливаются разные не контролируемые взаимоотношения опухоли и организмы. При этом следует не забывать и о гетерогенности опухолей; в процессе прогрессии могут возникать клоны по-другому реагирующие на лечение, чем прежние.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ингибитор активности индоламин-2,3-диоксигеназы 1-метил-D-триптофан может стимулировать рост иммуногенных опухолей / Е. Д. Васильева, В. П. Николин, Н. А. Попова и др. // БЭБиМ.– 2010.– Т. 149.– № 5.– С. 559-561.
2. Ускоренное отторжение иммуногенной опухоли у мышей при ингибировании активности индоламин-2,3-диоксигеназы этилпируватом / Е. Д. Васильева, В. П. Николин, Н. А. Попова и др. // Сибирский онкологический журнал.– 2012.– № 1.– С. 41-44.
3. Богданова Л. А., Морозкова Т. С., Каледин В. И. Иммуномодулирующее влияние этилпирувата на несингенную перевиваемую опухоль мышей / Л. А. Богданова, Т. С. Морозкова, В. И. Каледин // БЭБиМ.– 2014.– Т. 155.– С. 750-752.
4. Двойственное влияние ингибиторов индоламино-2,3-диоксигеназы на терапевтическое действие циклофосфана и циклоплатама в отношении асцитной опухоли Эрлиха у мышей / Л. А. Богданова, Т. С. Морозкова, С. А. Амитина и др. // БЭБиМ.– 2014.– Т. 157.– С. 507-510.

IMMUNOMODULATING EFFECTS OF INDOLAMINE-2,3-DIOXIGENASE INHIBITORS ON TUMOR GROWTH

Popova N.A.[1,2], Nikolin V.P.[1], Kaledin V.I.[1], Lushnikova E.L.[3]

[1]Institute Cytology and Genetics SB RAS; [2]Novosibirsk State University; [3]Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, Russia

In the experiments on mice with transplantable tumors is shown that the effects of indolamine-2,3-dioxigenase inhibitors on tumor growth are unequal in relation on stage of tumor progression and immune privilege.

Keywords: tumor immunity, indolamine-2,3-dioxigenase inhibitors.

БИОПОДОБНЫЕ (БИОАНАЛОГИЧНЫЕ) ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Авдеева Ж.И., Солдатов А.А., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Представлены современные подходы к оценке доказательства подобия вновь разработанного препарата на основе моноклональных антител, представляемого в качестве биоподобного (биоаналогичного) препарата, и оригинального (референтного) препарата.

Ключевые слова: моноклональные антитела, биоаналогичные (биоподобные) препараты, оценка качества, доклинические и клинические исследования.

Лекарственные препараты моноклональных антител (МкАТ) относятся к группе биотехнологических препаратов, производство которых осуществляется с использованием биотехнологических процессов, в том числе ДНК-рекомбинантной технологии, технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих биологически активные белки в прокариотах и эукариотах, включая измененные клетки млекопитающих и гибридомного метода. Препараты на основе МкАТ, обладающие потенциалом направленного терапевтического воздействия на патогенетически значимые механизмы развития заболевания, успешно применяются при тяжелых хронически протекающих заболеваниях онкологического, аутоиммунного, инфекционного, аллергического профиля, а также в трансплантологии для лечения и профилактики отторжения трансплантанта. Окончание срока действия патентной защиты на оригинальные биотехнологические лекарственные препараты, позволяет разрабатывать и внедрять в клиническую практику биологические препараты, имеющие высокое подобие/сходство с оригинальным препаратом. Учитывая сложность точного воспроизведения технологического процесса производства генно-инженерного оригинального препарата, неоригинальные препараты не могут быть его точной копией (в отличие от «дженериков» – воспроизведенных препаратов, получаемых путем химического синтеза).

Нормативные требования для «дженериков», регламентирующие правила проведения доклинических и клинических исследований и порядок регистрации, не могут быть применены для оценки качества, эффективности и безопасности биоаналогичных (биоподобных) препаратов. EMA (2005-2015), ВОЗ (2009-2013), FDA (2012-2015) разработаны

и утверждены нормативные документы, устанавливающие порядок регистрации препаратов «biosimilars» и принципы доказательства их подобия, включая документы, касающиеся препаратов на основе МкАТ [1-4].

Принципы доказательства подобия препаратов «biosimilars» основаны на поэтапном сравнительном исследовании, начиная с оценки физико-химических и биологических свойств биоаналогичного (биоподобного) и оригинального (референтного) препаратов, а также результатов последующих сравнительных доклинических и клинических исследований с оценкой эффективности и безопасности препаратов. После завершения каждого из этапов исследования проводится анализ результатов, на основании которого разрабатывается программа сравнительных исследований для следующего этапа. Высокое сходство/подобие исследуемых препаратов по физико-химическим и биологическим свойствам, позволяет на последующих этапах исследования (доклиническом и клиническом) сократить объём исследований. Согласно определению FDA, выявленные различия с оригинальным препаратом по показателям качества, не должны оказывать негативного влияния на безопасность и эффективность препарата, т.е. установленные различия не должны иметь клинической значимости.

На этапе оценки качества должны быть проведены сравнительные исследования по характеристике физико-химических свойств, включающих определение структуры белка первичного, вторичного и более высокого порядка, посттрансляционные модификации, профиль гликозилирования, наличие и состав изоформ, показатели чистоты, качественный и количественный состав примесей и т.д. Сравнительные исследования биологической активности должны включать оценку активности, опосредованной F(ab)2-фрагментом МкАТ, активности за счет связывания антител с Fc-рецепторами (FcγRI, FcγRIIα, FcγRIIb, FcRn, FcγRIIIα и FcγRIIIb) или за счет Fc- и F(ab)2-фрагментов. На основании результатов исследований *in vitro* разрабатывают план доклинических исследований *in vivo*. Основные доклинические исследования должны быть проведены на соответствующем виде животных, включая изучение фармакокинетики (ФК), хронической токсичности, токсикокинетики, иммуногенности и местно-раздражающего действия. Соответствующим является такой вид животного, при проведении исследования на котором изучаемый материал является фармакологически активным за счет экспрессии рецептора. При выборе соответствующего вида животного важным фактором является распределение рецепторов в клетках/тканях, биологических жидкостях. Необходимо учитывать, что исследования по оценке ФК, иммуногенности и токсичности на несоответствующем виде животных позволяют получить дополнительные сведения о сравнительной характеристике исследуемых препаратов и аргументы доказательства их подобия. Результаты оценки иммуногенности позволяют адекватно интерпретировать данные по ФК и определению токсичности препаратов, однако не могут быть использованы для прогнозирования иммуногенности при клиническом применении. Клинические сравнительные исследования должны быть проведены на достаточно чувствительной и однородной популяции. Исследования ФК могут быть проведены на здоровых добровольцах или пациентах в зависимости от особенностей препарата и могут быть объединены с исследованием фармакодинамических свойств препарата. При оценке результатов клинических исследований по установлению подобия основное внимание должно быть направлено на доказательство аналогичной эффективности и безопасности исследуемого препарата МкАТ по сравнению с референтным, а не подтверждение ранее установленной эффективности референтного препарата. При сравнительной оценке эффективности важен выбор наиболее клинически значимых маркеров, как и выбор маркеров, обеспечивающих получение убедительных доказательств клинической безопасности, в частности касающейся иммуногенности. Комитетом EMA (CHMP) 27.06.2013 принято положительное решение о лицензировании двух первых препаратов «biosimilars» (инфликсимаб – Remsima® и Inflectra®, производства Celltrion и Hospira, соответственно) [5]. Указанные препараты МкАТ, специфичные к ФНОα, разработаны как биоподобные оригинальному препарату Remicade® (производство компаний «Johnson & Johnson» и «Merck»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: Non-clinical and clinical issues (revision

1). (EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005). London. January 2015. Effective date: 1 July 2015.
2. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). Annex 2 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixtieth report.Geneva, WHO Technical Report Series, No. 977. 2013.
3. Guidance for industry. Quality consideration in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). April 2015.
4. Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010). London. 2012.
5. Assessment report. Remsima. (EMA/CHMP/589317/2013). 27 June 2013. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).

BIOSIMILAR MEDICAL PRODUCTS MONOCLONAL OF ANTIBODIES

Avdeeva Zh.I., Soldatov A.A., Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Bondarev V.P

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Modern approaches to an estimation of the demonstration of similarity of again developed preparation on a basis of monoclonal antibodies, represented as biosimilar product, and an original (reference) product are presented.

Keywords: monoclonal antibodies, biosimilars, assessment of quality, preclinical and clinical trials.

MNRI: ИММУНОКОРРИГИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НА СУБПОПУЛЯЦИОННУЮ СТРУКТУРУ ЛИМФОЦИТОВ ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ ДАУНА

Ахматова Н.К., Ахматова Э.А., Лебединская О.В.

ФГБУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина» РАМН, Москва, Россия

Многие дети с синдромом Дауна являются часто болеющими, и, несмотря на существующие в литературе данные об иммунологических особенностях таких детей, влияние различных методов терапии остаются малоизученными, как на уровне исследований врожденного, так и адаптивного иммунитета. Это определило цель исследования – изучение влияния нейро-сенсомоторной интеграции рефлексов на иммунный статус детей с синдромом Дауна. После проведения терапии MNRI у детей с синдромом Дауна отмечается коррекция абсолютных показателей клеточного иммунного ответа – содержания в периферической крови CD45/CD3, CD3/CD4, CD3/CD8 и CD45/CD20 -экспрессирующих лимфоцитов. Поэтому терапию нейро-сенсомоторной интеграции рефлексов можно рекомендовать в качестве метода социальной реабилитации этой группы детей.

Ключевые слова: иммунофенотип, синдром Дауна, MNRI®.

Синдром Дауна – генетическое заболевание, связанное с изменениями в 21-й паре хромосом [1]. Риск рождения ребенка с синдромом Дауна у женщин увеличивается с возрастом с 0,54 % (фертильный возраст) до 4,2 % (старше 45 лет). Увеличение экспрессии гена фермента супероксиддисмутазы, локализованного на 21-й хромосоме, как предполагают, является одной из основных причин в возникновении умственной отсталости [2]. Низкие

темпы физического развития у детей с синдромом Дауна могут сочетаться с аномалиями развития сердечно-сосудистой (до 50 %) и других систем [3].

Данная патология является предметом многогранного изучения специалистами разного профиля, разрабатываются методы социальной реабилитации, включающие развитие нейро-сенсомоторных, психоречевых функций детей [4], использование аминокислотной метаболической терапии, применение нейротрофических факторов с нейропротективным и нейрорегенераторным действием, усиливающих нейропластичность и стимулирующих нейрогенез [5].

Несмотря на существующие в литературе данные об иммунологических особенностях таких детей [6], влияние различных методов терапии остаются малоизученными, как на уровне исследований врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Это определило **цель исследования** – изучение влияния нейро-сенсомоторной интеграции рефлексов на иммунный статус детей с синдромом Дауна.

Материалы и методы. Проведено наблюдение и обследование 49 детей (34 мальчиков и 15 девочек) с синдромом Дауна, проходивших обследование в НИИ вакцин и сывороток им И. И. Мечникова (Москва) и в Институте нейро-сенсомоторной интеграции рефлексов доктора С. Масгутовой (Мелроуз, Флорида, США).

В работе использовалась терапевтическая программа «Нейро-сенсомоторная интеграция паттернов рефлексов» – MNRI (Masgutova Neuro-Sensory-Motor Reflex Integration). Данная программа включает в себя диагностическую часть и терапевтические процедуры [6]. Основной задачей диагностики является оценка степени зрелости и интеграции двигательных схем динамических и постуральных рефлексов. Эта процедура позволяет выявить дефекты развития в двигательной сфере, возникающие в результате слабого или неправильного формирования рефлексов.

У детей с синдромом Дауна была изучена динамика содержания субпопуляций лимфоцитов периферической крови после нейро-сенсомоторной интеграции рефлексов.

Субпопуляцию лимфоцитов CD45-FITC/CD3-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD16-FITC/CD32-PE/CD56-APC, CD45-FITC/CD20-PE, CD45-FITC/CD25-PE, CD45-FITC/CD95-PE определяли при помощи мАТ согласно инструкции производителя (Biolegend, USA) на проточном цитометре Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, USA).

Статистическую обработку результатов проводили в рамках параметрической и непараметрической базовой статистики с использованием U-критерия Mann-Whitney, применяя стандартный пакет статистических программ Windows 7 (StatSoft 7.0). Различия рассматривались как значимые при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Для оценки особенностей иммунного статуса у детей с синдромом Дауна в возрасте 1 года и старше 3-х лет изучены субпопуляционная структура лимфоцитов, уровни цитокинов и иммуноглобулинов в крови. Анализ субпопуляций лимфоцитов выявил достоверное снижение количества Т-лимфоцитов (CD45/CD3, CD3/CD8) при увеличении клеток CD3/CD4, абсолютного числа В-лимфоцитов (CD45/CD20), количества активированных клеток (CD45/CD25) и естественных киллеров (CD16/32/CD56), что, возможно, является компенсаторной реакцией иммунной системы. Указанные особенности отмечались у детей с синдромом Дауна в возрасте 1 года и старше 3-х лет и могут расцениваться как иммунологическая характеристика данного синдрома.

Проведение терапии нейро-сенсомоторной интеграции рефлексов у детей с синдромом Дауна приводило к повышению абсолютных показателей Т-лимфоцитов (CD45/CD3) в группе детей старше 3-х лет с 1,69±0,03до 2,45±0,31 (в 1,5 раз) и в группе детей с синдромом Дауна после терапии MNRI) с 1,29±0,16 до 3,22±0,23 (в 2,5 раз). Также отмечено повышение уровней Th (CD3/CD4) по сравнению с уровнями до терапии в группе с 0,65±0,2 до 1,31±0,2 (в 2 раза). При этом данный показатель повышался в группе детей до года после MNRI с 0,64±0,18 до 1,42±0,3 (в 2,2 раз), в группе старше 3-х лет с 0,49±0,09 до 0,8±0,1 (в 1,63 раз).

У детей старше 3-х лет выявлено повышение численности цитотоксических Т-клеток с 0,49±0,09 до 0,95±0,1 (в 1,94 раза). У данной категории детей также отмечалась коррекция содержания В-лимфоцитов (CD45/CD20) – с 0,39±0,06 до 0,89±0,07 (в 2,9 раза) и численность клеток экспрессирующих CD45/CD95 – с 0,59±0,04 до 1,3±0,1 (2,2 раза).

Данные разных исследователей демонстрируют, что дети с синдромом Дауна тре-

буют особого подхода к оценке их нервно-психического развития, использования совокупных оценочных таблиц развития детей с особыми потребностями. Все они склонны к вирусно-бактериальным инфекциям, аллергическим процессам, в том числе к бронхообструктивному синдрому [3]. Это является отражением имеющихся у них изменений иммунного статуса, проявляющегося дефицитом клеточных и гуморальных иммунных реакций.

После проведения терапии MNRI у детей с синдромом Дауна отмечается коррекция абсолютных показателей клеточного иммунного ответа – содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих CD45/CD3, CD3/CD4, CD3/CD8 и CD45/CD20.

Изменение иммунного статуса у детей с синдромом Дауна, можно считать одним из признаков данного синдрома и учитывать при лечении острых заболеваний с рекомендацией проведения терапии нейро-сенсомоторной интеграции рефлексов, как метода социальной реабилитации этой группы детей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lejeune J., Gautier M., Turpin R. Le mongolism, premier exempie d'aberration autosomigue humaine / J. Lejeune, M. Gautier, R. Turpin // Ann. Genet.– 1959.– V. l.– P. 41.
2. Weiss A. H., Kelly J. P., Phillips J. O. Infantile Nystagmus and Abnormalities of Conjugate Eye Movements in Down Syndrome / A. H. Weiss, J. P. Kelly, J. O. Phillips // Invest Ophthalmol Vis Sci.– 2016.– V.57(3).– P. 1301-1309.
3. Каплина С. П., Харит С. М., Скрипченко Н. В. Особенности иммунологического статуса детей с синдромом Дауна / С. П. Каплина, С. М. Харит, Н. В. Скрипченко // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.– 2012.– № 3 (64).– С. 61-69.
4. Bornstein N., Poon W. S. Accelerated recovery from acute brain injuries: clinical efficacy of neurotrophic treatment in stroke and traumatic brain injuries / N. Bornstein, W. S. Poon // Drugs Today (Barc).– 2012.– V. 48 (Suppl. A).– P. 43-61.
5. Ram G., Ghlnen J. Infections and Immunodeficiency In Down syndrome / G. Ram, J. Ghlnen // Glln Explmmunol.– 2011.– V. 164 (1).– P 9-16.
6. Masgutova S. K. Integration of Dynamic and Postural reflexes into Whole Body Movement System / Masgutova S. K., Akhmatova N. K.– Warsaw: MINK, 2005.– ISBN – 83-89370-16-6.– 207 p.

MNRI: IMMUNOCORRECTIVE EFFECT ON THE SUBPOPULATION STRUCTURE OF LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH DOWN SYNDROME

Akhmatova N. K., Akhmatova E. A., Lebedinskaya O. V.

I. I. Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccines and Serums, Moscow, Russia

Many children with Down syndrome often suffer from illnesses, but despite the existing knowledge about the specifics of the immune system of such children (10, 8), the impact of different interventions in congenital and adaptive immunity remains insufficiently unexplored. This defines the purpose of this study: to research the influence of Neuro-Sensory Reflex Integration treatment program on the immune status of children with Down syndrome. Children with Down syndrome that underwent MNRI® therapy displayed a correction of absolute cell counts in the cellular immune responses, the content of activated CD45/CD3, CD3/CD4, CD3/CD8 and CD45/CD20 lymphocytes in peripheral blood. The Neuro-Sensory Motor and Reflex Integration therapy should be recommended as a rehabilitation method for this group of children.

Keywords: immunophenotype, Down Syndrome, MNRI®.

ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОГО РЕЖИМА ВВЕДЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО БИОФЛАВОНОИДА И КВЕРЦЕТИНА ДИГИДРАТА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ ПРИ ОСТРОЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Албегова Д. З.[1], Павлова С. И.[2,3], Цыпкина А. В.[1], Албегова Ж. К.[4], Козлов И. Г.[1,2]

[1]ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России; [2]ФГУ ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва; [3]ФГБОУ ВПО Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, Чебоксары; [4]ГБОУ ВПО Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России, Россия

На сегодняшний день актуальным является изыскание высоко избирательных иммуносупрессантов. «Таргетные» лекарственные средства кардинально изменили стратегию фармакотерапии, продемонстрировав высочайшую эффективность в отношении отдельных заболеваний. Целью данного исследования явилось изучение влияния модифицированного биофлавоноида на функциональные возможности клеток-эффекторов врожденного иммунитета в модели *in vivo*. Было показано, что режим краткосрочного предварительного внутрибрюшинного введения модифицированного биофлавоноида не усугубляет течение инфекционного процесса на ранних его этапах.

Ключевые слова: флавоноиды, врожденный иммунитет.

В связи с завершением интенсивных исследований в молекулярной биологии и генетике рака, во второй половине XX века были разработаны и внедрены принципиально новые иммуносупрессанты и противоопухолевые препараты (моноклональные антитела и низкомолекулярные ингибиторы сигнальных молекул: циклоспорин, макролидные антибиотики, «тинибы»). В основе их механизмов действия лежит не неспецифическое уничтожение активно пролиферирующих клеток, а целенаправленная элиминация/угнетение опухолевых или иммунокомпетентных клеток идентичной природы.

На сегодняшний день актуальным является изыскание высоко избирательных иммуносупрессантов, не оказывающих влияния на клетки, которые не участвуют в иммунном ответе в момент терапевтического использования препаратов. На место подобных иммуносупрессантов на сегодняшний день претендуют ингибиторы внутриклеточных сигнальных молекул и, так называемые «регуляторы/переключатели» иммунного ответа. С точки зрения разработки новых лекарственных препаратов, большой интерес представляет класс полифенольных соединений растительного происхождения, поскольку многие флавоноиды демонстрируют разнообразные биологические эффекты на организменном уровне.

Целью данного исследования являлось изучение влияния модифицированного биофлавоноида (МБФ) и препарата сравнения – кверцетина дигидрата (КД) на функциональные возможности клеток-эффекторов врожденного иммунитета на организменном уровне – в модели *in vivo*.

В данной работе острое бактериальное воспаление органов брюшной полости воспроизводили на мышах линии Balb/c внутрибрюшинным введением $2{,}0\times10^9$ КОЕ/мышь *Staph. aureus* в средней log-фазе роста бактериальной культуры, что составляло LD_{70}. Выбор такого уровня сублетальной дозы был обусловлен целью исследования: изучение возможности усугубления течения инфекционного процесса, на фоне изучаемого потенциального иммуносупрессивного агента.

Из взятых в эксперимент мышей были сформированы следующие группы:

1. животным первой группы за 1 час до бактериального заражения вводили внутрибрюшинно препарат МБФ (10^{-5} моль/кг трехкратно с интервалом 4 ч);

2. животным второй группы за 1 час до бактериального заражения вводили внутрибрюшинно препарат КД (10^{-5} моль/кг трехкратно с интервалом 4 ч);

3. контрольная группа получала внутрибрюшинно соответствующие объемы растворителя на тех же сроках, что и животные экспериментальной группы.

За подопытными мышами наблюдали в течение 14 дней, регистрировали продолжительность жизни животных без лечения и на фоне проводимой экспериментальной терапии.

Визуально развитие инфекционного процесса проявлялось в изменении внешнего вида и поведенческих реакций заболевших. Животные становились адинамичными, плохо поедали корм, шерсть мышей выглядела тусклой, взъерошенной, живот был вздут, отмечались одышка и диарея.

По результатам 6-ти серий экспериментов в контрольной группе и группе мышей, получавших КД к концу первой недели наблюдения более 70 % мышей погибали. Напротив, в экспериментальной группе, получавшей инъекции МБФ, выживаемость составила 90 %. Введение МБФ приводило к статистически значимой разнице в динамике гибели мышей. Выживаемость животных в контрольной группе составила 30,5±4,5 %, в группе КД – 34,2±3,5 %. В группе, получавшей МБФ, была в 3 раза выше и соответствовала 93,5±2,5 %.

Каждое умершее (в день констатации смерти) или выведенное из эксперимента животное (после 14 сут. от начала опыта), подвергалось вскрытию. При вскрытии павших животных определялась как картина сливного перитонита: утолщение и сосудистое инъецирование брюшины, вздутие петель кишечника, очаги межкишечных абсцессов, а также признаки генерализации гнойно-воспалительного процесса: абсцессы в паренхиматозных органах (особенно в печени). Напротив, если экспериментальное животное выживало, в большинстве случаев можно было отметить четкое отграничение гнойно-воспалительного очага за счет спаечного процесса. Это наблюдалось при вскрытии выживших мышей, как в контрольной группе и группе КД, так и группе с предварительным введением МБФ.

Таким образом, проведенные нами исследования позволяют заключить, что режим краткосрочного предварительного внутрибрюшинного введения МБФ не только не усугубляет течение инфекционного процесса на ранних его этапах, но и повышает выживаемость мышей Balb/c с моделированным гнойно-воспалительным процессом органов брюшной полости стафилококковой этиологии, по сравнению с контрольной группой и группой КД, где погибает около 70 % животных.

Говоря о механизмах реализации данного эффекта, можно предположить, что большое значение в повышении выживаемости животных в использованной инфекционной модели могло иметь, по крайней мере, отсутствие выраженного подавляющего влияния на фагоцитарную составляющую клеточного эффекторного звена врожденного иммунитета и способность «организма» ограничивать гнойно-воспалительный процесс. Не исключается и тот факт, который обсуждается в доступной литературе, что флавоноидные соединения могут обладать прямым антибактериальным эффектом [1;2] (однако изучение прямой антимикробной активности не относилось к задачам данного исследования).

С другой стороны, при лимфо- и гематогенной генерализации инфекции и реакция иммунной системы выходит на другой уровень, приобретая черты системного воспаления с полиорганной недостаточностью, главным патогенетическим фактором которой является продукция клетками врожденного иммунитета ФНОα, запускающего генерацию свободных радикалов в клетках-мишенях. Сдерживание развития последнего за счет антиоксидантных [3] и противовоспалительных [4] эффектов полифенольных соединений теоретически также могло способствовать выживанию экспериментальных животных в данной модели [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hatano T., Shintani Y., Aga Y. et al. Phenolic constituents of licorice. VIII. Structures of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of licorice phenolics on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. // Chem. Pharm. Bull. 2000, 48(9), 1286-1292
2. Ulanowska K., Majchrzyk A., Moskot M. et al. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by

estimation of generation times in liquid bacterial cultures. // Biologia. 2007, 62(2), 132-135
3. Chang C. L., Zhang L. J., Chen R. Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory phenylpropanoid derivatives from *Calamus quiquesetinervius*. // J. Nat. Prod. 2010, 73(9), 1227-1231
4. Silva B. J., Seca A. M., Barreto Mdo C., Pinto D. C. Recent Breakthroughs in the Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Morella and Myrica Species // Int J Mol Sci. 2015 Jul 28;16(8):17160-80
5. Tang D., Kang R., Xiao W., Zhang H., Lotze M. T., Wang H, Xiao X. Quercetin prevents LPS-induced high-mobility group box 1 release and proinflammatory function // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2009 Dec; 41(6):651-60

EFFECT OF SHORT-TERM ADMINISTRATION OF THE MODIFIED BIOFLAVONOID AND QUERCETIN DIHYDRATE ON MICE SURVIVAL IN ACUTE STAPHYLOCOCCAL INFECTION

Albegova D. Z.[1], Pavlova S. I.[2,3], Tsypkina A. V.[1], Albegova Zh.K.[4], Kozlov I. G.[1,2]

[1]The Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov, Moscow; [2]Federal Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after D. Rogachev, Moscow; [3]Russia Chuvash State University, Cheboksary; [4]North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russia

Today, research is highly topical immunosuppressants election. «Targeted» drugs have dramatically changed the pharmacotherapy strategy, demonstrating the superior efficacy against specific diseases. The aim of this study was to evaluate the effect of modified bioflavonoid on the functions of effector cells of innate immunity in model in vivo. It was shown that short intraperitoneal administration of the modified bioflavonoid not enhance progress of infection process at early stages.

Key words: flavonoids, innate immunity.

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЛАВОНОИДОВ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС

Бороздeнко Д. А., Воробьев С. В., Киселева Н. М.

ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России

В работе была проведена оценка влияния модифицированных флавонидов на поведение крыс. Под действием химически модифицированного флавоноида (ХМФ) и модифицированного биофлавоноида (МБФ) отмечалось увеличение двигательной и анксиолитической активности.

Ключевые слова: флавоноиды, крысы, обучение, поведение, цитокины

В настоящее время в терапии онкологический заболеваний всё чаще применяют комбинированную иммунотерапию, поэтому большой интерес исследователей, направлен на поиск новых субстанций, обладающих иммуномодулирующими свойствами. Среди этих веществ, особую группу представляют флавоноиды, которые могут по-разному влиять на иммунную систему, как активируя иммунный ответ, так и тормозя его [1]. Такой широкий спектр действия данной группы обусловлен, способностью их влиять на внутриклеточные сигнальные пути, действуя через рецепторы IL, TNF-a и тирозинкиназ, и изменяя синтез биологически активных веществ [2]. Так в исследованиях Албеговой Д. З. и соавторов было показано, что модифицированный биофлавоноид *in vitro* «переключал» Th1 иммунный от-

вет на Th17, что сопровождалось увеличением синтеза IL-17, IL-6 и снижением концентрации IFNγ [3]. В то же время, имеются данные, что иммунотропные препараты могут оказывать влияние на поведение животных [4-6].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния модифицированных флавонидов на поведение крыс.

Опыты проводили на 63 крысах-самцах линии Wistar массой 280,82±30,55 г (питомник КролИнфо). Животные содержались в пластиковых клетках при постоянной температуре (+22 °С), 12-часовом световом дне с неограниченным доступом к воде и пище. Перед началом исследования все животные были протестированы в тесте «норковая камера» для создания идентичных по активности и весу групп. Животные были разделены на 5 групп. Животным 1 группы (n=13) вводили 0,9% раствор NaCl (1-й контроль), 2 группе (n=13) – 5% раствор этилового спирта, который использовали в 4 и 5 группах в качестве растворителя (2-й контроль), 3 группе (n=13) – субстанцию фенотропила (эталонный препарат) в дозировке 100 мг/кг, 4 группе (n=11) – химически модифицированный флавоноид (ХМФ) в дозе 10^{-5} моль/кг (1-я опытная группа), 5 группе (n=13) вводили модифицированный биофлавоноид (МБФ) в дозе 10^{-5} моль/кг (2-я опытная группа). Все вещества вводили животным внутрибрюшинно в течение пяти дней один раз в сутки в одно и то же время в объеме 0,5 мл перед началом экспериментов, далее после двух дневного перерыва за 30 мин. до очередного теста.

В экспериментах изучали поведение животных в различных по стрессогенности средах. Для этого использовали стандартные методики: тест открытое поле (ОП), приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), темно-светлая камера [7]. Статистическую обработку данных проводили с использование программы Statistica 10. Для оценки достоверности различий в поведении применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни и критерий Стьюдента. Различие средних показателей считалось достоверным при p <0,05.

На фоне введения ХМФ у животных в тесте открытое поле по сравнению с 1-й контрольной группой увеличивалось количество норковых реакций (4,2±0,3 и 2,5±1,0 соответственно; p<0,05) и число пересечённых секторов (37,0±5,5 и 22,3±5,2; p<0,05), а так же число норковых реакций по сравнению со 2-й контрольной группой (4,2±0,3 и 3,0±1,1, соответственно; p<0,05). В тесте ПКЛ животные под действием ХМФ выполнили больше стоек относительно контроля 1 (7,8±1,4 и 4,3±1,3; p<0,05) и выглядываний (4,4±1,0 и 1,9±0,7 p<0,05) и контроля 2 (7,8±1,4 и 5,5±1,0; 4,4±1,0 и 2,5±0,5, соответственно). В тесте темно-светлая камера статистически значимых изменений в исследовательно-ориентировочной активности исследуемых групп относительно контрольных не выявлено. Как видно из таблицы, на фоне действия ХМФ отмечается достоверное по отношению к контролю увеличение количества посещения центра арены в ОП и количества заходов в светлые рукава в ПКЛ, а также уменьшения времени замирания и увеличения длительного последовательного груминга, что свидетельствует о менее тревожном поведении животных данной группы. МБФ проявил сходную, хотя и менее отчетливую тенденцию в изменении поведения животных.

Таким образом, исследуемые модифицированные флавоноиды обладают нейротропной активностью, которая проявляется в увеличении ориентировочно-исследовательской активности животных и в умеренном анксиолитическом действии. Данные свойства менее

	ХМФ N=11 M±m	МБФ N=13 M±m	Р-р спирта N=13 M±m	Фенотропил N=13 M±m	Физ раствор N=13 M±m
ОП количество посещений центра	1,0±0,3*	1,1±0,4*	0,5±0,2	1,3±0,4	0,15±01
ПКЛ количество заходов в светлые рукава	1,6±0,4*	0,9±0,3*	0,6±0,2	2,7±0,4	0,2±0,1
ПКЛ время длительного последовательного груминга, с	33,4±6,3*	32,9±10,9	22,4±7,2	18,2±2,8	13,6±5,8
ПКЛ время замираний, с	44,1±12,7*	80,1±18,7	94,2±15,0	7,6±3,5	99,2±23,4

*p< 0,05 относительно контроля 1

выражены, чем у эталонного препарата фенотропила. По всей видимости, данные эффекты можно объяснить повышением уровнем IL-6 и IL-17, которые были показаны ранее [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ершов Ф. И., Шульдяков А. А., Романцов М. Г. Вестник Российской академии медицинских наук, 2013, 10, 13-17.
2. Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдрасилов Б. С., Музафаров Е. Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. 2013, 154-158.
3. Албегова Д. З., Камкина О. В., Павлова С. И., Албегова Ж. К., Лаптев О. С., Козлов И. Г. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015, Т. 159, № 5, 584-586.
4. Новоселецкая А. В., Иноземцев А. Н., Киселева Н. М., Арион В.Я
6. Вестник РУДН. Серия медицина. 2012, 3, 12-15.
7. Киселева Н. М., Новоселецкая А. В., Иноземцев А. Н., Зимина И. В., Арион В. Я. Медицинский академический журнал, 2013, Т. 13, 3, 64-70.
8. Новоселецкая А. В., Крючкова А. В., Киселева Н. М., Зимина И. В., Арион В. Я., Иноземцев А. Н. Электронный образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке» 2015, 8, 6-11.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М 2012, 944 с.

INFLUENCE OF MODIFIED BIOFLAVONOIDS ON RATS' BEHAVIOR

Borozdenko D. A., Vorobyev S. V., Kiseleva N. M.

Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Mosccow, Russia

The influence of modified bioflavonoids (MBFs) on rats' behavior was studied. The MBFs increased the locomotion and anxiolytic activity.

Key words: flavonoids, rats, behavior, cytokines.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА МЫШЕЙ, ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ГРИППА А (H1N 1)

Щипачева О. В.[1], Тузанкина И. А.[1], Мальчиков И. А.[3], Хонина Т. В.[2]

[1]ФГБУН Институт Иммунологии и Физиологии УрО РАН; [2]ФГБУН Институт органического синтеза УрО РАН; [3]ФБУН Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия

Для оценки протективного действия иммунотропных препаратов, применяемых интраназально, при инфицировании вирусом гриппа А (H1N 1), лабораторных мышей в эксперименте заражали гриппом в летальной и полулетальной дозе. В результате был выявлен высокий процент летальности даже в условиях предварительного воздействия иммунотропными препаратами. Возможный протективный эффект был более выражен в группе животных, получавших комбинированный препарат – кремнийцинксодержащий глицерогидрогель с полиоксидонием и, при инфицировании половиной летальной дозы, у мышей, получавших только поликосидоний.

Актуальность исследования продиктована необходимостью поиска препаратов, применение которых в острый период снизит риск летальности.

Цель работы: оценить возможность протективного действия иммунотропных препаратов, применяемых в различных дозах при инфицировании вирусом гриппа лаборатор-

ных животных (беспородные белые мыши) в эксперименте.

Методы: интраназальное введение мышам иммунотропных препаратов: кремнийцинксодержащий глицерогидрогель [1], полиоксидоний, оксолин и комбинация кремний-цинкового гидрогеля с полиоксидонием. Мыши были разделены на 5 групп, одна из них – контрольная. Препараты животным начинали вводить 1 раз в день за 2 дня до заражения их вирусом гриппа А (H1N1) в летальной – LD и полулетальной дозе – LD50 и продолжали в течение 10 суток после этого.

Ранее в наших исследованиях было изучено влияние кремнийцинксодержащего глицерогидрогеля на репарацию поврежденных участков кожи крыс на фоне иммуносупрессии, а также на процесс заживления патологических элементов у пациентов с простым герпесом губ [2].

Основные результаты и выводы: В результате эксперимента был выявлен высокий процент летальности у мышей, даже в условиях предварительного воздействия иммунотропными препаратами. Возможный протективный эффект при инфицировании вирусом гриппа А (H1N1) в летальной дозе, был более выражен у мышей, получавших комбинированный препарат – кремнийцинксодержащий глицерогидрогель с полиоксидонием и, при инфицировании половиной летальной дозы, у мышей, получавших только поликосидоний.

Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Штанько И. Н., Хонина Т. Г., Сахаутдинова Р. Р., Ларионов Л. П., Тузанкина И. А. Новые иммунотропные средства для местного применения на основе кремний- и цинксодержащих глицерогидрогелей // «Цитокины и воспаление» № 1, Т. 13. 2014, С. 133-134
2. Штанько И. Н., Ваневская Е. А., Мандра Ю. В., Хонина Т. Г., Тузанкина И. А., Чупахин О. Н. Кремнийцинксодержащий глицерогидрогель – потенциальный иммунотропный препарат топического применения // Российский иммунологический журнал, 2015, том 9 (18), № 2 (1) с. 514-515

THE STUDY OF IMMUNOTROPIC TREATMENT PROTECTIVE ACTION ON MICE INFECTED BY INFLUENZA VIRUS (H1N1)

Shchipacheva O. V.[1], Tuzankina I. A.[1], Malchikov I. A.[3], Honina T. V.[2],

[1]Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of The Russian Academy of Sciences;
[2]Institute of Organic Synthesis Ural Branch of The Russian Academy of Sciences;
[3]Research Institute for viral epidemiological infections, Yekaterinburg, Russia

To evaluate a protective action of immunotropic treatment applied intranasally, when infecting by influenza virus A (H1N1), during the experiment laboratory mice being in a lethal and a half lethal dose were infected by influenza. As a result the high mortality rate was detected even in the condition of previous action of the immunotropic treatment. The protective effect was more expressed within the group of mice having received the combined silicon-zinc hlicerohydro gel with polyoxidonium and, within the group of mice having received only polyoxidonium when infecting by a half lethal dose.

Раздел 8
ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА И ВАКЦИНОТЕРАПИЯ

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА У ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ ПРИ МЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ «ИММУНОВАК ВП-4»

Серова Т. А., Краснопрошина Л. И., Бишева И. В., Фошина Е. П., Сходова С. А.

ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Проведено изучение динамики показателей системного и мукозального иммунитета у взрослых и детей с хроническими инфекционными заболеваниями при местном применении отечественной бактериальной вакцины «Иммуновак ВП-4». Назально-оральное введение вакцины взрослым приводила только к статистически значимому повышению в их слюне уровня бактериальных антител IgA-изотипа. У детей местное применение вакцины значимо повышало как уровень IgA-антител в сыворотке, слюне и назальном секрете, так и показатели клеточного иммунитета в пределах возрастной нормы.

Ключевые слова: иммунный статус, бактериальная вакцина «Иммуновак ВП-4», местная вакцинация.

Преимущества непарантеральных методов иммунизации перед традиционным подкожным введением вакцин очевидны: почти полное отсутствие реакции на прививку, простота в исполнении, заключающаяся в неинвазивности метода, что особенно важно для детского контингента [1]. При этом применение оптимальных схем неинвазивной иммунизации бактериальными вакцинами дает возможность достичь долгосрочного не только местного, но и системного иммунитета при лечении и профилактики бронхо-легочных заболеваний и заболеваний респираторного тракта и носоглотки [2]. Таким образом, местная иммунизация является одним из приоритетных направлений в иммунотерапии и профилактики инфекционных заболеваний [3,4], и оценка динамики показателей системного и мукозального иммунитета при её проведении является весьма актуальной.

Целью работы являлось изучение динамики показателей клеточного иммунитета и специфических антител различных изотипов к бактериальным антигенам в сыворотке, слюне и назальном секрете у взрослых и детей при местном применении первой отечественной поликомпонентной вакцины «Иммуновак ВП-4».

Материалы и методы. Наблюдали группу больных (11 чел.) в возрасте 18-50 лет с хроническим рецидивирующим фурункулёзом и хроническими очагами бактериальной инфекции ЛОР-органов и группу детей в возрасте 5-11 лет (10 чел.) с бронхо-легочными заболеваниями, частыми эпизодами ОРВИ, заболеваниями ЛОР органов, получавших вакцину ВП-4 назально-орально согласно инструкции по применению. Дважды (до и через 0,5-1,5 месяца после последнего приема препарата) оценивали показатели клеточного иммунитета и уровень специфических антител различных изотипов в сыворотке, слюне и назальном секрете к антигенам *S. aureus* и *Kl. pneumoniae*, входящим в состав вакцины. Антитела определяли методом твердофазного ИФА с помощью моноклональных антител против соответствующих классов иммуноглобулинов и выражали величиной обратного титра при значении оптической плотности равной 0,3. Популяции лимфоцитов определяли методом проточной цитофлюорометрии с использованием моноклональных антител с маркерами Т-клеток – $CD45^+CD3^+$, Т-хелперов – $CD45^+CD4^+$, Т-супрессоров – $CD45^+CD3^+CD8^+$, натуральных киллеров – $CD45^+CD3^-CD16^+CD56^+$, В-лимфо-

цитов – $CD45^+CD3^-CD19^+$. Значимость различий величин в каждой группе до и после лечения оценивали по критерию Вилкоксона для зависимых групп ($p<0,1$). Результаты представлены в виде медианы (Me).

Результаты. Значения титров бактериальных антител колебались в зависимости от их изотипа, природы антигена и вида биоматериала. Уровень антител взрослых и детей всех изотипов к *S.aureus* был на порядок выше, чем к *K.pneumoniae*. В сыворотке титры антител G-изотипа более чем в 10 раз превышали соответствующие титры антител А-изотипа, а титры антител М-изотипа были более чем в 10 раз ниже титров А-изотипа.

В результате курса комбинированной назально-оральной вакцинотерапии у взрослых из всех исследуемых показателей статистически значимо изменился только уровень IgA-антител к обоим антигенам в слюне: стафилококковые антитела увеличились ($p=0,07$) с Me=34,5 до Me=41,5, а антитела к *Kl. pneumoniae* ($p=0,03$) – с Me=9,0 до Me=16,0. При этом титры антител G- и М-изотипов в слюне и G-, А- и М-изотипов антител в сыворотке и назальном секрете, а также показатели клеточного иммунитета до и после вакцинации статистически значимо не различались.

После вакцинотерапии у детей было выявлено статистически значимое повышение в сыворотке уровня IgA-антител к обоим антигенам более чем в 2 раза: стафилококковые антитела увеличились ($p=0,04$) с Me=500,0 до Me=1358,0, а антитела к *Kl. pneumoniae* ($p=0,02$) – с Me=24,0 до Me=71,0. Уровень антител G-изотипа возрос, хотя и незначительно, только в отношении стафилококка ($p=0,05$) – с Me=10091,5 до Me=11258,0, а для IgG-антител к *Kl.pneumoniae* наблюдали лишь тенденцию к повышению – Me возросла с 186,0 до 297,5 ($p=0,1$). Антитела М-изотипа к обоим антигенам в сыворотке значимо не изменялись.

В слюне статистически значимо повышался уровень антител А-изотипа к обоим антигенам: к *S. aureus* с Me=15,0 до 31,5 ($p=0,03$), и с Me=4,0 до Me=7,0 ($p=0,03$) к клебсиеллёзному антигену; титры антител G-изотипа были на порядок ниже и значимо не менялись.

Такая же динамика антител G- и А-изотипов у детей наблюдалась в назальном секрете – статистически значимое повышение было выявлено только для стафилококковых и клебсиеллёзных антител IgA-изотипа: с 648,0 до 938,0 ($p=0,04$) и с 86,0 до 104,0 ($p=0,01$), соответственно.

Местная вакцинотерапия привела к статистически значимому повышению у детей абсолютного количества (10^9кл/л) лимфоидных клеток ($p=0,008$) с Me=2,343 до Me=3,068, Т-лимфоцитов ($p=0,008$) с Me=1,564 до Me=2,0, Т-хелперов ($p=0,02$) с Me=0,786 до Me=0,975, Т-супрессоров ($p=0,05$) с Me=0,539 до Me=0,714 и В-лимфоцитов ($p=0,02$) с Me=0,344 до Me=0,469; значимого изменения натуральных киллеров не было выявлено. При этом у обследуемых детей наблюдалась тенденция к увеличению количества лейкоцитов с Me=7,34 до Me=8,3 ($p=0,1$).

Проведенное исследование выявило, что при назально-оральном введении вакцины ВП-4 у взрослого контингента из всех исследованных параметров иммунного статуса статистически значимо изменялся только уровень антибактериальных IgA-антител в слюне.

В то время у детей при местной схеме вакцинации значимо повышался не только уровень антибактериальных антител А-изотипа в сыворотке, слюне и назальном секрете, но и статистически значимо изменялись показатели клеточного иммунитета – возрастали абсолютные значения лимфоидных клеток, Т- и В-лимфоцитов, а также субпопуляций Т-клеток, при этом показатели клеточного иммунитета у детей не выходили за пределы их возрастной нормы. Это свидетельствует о различных механизмах воздействия местной вакцинации на иммунную систему взрослых и детей. Полученные данные выявили значительную эффективность местного применения вакцины ВП-4 для детей, как в отношении активации широкого антибактериального иммунного ответа, так и в отношении иммуномодулирующего влияния на клеточный иммунитет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Косенко И. М.Иммуномодулирующая терапия заболеваний ротоглотки у детей / И. М. Косенко // Детские инфекции.– 2010.– № 1.– С. 56-61.
2. Новый тип вакцин с комбинацией агонистов Toll-подобных рецепторов – TLRS 1/2,4,5/6,9 / Н. Б. Егорова, Е. А. Курбатова, И. М. Грубер и др. // ЖМЭИ.– 2011.– № 4.– С. 44-48.
3. Караулов А. В. Иммуномодуляция при респираторных инфекциях: от понимания целей и механизмов действия к клинической эффективности / А. В. Караулов // Детские инфекции.– 2012.– № 3.– С. 62-64.

4. Черников В.В. Использование топического иммуномодулятора для профилактики и лечения острых респираторных инфекций у детей / В.В. Черников // Вопросы современной педиатрии.– 2012.– Т. 11.–№ 4.– С. 176-181.

ESTIMATION OF PARAMETERS OF THE IMMUNE STATUS OF ADULTS AND CHILDREN IN MUCOSAL APPLYING THERAPEUTIC VACCINE «IMMUNOVAC VP-4»

Serova T.A., Krasnoproshina L.I., Bisheva I.V., Foshina E.P., Skhodova S.A.

FSBSI «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

Parameters of systemic and local immunity in adults and children with chronic infectious diseases with local application of national bacterial vaccine "Immunovak VP-4" were examined in dynamics. In adults revealed a statistically significant increase only in the level of bacterial antibodies of IgA-isotype in saliva. The children noted a statistically significant increase in the level of IgA-antibodies in serum, saliva and nasal secrets. The parameters of cellular immunity in children also statistically significantly increased only within the age norm.

Keywords: immune status, bacterial vaccine "Immunovac VP-4", the local vaccination.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ВАКЦИНЫ: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ, СОВРЕМЕННЫЕ РАЗРАБОТКИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Славянская Т.А.[1,2], Авдонкина Н.А.[1], Сальникова С.В.[2], Балдуева И.А.[3]

[1]Российский университет дружбы народов, Москва; [2]Институт иммунофизиологии, Москва; [3]ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

В данной работе представлены результаты научных и клинических исследований, демонстрирующие современные достижения в противоопухолевой вакцинотерапии. Показана значимость определения уровней экспрессии различных иммунобиологических маркеров для диагностики и таргетной терапии рака. Дана оценка наиболее перспективным стратегиям вакцинации и проведен анализ возможностей для улучшения методов создания противораковых вакцин. Отмечена высокая эффективность вакцинотерапии, основанной на использовании дендритноклеточных противоопухолевых вакцин и раковотестикулярных опухолеассоциированных антигенов, а также сочетанного применения вакцинотерапии и блокады иммунных контрольных точек. Тем не менее, недостаточная результативность, требует проведения дальнейших исследований для повышения эффективности специфической иммунотерапии при опухолях различной этиологии.

Ключевые слова: иммунотерапия, вакцинотерапия, пептидная вакцина, дендритноклеточная вакцина.

Недостаточная эффективность и ограниченные возможности хирургических методов, лучевой, гормональной и химиотерапии, делают актуальными поиск и разработку новых методов лечения онкологических больных. В последние годы значительное внимание уделяют

выявлению новых опухолевых диагностических и прогностических маркеров, а также созданию новых методов таргетной терапии опухоли, направленной на основные патогенетические механизмы развития опухолевого процесса.

Целью таргетной терапии являются мишени, максимально представленные на опухолевых клетках и умеренно экспрессирующиеся или отсутствующие на нормальных клетках ткани. Ранее в наших работах мы подробно освещали проблемы и перспективы иммунотерапии рака [1], проводили анализ роли цитокинов в иммунопатологии [2], а также оценивали диагностическое и прогностическое значение различных маркеров при этом заболевании [3].

Потенциальные мишени для вакцинотерапии опухоли можно разделить на две большие группы: опухолеспецифические (ОСА) и опухолеассоциированные антигены (ОАА). ОСА очень индивидуальны, образуются в ходе спонтанных мутаций и чужеродны организму. К ним относятся: точковые мутации в RAS-онкогенах, мутации супрессорного гена p53, вирусные антигены (вирус папилломы человека при раке шейки матки). Группа ОАА включает: онкофетальные антигены (альфа-фетопротеин, раковоэмбриональный и простатспецифический мембранный антигены, которые помимо опухолевых клеток обнаруживаются в тканях плода); раково-тестикулярные антигены (в норме встречаются у взрослого человека только в тканях плаценты и яичка). Такие антигены, как NY-ESO-1, MAGE-A3, LAGE, экспрессирует целый ряд опухолей, поэтому в настоящее время они являются самыми многообещающими таргетами для вакцинотерапии. Тканеспецифические антигены специфичны только для той ткани, из которой произошла опухоль (например, антигены клеток меланоцитарного происхождения – MART-1/MelanA, Тирозиназа, GP-100 для меланомы; простатспецифический антиген для рака предстательной железы – РПЖ). К онкопротеинам, избыточно экспрессирующимся клетками опухоли, относятся такие антигены, как HER-2/neu, EGFR, VGFR, белки теплового шока – hsp70. ОАА отличаются слабой иммуногенностью и, следовательно, задачей противоопухолевой иммунотерапии является разработка такой стратегии, при которой презентация ОАА приведет к значительно большей активации эффекторных Т-клеток.

Кроме того, эффективная противоопухолевая вакцина (ПОВ) должна не только стимулировать специфические иммунные реакции, но и препятствовать механизмам ускользания опухоли от иммунного надзора. Среди ПОВ, разрабатываемых в настоящее время, можно выделить три основные категории [4]. Первая категория – клеточные вакцины, включает вакцины, созданные на основе цельных опухолевых клеток (аутологичных, либо аллогенного происхождения); на основе генетически-модифицированных опухолевых клеток; дендритноклеточные вакцины (ДКВ). Основным преимуществом таких вакцин является то, что в их состав входит широкий перечень, как ОСА, так и ОАА. Среди цельноклеточных ПОВ с использованием аутологичных опухолевых клеток известны такие, как: вакцина Reniale (LipoNova), предназначенная для лечения почечноклеточного рака; вакцина OncoVAX (Vaccinogen), используемая у пациентов с колоректальным раком. Вторая категория – белковые вакцины (собственно белковые; пептидные; на основе агонистов пептидов; антиидиотипические; на основе белков, слитых с моноклональными антителами (МКА)). Наиболее изучены вакцины на основе раковотестикулярных антигенов NY-ESO-1 и MAGE-A3. Примерами таких вакцин могут служить: персонализированная пептидная вакцина (PPV); синтетический пептид Сурвивин; вакцины, созданные на основе GP-100, PSA и MUC-1. Слитые (фьюжн) белки представляют собой молекулы ОАА соединенные с цитокинами (например, IL-2 или GM-CSF). Provenge (Sipuleucel-T) на основе аутологичных ДК, активированных рекомбинантным человеческим белком и включающим простатическую кислую фосфатазу, связанную с GM-CSF, был одобрен для лечения гормон-рефрактерного РПЖ с метастазами. Третья категория – векторные вакцины с использованием для доставки ОАА вирусных, бактериальных, дрожжевых векторов; либо плазмидных ДНК. Главным преимуществом таких вакцин является то, что такое сочетание значительно повышает иммуногенность антигена.

В разработке вакцин чаще всего применяют поксвирусные векторы, к прототипу которого относят вирус коровьей оспы. Известны такие векторные вакцины, как: PROSTVAC – против РПЖ, PANVAC-VF – против рака поджелудочной железы. В качестве бактериаль-

ных и дрожжевых векторов используются: *Saccharomyces cerevisiae* с антигенами семи наиболее часто встречающихся мутантных белков семейства онкогена RAS, а также живые ослабленные патогенные бактерии *Salmonella* и *Listeria*. ДК считаются наиболее мощными антиген-презентирующими клетками и, следовательно, одним из самых эффективных инструментов для иммунизации и приготовления ПОВ. ДКВ на основе аутологичных ДК, активированных *in vitro* опухолевым лизатом аллогенных и аутологичных опухолевых клеток, находящихся в состоянии фотоиндуцированного апоптоза и экспрессирующих высокоиммуногенные ОАА, доказали свою высокую эффективность при меланоме и лечении больных диссеминированными солидными опухолями. Новый метод иммунотерапии рака с использованием анти-CTLA4, анти-PD-1 и анти-PDL-1 МКА, названный блокадой ингибиторов иммунного ответа, позволяет активизировать противоопухолевый иммунный ответ во многих слабо иммуногенных опухолях.

Таким образом, благодаря новым технологиям, созданию и использованию ПОВ появилась возможность повысить не только безрецидивную и общую выживаемость, но и качество жизни онкологических пациентов. Тем не менее, остается еще много фундаментальных и прикладных аспектов, требующих пристального внимания ученых и клиницистов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иммунотерапия рака: современное состояние проблемы / И. А. Балдуева, А. П. Карицкий, С. А. Кулева и др. // Аллергология и иммунология.– 2015.– Т. 16, № 4.– С. 354-357.
2. Славянская Т. А., Сепиашвили Р. И. Роль цитокинов в иммунопатологии / Т. А. Славянская, Р. И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология.– 2004.– Т. 5, № 1.– С. 42.
3. Иммунобиологические маркеры: диагностическое и прогностическое значение при раке мочевого пузыря / Н. А. Авдонкина, Т. А. Славянская, И. А. Балдуева и др. // Аллергология и иммунология.– 2015.– Т. 16, № 4.– С. 358-364.
4. Therapeutic cancer vaccines / C.J.M. Melief, T. van Hall, R. Arens et al. // J. Clin. Invest.– 2015.– V.125, № 9.– P. 3401-3412.

CANCER VACCINES: POTENTIAL TARGETS, MODERN DEVELOPMENTS AND PROSPECTS OF USING

Slavyanskaya T. A.[1,2], Avdonkina N. A.[1], Salnikova S. V.[2], Baldueva I. A.[3]

[1]Peoples' Friendship University of Russia, Moscow; [2]Institute of Immunophysiology, Moscow; [3]FSBI «Petrov Research Institute of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Sankt-Petersburg, Russia

This article presents the results of scientific and clinical studies that demonstrate recent advances in cancer vaccinotherapy. It has shown the importance of determining the levels of expression of different immunobiological markers for diagnosis and targeted therapy of cancer. There was given the estimation of the most prospective strategies of vaccination and the analysis of possibilities of improvement the methods of creating cancer vaccines has been carried out. There was marked the high efficiency of vaccinotherapy based on the use of dendritic cell anti-tumor vaccines and cancer-testicular tumor-associated antigens, as well as the combined use of vaccinotherapy and blockade of immune check-points. Nevertheless, lack of effectiveness requires further research for improving the effectiveness of specific immunotherapy in tumors with different etiology.

Keywords: immunotherapy, vaccinotherapy, peptide vaccine, dendritic cell vaccine.

НОВАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОЙ И ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВАКЦИНАЦИИ: КОКЛЮШ, ДИФТЕРИЯ, СТОЛБНЯК

Храмцов П. В.[1,2], Раев М. Б.[1,2]

[1]ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; [2]ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Разработана дот-иммуноаналитическая тест-система, предназначенная для одновременной детекции антител к возбудителям коклюша, дифтерии и столбняка в сыворотке крови. В качестве диагностикума использовали углеродные наночастицы, конъюгированные G белком стрептококка. В результате исследования 155 сывороток крови был продемонстрирован высокий уровень чувствительности и специфичности анализа. Разработанная тест-система может быть использована для оценки эффективности иммунизации коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакциной.

Ключевые слова: вакцинация, дифтерия, столбняк, коклюш, серологическая диагностика.

Мониторинг напряженности поствакцинального иммунитета является одним из основных методов контроля над эффективностью иммунизации населения против инфекционных заболеваний. В связи с этим актуальной остается разработка новых доступных и совершенных методов оценки степени сероконверсии по определению уровня образующихся антител.

Целью исследования являлась разработка серологической дот-иммуноаналитической тест-системы, предназначенной для оценки напряженности поствакцинального иммунитета к коклюшу, дифтерии и столбняку, аранжированной в варианте единовременного определения. Форматную основу использованных в этой работе подходов составляют пионерские работы Hawkes с соавт., посвященные созданию метода дот-иммуноанализа [1]. Несмотря на относительную давность этих работ идеи, сформулированные в них не просто не являются устаревшими, но и, напротив, переживают второе рождение в настоящее время. Первая идея касается создания дот-иммуноаналитических методов, предназначенных для детекции нескольких лигандов в ходе одной реакции. Применительно к серологии мишенями определения могут быть как антитела против разных антигенов одного возбудителя, так и антитела против различных возбудителей инфекционных заболеваний. Весьма привлекательной областью применения подобных тестов является серологический контроль над эффективностью работы мультивалентных вакцин, в частности коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины.

Вторая идея заключается в использовании для регистрации результатов твердофазного анализа приборов, назначение которых далеко от решения лабораторно-исследовательских и клинико-диагностических задач: офисных сканеров, смартфонов, любительских видеокамер. Сомнения в целесообразности использования подобных «ненаучных» приборов для исследовательских и даже клинико-лабораторных целей постепенно исчезают, что следует из целого ряда опубликованных работ, посвященных использованию смартфонов, сканеров и даже Google Glass в биомедицине, в том числе и в твердофазном иммуноанализе. Некоторые характерные примеры таких работ суммированы в обзоре [2].

В нашей работе мы объединили эти два направления иммуноанализа для того, чтобы разработать дот-иммуноаналитическую систему, позволяющую осуществлять одно-

временную детекцию антител, специфичных к антигенам возбудителей коклюша, дифтерии и столбняка.

На первом этапе работы производили подготовку тест-полосок (стрипов) к анализу, своего рода – иммуночипов. Тест-полоски размером 0,5×2 см изготавливали из нитроцеллюлозной мембраны с диаметром пор 450 нм (Bio-Rad, США). На каждый стрип наносили анти-лиганды: столбнячный (0,05 мг/мл) и дифтерийный (0,1 мг/мл) анатоксины, суспензию клеток коклюшного микроба вакцинных штаммов *Bordetella pertussis*: 1.2.0, 1.0.3, 1.2.3 (20 МОЕ) и IgG человека (0,1 мг/мл) в качестве внутреннего контроля. Все анти-лиганды в объеме 3 мкл. После высушивания тест-полоски обрабатывали блокирующим раствором, фосфатным буфером, содержащим 0,1 % твина-20 (ЗФРТ) в течение 60 минут. Подготовленные таким образом стрипы использовали в дальнейшем анализе в качестве твердофазного иммуносорбента (иммуночипа).

Процедуру детекции антител проводили в пластиковых планшетах с прямоугольными лунками размером 7×25 мм и глубиной 1 см. Тест-полоски размещали в лунках планшета, куда добавляли образцы сывороток крови детей, вакцинированных АКДС, разведенные 1:40 в блокирующем буфере. В качестве внешнего контроля использовали:

1. Пулы сывороток крови детей, содержащих коклюшные агглютинины в титрах 1:40 (слабоположительный образец) и 1:640 (сильноположительный образец), разведенные в блокирующем буфере в 40 раз;

2. Международный стандарт ВОЗ (10/262, 1-й Международный стандарт) дифтерийного антитоксина, разведенный блокирующим буфером до концентраций 0,025 МЕ/мл и 0,0025 МЕ/мл (что соответствует концентрации антитоксинов в цельной сыворотке 1 и 0,1 МЕ/мл соответственно);

3. Международный стандарт ВОЗ (ТЕ-3, 1-й Международный стандарт) столбнячного антитоксина, разведенный блокирующим буфером до концентраций 0,025 МЕ/мл и 0,0025 МЕ/мл (что соответствует концентрации антитоксинов в цельной сыворотке 1 и 0,1 МЕ/мл соответственно).

После получасовой инкубации с образцами при температуре +37 °С тест-полоски трехкратно промывали ЗФРТ и осуществляли детекцию антител углеродным диагностикумом [3] в течение 60 мин. После инкубации с диагностикумом на тест-полосках в зоне нанесения антигенов возбудителей формировались окрашенные зоны, причем интенсивность окрашивания пропорциональна содержанию антител в образцах сыворотки крови.

Высушенные тест-полоски сканировали на планшетном сканере CanoScan Lide 600f, полученные изображения обрабатывали при помощи компьютерной программы ImageJ (NIH, США), измеряя интенсивность окрашивания для образцов сывороток крови вакцинированных детей и контролей. На основании полученных данных производили полуколичественную оценку содержания противодифтерийных и противостолбнячных антител, а также качественную детекцию противококлюшных антител.

По концентрации антител к дифтерийному и столбнячному анатоксинам сыворотки разделяли на три группы: <0,1 МЕ/мл (недостаточная защита, требуется иммунизация), 0,1-1,0 МЕ/мл (достаточный уровень защиты), >1,0 МЕ/мл (высокий уровень защиты, иммунизация необходима через 5 лет и более). По содержанию противоколюшных антител сыворотки крови делили на две группы: серонегативные и серопозитивные.

В результате исследования 155 сывороток крови детей с различным прививочным анамнезом в отношении АКДС-вакцины в параллельном сравнении сконструированной тест-системы с традиционными методами детекции антител (ИФА на антитела к дифтерийному и столбнячному анатоксинам, реакция агглютинации на антитела к коклюшному микробу), было продемонстрировано, что чувствительность и специфичность метода в отношении детекции антител к коклюшу равны 88 %, чувствительность выявления антител к столбняку составила 93,5 %, специфичность – 90,9 %, чувствительность выявления антител к дифтерийному анатоксину составила 92,4 %, специфичность – 85 %.

Таким образом, сконструированная тест-система позволяет оперативно осуществлять детекцию антител к трем различным антигеном в одной постановке с использованием одного образца сыворотки крови. Высокие показатели чувствительности и специфичности анализа, его независимость от наличия дорогостоящей считывающей аппаратуры обуславливают его перспективность для оцен-

ки эффективности профилактической иммунизации населения коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакциной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hawkes R., Niday E., Gordon J. A dot–immunobinding assay for monoclonal and other antibodies / R. Hawkes, E. Niday, J. Gordon // Analytical Biochemistry.– V.119.– 1982.– P. 142-147.
2. Gorocs Z., Ozcan A. Biomedical imaging and sensing using flatbed scanners / Z. Gorocs, A. Ozcan // Lab on a Chip.– I.14.– 2014.– P. 3248-3257.
3. Раев М. Б. Частицы коллоидного углерода в системах неинструментальной диагностики / М. Б. Раев // Клиническая лабораторная диагностика.– № 2.– 2008.– С. 45-48

A NOVEL DOT-IMMUNOASSAY FOR QUALITATIVE AND SEMIQUANTITATIVE SSESSMENT OF IMMUNE RESPONSE TO VACCINATION: PERTUSSIS, DIPHTHERIA, TETANUS

Khramtsov P. V.[1,2], Rayev M. B.[1,2]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; [2]Perm State National Research University, Perm, Russia

A solid phase dot-immunoassay for simultaneous detection of antibodies against pertussis, tetanus and diphtheria in blood serum was developed. Carbon nanoparticles covalently conjugated with streptococcal protein G were used as diagnosticum. One hundred and fifty five serum blood sera were totally tested, high levels of sensitivity and specificity of antibody detection were demonstrated. Developed assay could be used to assess efficiency of immunization with DTP vaccine.

Keywords: vaccination, diphtheria, tetanus, pertussis, serological diagnostics.

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ИММУНОАДЪЮВАНТНЫХ И БЕЗАДЪЮВАНТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА

Хромова Е. А., Семочкин И. А., Ахматова Э. А., Столпникова В. Н., Сходова С. А., Сорокина Е. В., Тройнич Я. Н., Ахматова Н. К., Костинов М. П.

ФГБНУ НИИ Вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Единственным способом эффективного ограничения распространения гриппа и уменьшения тяжести его последствий является широкий охват вакцинацией групп риска населения – детей раннего возраста, пожилых людей и беременных. Цель: Изучение влияния противогриппозных вакцин (иммуноадъювантных и безадъювантных) на иммунофенотип лимфоцитов у здоровых лиц *in vitro*. Материалы и методы. Оценивали субпопуляционную структуру лимфоцитов у здоровых лиц под воздействием противогриппозных вакцин методом проточной цитометрии. Результаты. Было отмечено нарастание уровня количества NK- и NKT-клеток под воздействием вакцин Инфлювак (соответственно в 2,8 и 2 раза), Гриппол плюс (в 3,3 и 2,1 раза), Ваксигрип (в 3 и 2,26 раза) и Ультрикс (в 2,4 и 2 раза) по сравнению с нестимулированными культурами МЛПК. Количество В-лимфоцитов увеличивалось в присутствии Инфлювак (в 2,5 раза), Гриппол плюс (в 1,5 раза). Вывод. Более выраженное иммуностимулирующее действие на МЛПК оказывала иммуноадъювантная вакцина Гриппол плюс.

Ключевые слова: иммунофенотип, вакцины против гриппа.

Введение. Наибольшее применение, в силу своей высокой эффективности и малой реактогенности, получили инактивированные вакцины против гриппа, содержащие фрагменты вируса гриппа, а также и иммуномодуляторы. Данные препараты хорошо зарекомендовали себя, т.к. имеют минимальное количество противопоказаний (в основном это аллергические реакции на отдельные их компоненты) и их применение возможно с 6 месячного возраста, в том числе и у беременных женщин [1]. В настоящее время отсутствует информация о сравнительной активности адъювантных и безадъювантных вакцин и их влиянии на врожденные и приобретенные эффекторы иммунной системы на молекулярно-клеточном уровне.

Цель. Изучение влияния противогриппозных вакцин (иммуноадъювантных и безадъювантных) на иммунофенотип лимфоцитов у здоровых лиц *in vitro*.

Материалы и методы. Проводили *in vitro* оценку иммунофенотипа, активированных противогриппозными вакцинами МЛПК здоровых женщин репродуктивного возраста. Исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови проводили методом проточной цитометрии на приборе FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием FITC- и PE-меченых МАТ к CD45/CD3, CD3/CD4, CD3/CD8, CD16/56, CD3/CD16/56, CD45/CD20, CD45/HLA-DR, CD45/CD25, CD4/CD25/Foxp3, CD45/CD95.

Результаты и обсуждение. Изучение влияния различных вакцин (Инфлювак – субъединичная, Ваксигрип и Ультрикс – сплит-, Гриппол плюс – иммуноадъювантная вакцины) против гриппа на субпопуляционную структуру лимфоцитов выявила следующее. Вакцина Гриппол плюс имела более выраженное стимулирующее действие по сравнению с субъединичной и сплит-вакцинами на NK- клетки, клетки с маркером ранней активации CD45/CD25, индуцировала численность естественных регуляторных клеток (CD4/CD25/Foxp3), нарастание количества В-клеток и уменьшала число клеточных типов с маркером апоптоза CD45/CD95. То есть иммуноадъювантная вакцина Гриппол плюс индуцировала формирование эффекторов как врожденного, так и приобретенного иммунитета. При взаимодействии с мононуклеарами периферической крови человека Полиоксидоний существенно повышает цитотоксичность NK-клеток по отношению к клеткам-мишеням. Этот эффект наблюдался практически у всех исследованных доноров, причем повышающий эффект особенно выражен у индивидуумов, у которых активность NK-клеток находилась на нижней границе нормы или была понижена [2].

Нарастание численности T-regs, возможно, можно объяснить иммунорегулирующим влиянием вакцины, содержащей адъювант Полиоксидоний. Иммунорегуляторная функция nTreg реализуется как посредством секреции цитокинов, таких как TGF-β и ИЛ-10, так и контактного взаимодействия с эффекторными Т-лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками [3].

В отношении естественных киллерных Т-лимфоцитов (NKT) с маркером CD3/CD16/CD56 все вакцины имели одинаковое стимулирующее действие, увеличивая численность клеток примерно в 2 раза. NKT, являясь фенотипически неоднородной популяцией клеток, дублируют функции NK и являются связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом [4].

Выводы. Таким образом, резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что наиболее мощным потенциалом в отношении активации различных типов иммунокомпетентных клеток обладает иммуноадъювантная вакцина Гриппол плюс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черданцев А. П.,Костинов М. П.,Кусельман А. И. Вакцинопрофилактика гриппа у беременных: Руководство для врачей / А. П. Черданцев, М. П. Костинов, А. И. Кусельман – М.– 2013-92 с.
2. Механизмы адъювантных эффектов Полиоксидония / А. С. Иванова, Н. Г. Пучкова, А. В. Некрасов и др. // Иммунология гемопоэза.– 2015.– Т. 13.– С. 30-92.
3. Иммунология физиологической беременности / Н. К. Казимирко, Е. Е. Акимова, В. Ю. Завацкий и др. // Молодой ученый.– 2014.– № 3.– С. 132-137.
4. Ахматова Н. К., Киселевский М. В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противоинфекционный / Н. К. Ахматова, М. В. Киселевский.– М.: Практическая медицина, 2008.– С. 258.

IMMUNOPHENOTYPE OF LYMPHOCYTES UNDER THE INFLUENCE IMMUNOADJUVANTED AND UNADJUVANTED INFLUENZA VACCINES

Khromova E.A., Semochkin A.A., Akhmatova E.A., Stolpnikova V.N., Shodova S.A., Sorokina E.V., Troynich Y.N., Akhmatova N.K., Kostinov M.P.

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

The only way to effectively limit the spread of influenza and reduce the severity of its consequences is a wide coverage of vaccination of risk groups of the population – infants, elderly people and pregnant women. Objective: To study the influence of influenza vaccines (immunoadjuvanted and unadjuvanted) on the immunophenotype of lymphocytes *in vitro* in healthy individuals. Materials and methods. We evaluated in vitro a subpopulation structure of lymphocytes in healthy individuals exposed to influenza vaccines by flow cytometry. Results. It was observed increase quantity level of NK- and NKT-cells ander the influence of the vaccines Influvac (respectively 2.8 and 2 times), Grippol plus (3.3 and 2.1 fold), Vaxigrip (2.26 and 3-fold) and Ultriks (2.4 and 2-fold) compared to unstimulated cultures PBMC. The number of lymphocytes was increased in the presence Influvac (2.5 times), Grippol plus (1.5 times). Conclusion. A more expressed immunostimulatory effect on PBMC has provided immune adjuvant vaccine Grippol plus.

Keywords: immunophenotype, influenza vaccines.

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА: ВЛИЯНИЕ НА TLRs

Хромова Е.А., Семочкин И.А., Ахматова Э.А., Столпникова В.Н., Сходова С.А., Сорокина Е.В., Тройнич Я.Н., Ахматова Н.К., Костинов М.П.

ФГБНУ НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

TLRs являются патоген-распознающими рецепторами (PRRR) и экспрессируются практически всеми клетками системы иммунитета. Цель: Изучение влияния вакцин против гриппа на содержание клеток с экспрессией TLRs *in vitro*. Материалы и методы. Изучали экспрессию TLRs на МЛПК методом проточной цитометрии. Результаты. Все вакцины вызывали увеличение численности гранулоцитов с экспрессией эндосомальных рецепторов, но Гриппол плюс индуцировал экспрессию данных рецепторов в большей степени. Сплит-вакцины Ваксигрип и Ультрикс обладали наиболее мощным стимулирующим действием на эндосомальные рецепторы лимфоцитов. Все исследуемые вакцины индуцировали увеличение численности TLR-9-экспрессирующих моноцитов, при этом иммуноадъювантная вакцина Гриппол плюс является стимулятором TLR-3. Вывод. Вакцины против гриппа активируют клетки-эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета.

Ключевые слова: Вакцины против гриппа, TLRs.

Введение. Toll-подобные рецепторы (TLRs) являются патоген-распознающими рецепторами (PRRR) и экспрессируются практически всеми клетками системы иммунитета [1]. Установлена их роль в физиологической регуляции продукции провоспалительных цитокинов, необходимых для иммунологического ответа против инфекций, вызванных бактериями, грибами и вирусами [2]. Известно, что воспаление непосредственно связано в первую оче-

редь с нейтрофилами, которые, как показано в последнее время, экспрессируют практически все известные TLRs. Это объясняет важную роль TLRs в регуляции активности нейтрофилов: активация TLR-4 ЛПС индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов (ИЛ-1β, ИЛ-8 и ФНОα), а активация TLR-2 – MCP-1; стимуляция TLR-2, TLR-4 и TLR-9 сопровождается респираторным взрывом и изменением экспрессии молекул адгезии [3, 4].

Цель. Изучение влияния противогриппозных вакцин на содержание клеток с экспрессией TLRs *in vitro*.

Материалы и методы. Изучали экспрессию TLRs на МЛПК (гранулоциты, лимфоциты, моноциты) методом проточной цитометрии с применением мАТ к TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 8, TLR 9 (e-bioscience, США) с использованием проточного цитометра FC-500 (Beckman Culter, США).

Результаты. Несмотря на то, что вакцины против гриппа должны активировать эндосомальные рецепторы, для сравнения их активности, мы также проанализировали содержание клеток с экспрессией поверхностных TLRs в связи с тем, что в состав одной из исследуемых вакцин (Гриппол плюс) входит адъювант – Полиоксидоний. Изучение влияния данных вакцин на содержание гранулоцитов с экспрессией TLRs выявило существенное повышение экспрессии со стороны TLR-5, TLR-9 под воздействием всех вакцин по сравнению с контролем (без вакцин). Под воздействием вакцины Гриппол плюс отмечалось значимое снижение экспрессии TLR-2 (в 2,2 раза), а при стимуляции вакциной Ваксигрип – снижение TLR-4 в 2 раза. Изменение экспрессии поверхностных маркеров можно объяснить опосредованным неспецифическим воздействием лигандов на их рецепторы. Что касается TLR-3, более активным стимулирующим действием обладала вакцина Инфлювак (увеличение в 7,2 раза), несколько ниже была активность Гриппола плюс (увеличение в 5, 1 раз), сплит вакцины повышали экспрессию в одинаковой степени – в 3,7 раз. Известно, что TLR-8 распознает одноцепочечные РНК вирусов и является специфическим рецептором для распознавания вируса гриппа. Максимально активирующим влиянием обладал Гриппол плюс (увеличение в 5,7 раз), при этом активность Ваксигрипа была несколько ниже (в 4,1 раза) относительно контрольного образца и других вакцин. Это, вероятно, связано с костимулирующим влиянием на экспрессию TLR-8 Полиоксидония в составе вакцины Гриппол плюс и воздействием поверхностных и внутренних вирусных белков в составе вакцины Ваксигрип.

В отношении активации лимфоцитов, экспрессирующих TLRs, было выявлено максимально активирующее влияние на эндосомальные рецепторы сплит – вакцин Ваксигрип и Ультрикс. Под воздействием вакцины Ваксигрип увеличивалась экспрессия TLR-9 в 4 раза, Ультрикс – в 5 раз; Инфлювак и Гриппол плюс оказывали меньшее стимулирующее влияние (увеличение в 2,8 и 3,3 раза соответственно). При инкубации МЛПК с вакциной Ваксигрип происходило увеличение численности клеток с экспрессией TLR-8 в 10 раз, с Ультрикс – в 11 раз. Хорошим стимулирующим влиянием в отношении TLR-3 обладал Ультрикс (увеличение в 3,5 раза), Инфлювак и Гриппол плюс обладали одинаковым действием (увеличение примерно в 2,7 раз). Иммуноадъювантная вакцина проявляла большую активность по сравнению с другими вакцинами только в отношении количества лимфоцитов с экспрессией TLR-4, что можно объяснить опосредованным лиганд-рецепторным взаимодействием.

При анализе TLR-экспрессирующих моноцитов мы получили следующие результаты: Сплит-вакцина Ультрикс является мощным стимулятором в отношении TLR-4 (увеличение в 2 раза) и TLR 6 (в 7,4 раза). Остальные вакцины не влияли на содержание клеток с данными маркерами. Также отмечено увеличение клеток с маркером TLR-5 в 4,7 раз при стимуляции препаратом Инфлювак и уменьщение в 2 раза с вакциной Ультрикс. Следует отметить, что Гриппол плюс является единственной активирующей вакциной в отношении TLR-3 на моноцитах. Все вакцины являлись мощными стимуляторами TLR-9, увеличивая экспрессию в среднем в 5 раз. Примечательным явился факт, что все исследуемые вакцины, за исключением вакцины Инфлювак, статически значимо повышали содержание клеток с экспессией эндосомального рецептора TLR-8, который распознает одноцепочечную РНК вируса гриппа. Вакцигрип увеличивал количество клеток с экспессией данного маркера в 4 раза, Ультрикс в 3 раза, Гриппол плюс в 2 раза.

Выводы. Все вакцины вызывали увеличение численности гранулоцитов с экспрессией эндосомальных рецепторов, но Гриппол плюс индуцировал экспрессию данных рецепторов в большей степени. При этом сплит-вакцины Ваксигрип и Ультрикс обладали наиболее мощным стимулирующим действием на экспрессию данных рецепторов в лимфоцитах. Все исследуемые вакцины индуцировали численность TLR-9-экспрессирующих моноцитов, а иммуноадъювантная вакцина Гриппол плюс стимулировала клетки с TLR-3. Таким образом, выявлено активирующее влияние вакцин против гриппа в отношении клеток-эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сепиашвили Р.И. Основы физиологии иммунной системы / Р.И. Сепиашвили – М.: Медицина – Здоровье, 2003.– 227 с.
2. Engel A., Holt G., Lu H. The pharmacokinetics of Toll-like re-ceptor agonists and the impact on the immune system / A. Engel, G. Holt, H. Lu // Expert Rev Clin Pharmacol.– 2011.– V. 4 (2).– P. 275-289.
3. Gene expression analysis illuminates the transcriptional programs un-derlying the functional activity of ex vivo-expanded granulo-cytes / L.T. Hyang, C.J. Paredes, E.T. Papoutsakis et al. // Physiol Genomics.– 2007.– V. 31 (1).– P. 114-125.
4. Regulation of TLR signaling and inflammation by SOCS family proteins / A. Yoshimura, H.M. Ohishi, D. Aki et al. // J Leukoc Biol.– 2004.– V. 5 (3).– P. 422-427.

INFLUENZA VACCINES: INFLUENCE ON TLRs EXPESSION

Khromova E.A., Semochkin A.A., Akhmatova E.A., Stolpnikova V.N., Shodova S.A., Sorokina E.V., Troynich Y.N., Akhmatova N.K., Kostinov M.P.

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

TLRs are pathogen recognition receptors (PRRR) and are expressed almost in all immune system cells. Objective: To study the influence of influenza vaccines for the maintenance of the cells with the expression of TLRs *in vitro*. Materials and methods. We studied the expression of TLRs in PBMC by flow cytometry. Results. All vaccines induced increase in the number of granulocytes expressing endosomal receptors and Grippol plus induced expression of these receptors to a greater degree. Split vaccines Vaxigrip and Ultriks possessed the most powerful stimulating effect on the lymphocyte endosomal receptors. All study vaccines induced an increase in the number of TLR-9-expressing monocytes, while the immunoadjuvant vaccine Grippol Plus is a stimulant of TLR-3-expressing cells. Conclusion. Influenza vaccines have an activating effect on the cells of innate and adaptive immunity.

Keywords: Influenza vaccines, TLRs.

Раздел 9
АЛЛЕРГОЛОГИЯ И АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И НЕУДОВЛЕТВОРЕННЫЕ ПОТРЕБНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ У ДЕТЕЙ

Славянская Т. А.[1,2], Деркач В. В.[2,3]

[1]Российский университет дружбы народов, Москва; [2]Институт иммунофизиологии, Москва; [3]Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

Многофакторность патогенеза атопического дерматита (АД) обусловливает необходимость дифференцированного подхода к его лечению. Аллерген-специфическая иммунотерапия (СИТ) на протяжении многих лет является единственным патогенетически значимым методом лечения IgE-опосредованных аллергических заболеваний. Проанализированы современные достижения в области изучения СИТ, а также указаны неудовлетворенные потребности при АД. Показана перспектива использования комбинированной иммунотерапии, сочетающей СИТ и иммуномодулирующие препараты, позволяющая не только действовать на механизмы аллергического воспаления, но и восстанавливать иммунные повреждения, которые могут влиять на длительность и тяжесть АД у детей. Предварительная диагностика иммунопатогенетического фенотипа АД и патофизиологических нарушений, включая иммунные, позволит врачу правильно разработать алгоритм комплексного лечения АД у детей, направленную на их коррекцию. Включение СИТ в комплексную программу терапии детям является обоснованным только при аллергической форме АД. Разработка руководящих принципов СИТ для детей с АД, а также расширенный клинический опыт с проведением рандомизированных исследований являются необходимыми. Стратегия лечения детей с АД в будущем будет основана на применении индивидуальной таргетной терапии и микрочиповой диагностике.

Ключевые слова: атопический дерматит, аллергенспецифическая иммунотерапия, комбинированная иммунотерапия, эффективность, неудовлетворенные потребности.

Атопический дерматит (АД) – мультифакторное заболевание, этиопатогенетические факторы, иммунные и неиммунные механизмы развития которого до сих пор широко обсуждается [1]. В последние два десятилетия отмечается не только увеличение распространенности АД, но и увеличение частоты тяжелых, осложненных форм АД с непрерывнорецидивирующим течением, резистентных к традиционной терапии. Успешный контроль АД требует комплексного подхода к терапии. В случаях неконтролируемого течения АД, когда не удается предупредить очередное обострение заболевания, приходится прибегать к более серьезным вариантам терапии, таким, как иммунотерапия. В настоящее время рассматривают две основные стратегии для решения при лечении аллергических заболеваний (АЗ) – это использование СИТ, которая направлена на долгосрочную специфическую модуляцию иммунного ответа в сторону иммунной толерантности к причинно-значимым аллергенам, и биологических модификаторов иммунного ответа для уменьшения патологические иммунных реакций. В связи с этим, использование таргетной терапии в управлении АД является актуальной проблемой.

Комбинированные стратегии, использующие оба эти подхода, могут обеспечить успешное управление АЗ. Однако проблема иммунокорригирующей терапии больных АД до настоящего времени не решена в связи с отсутствием четких критериев назначения иммунопрепаратов, контроля их эффективности, а также разной направленностью и непредсказуемостью воздействия на иммунную систему

организма. Тщательный отбор пациентов с АД тоже имеет большое значение для решения вопроса о назначении иммунотропной терапии, которая в зависимости от выявленных иммунных и/или не иммунных нарушений, фенотипа заболевания, назначается индивидуально в составе комплексной терапии. Иммунопатогенетическое фенотипирование (ИПГФ), установленное по результатам комплексного обследования, становится ключевым фактором для выбора оптимальной терапии при АД. ИПГФ позволяет обеспечить дифференцированный подход к лечению, разработать индивидуальные схемы комплексной терапии данного заболевания. В наших работах [2-4] были опубликованы данные об эффективности комбинированной терапии иммунотропного препарата Ликопид и парентеральной СИТ (КИТ) по ускоренной схеме у детей с АД среднетяжелого и тяжелого течения и сенсибилизацией к антигенам клещей домашней пыли (АКДП). Выполненные исследования показали, что использование патогенетически обоснованной терапии способствует активации синтеза IFN-γ и уменьшению уровня сенсибилизации организма, торможению развития аллергического воспаления путем снижения продукции противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-13, стимулирующих секрецию IgE, и участвующих в иммунных реакциях Th2 типа. Правильно подобранная адекватная КИТ в соответствии с ИПГФ заболевания с учетом выявленных нарушений иммунного статуса, оптимизировала лечение детей и увеличивала продолжительность ремиссии. Внедрение индивидуальных подходов к лечению позволило снизить риск развития тяжелого и хронического АД, а также улучшить качество жизни пациентов. Предварительная диагностика иммунопатогенетического фенотипа АД и патофизиологических нарушений, включая иммунные, позволят врачу правильно разработать алгоритм комплексного лечения АД у детей, направленную на их коррекцию. При подборе дозы аллергена для проведения СИТ необходим индивидуальный подход с учетом патофизиологических и иммунных изменений, степени его специфической сенсибилизации, определенной при постановке кожных проб, которые могут быть в дальнейшем также использованы для оценки клинической эффективности СИТ у детей в процессе лечения. Использование СИТ должно быть оправдано и проводиться под наблюдением высококвалифицированного врача, независимо от пути введения аллергенов. По нашему мнению, СИТ для детей имеет следующие основные неудовлетворенные потребности: недостаточную безопасность и эффективность; недостаточный профиль риск/польза; отсутствие оптимальных протоколов (доза и частота введения); отсутствие стандартизированных экстрактов аллергенов для СИТ; наличие местных и, иногда, системных реакций; четкие рекомендации по минимальному возрасту детей для проведения СИТ; определенные трудности в проведении крупномасштабных, двойных слепых плацебо-контролируемых, рандомизированных клинических испытаний у детей; отсутствие критериев отбора детей для участия в рандомизированных исследованиях; низкая приверженность лечению. Учитывая отличный профиль безопасности, способность влиять на аллергическое воспаление, сублингвальная СИТ имеет хороший потенциал стать кандидатом на патогенетический метод лечения АД.

Новые стратегии лечения АД должна включать комплексную иммунотерапию с использованием СИТ и других биологически активных веществ, способных вмешиваться в патофизиологические процессы. Использование достижений современной молекулярной аллергологии, в частности, молекулярной диагностика АЗ на основе микрочипов [5] может оптимизировать и персонализировать процесс выбора необходимого компонента аллергена, чтобы определить наиболее подходящие вакцины для детей. Микрочиповая диагностика является не только идеальным инструментом для диагностики IgE сенсибилизации и аллергии в детском возрасте, но и очень важна для проведения СИТ, поскольку помогает: оценить риск заболевания и предсказать его прогноз; повысить точность диагностики и определить кросс-реактивную сенсибилизацию у полисенсибилизированных больных; идентифицировать пациентов для СИТ и предсказывать развитие АЗ на основании молекулярного профиля сенсибилизации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Славянская Т. А., Деркач В. В., Сепиашвили, Р. И. Иммунные и неиммунные патогенетические механизмы развития осложненных форм атопического дерматита / Т. А. Славянская, В. В. Деркач,

Р.И. Сепиашвили // Georgian Medical News.– 2015.– № 6(243).– С. 22-28.
2. Slavyanskaya T., Derkach V. Allergen-specific immunotherapy, as a pathogenetically justified method of treatment of children with atopic dermatitis / T. Slavyanskaya, V. Derkach // Allergy, Asthma & Immunophysiology: from basic sciences to clinical management. Ed. R. Sepiashvili. MEDIMOND Int. Proc.– 2013.– P. 39-41.
3. Деркач В.В., Славянская Т.А. Тяжелые формы атопического дерматита у детей: как избежать осложнений? / В.В. Деркач, Т.А. Славянская // Вестник последипломного медицинского образования.– 2014.– № 4.– С. 47-48.
4. Славянская Т.А., Деркач В.В., Сангидорж Б. Атопический дерматит у детей: комбинированная иммунотерапия осложненных форм заболевания / Т.А. Славянская, В.В. Деркач, Б. Сангидорж // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8(17), № 3.– С. 727-729.
5. A WAO – ARIA – GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics / G.W. Canonica, I.J. Ansotegui, R. Pawankar et al. // World Allergy Organ Journal.– 2013.– V.6.– P. 1-17.

EFFICACY AND UNMET NEEDS FOR IMMUNOTHERAPY IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS

Slavyanskaya T.A.[1,2], Derkach V.V.[2,3]

[1]People's Friendship University of Russia, Moscow; [2]Institute of Immunophysiology, Moscow; [3]Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Multifactorial pathogenesis of atopic dermatitis (AD) necessitates a differentiated approach to its treatment. Allergen specific immunotherapy (AIT) has been the only pathogenetically relevant treatment of IgE-mediated allergic diseases (ADs) for many years. There have been analyzed the most advanced achievements in AIT studies as well as there have been specified the unmet needs in AD. The preliminary diagnostics of IgE-mediated AD and pathophysiological disorders, including immune ones, will allow a doctor to develop appropriate comprehensive treatment algorithm for children's AD aimed at its correction. The including of AIT to the children's comprehensive therapy program is reasonable only if AD has the allergic form. It is necessary better to design the randomized research studies and to acquire extended clinical practice in children with AD. Use of the successes of molecular-based allergy diagnostics will help to optimize and personalize the process of selecting the necessary allergens to determine the most appropriate vaccines for children considering the results of the allergen component diagnostics. The strategy of treatment of children with AD in future will be based on individual target therapy and Microarray diagnostics.

Keywords: atopic dermatitis allergen-specific immunotherapy, multiagent immunotherapy, efficacy, unmet needs.

МОРФО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ

Никифорова Е. М., Чуева М. А., Ираклионова Н. С.

ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Проведена оценка состояния слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у детей с хронической крапивницей. В ходе исследования определены морфологические и иммунологические особенности течения хронического гастрита у детей с хронической крапивницей. У пациентов этой группы выявляется более выраженный отек интерстиция слизистой, а также значительные признаки воспаления, характеризующиеся мононуклеарной, нейтрофильной, лимфоцитарной и эозинофильной инфильтрацией.

Ключевые слова: хроническая крапивница, слизистая оболочка желудка, морфология.

Заболевания органов пищеварения в сочетании с хронической крапивницей (ХК) представляют собой одну из важнейших проблем современной клинической педиатрии. Некоторыми авторами отмечается влияние *Helicobacter pylori* (Hp) на развитие механизма ХК. Было отмечено, что хроническая инфекция Hp зачастую способствует увеличению проницаемости стенок желудка для прохождения различных аллергенов [4].

При этом высокая частота вовлечения в патологический процесс желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) как иммунного органа и места реализации аллергических реакций во многом определяет возможность развития тяжелых, длительно текущих гастроинтестинальных аллергозов с формированием хронической органной патологии [3, 5].

Известно, что инфицирование Hp слизистой оболочки желудка способствует миграции нейтрофилов, лимфоцитов и мононуклеаров в место скопление Hp [1]. Наряду с иммунологическим ответом на инфицирование Hp развивается иммунный ответ на проникновение аллергена на слизистую оболочку желудка.

Замедленный Т-клеточный тип аллергии развивается через несколько суток после введения аллергена и сопровождается инфильтрацией мест поступления аллергена мононуклеарами и эозинофилами [2].

Цель исследования. Выявить иммунологические особенности *Helicobacter pylori*-ассоциированного воспаления слизистой оболочки желудка у детей с хронической крапивницей.

Методы исследования. Проводилось открытое простое сравнительное рандомизированное исследование, в которое было включено 114 детей от 8 до 17 лет. Все пациенты были разделены на 2 группы. На момент включения у больных 1 группы был выставлен диагноз ХГ и ХК (45,6 %, 52/114). Во 2 группу (контрольная группа) вошли дети с диагнозом ХГ 54,4 % (62/114). Критериями включения в исследование послужили: возраст пациентов от 8 до 17 лет; установленный диагноз ХГ, ХК. Критерии не включения: ранее обследование и терапия по гастроэнтерологической патологии; терапия глюкокортикостероидами. Критерии исключения: обнаружение при настоящем исследовании язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, а так же гастроэзофагеальной-рефлюксной болезни. Всем детям выполнено обследование в следующем объеме: фиброэзофагогастродуоденоскопия («PentaxFG-24V» (Япония)) с забором биопсийного материала слизистой оболочки желудка: антральный отдел и тело желудка. Все 2 фрагмента были использованы для гистологического исследования с окраской гематоксилином-эозином и по Giemsa (для идентификации *Helicobacter pylori*). В биоптатах слизистой оболочки желудка оценивался характер инфильтрации: мононуклеарная, нейтрофильная, лимфоцитарная, эозинофильная.

Результаты. При проведении морфологического исследования биоптатов было выявлено, что все пациенты обеих групп исследования были инфицированы Нр.

В биоптатах слизистой оболочки тела желудка у больных с ХК имела место насыщенность поверхностного слоя стромы слизистой оболочки мононуклеарами (9,6 %, 5/52), лимфоцитами (5,8 %, 3/52), нейтрофилами (17,3 %, 9/52) и смешанная инфильтрация (мононуклеары, лимфоциты, нейтрофилы) (67,3 %, 35/52). Особенностью инфильтрации слизистой оболочки тела желудка у детей с ХК явилось наличие эозинофильной инфильтрации в минимальных количествах (9,6 %, 5/52). В контрольной группе пациентов инфильтрация мононуклеарами составила 90,3 % (56/62), тогда как у 9,7 % (6/62) нейтрофилами.

Морфологическая картина слизистой оболочки антрального отдела желудка у больных 2-й групп (ХГ) отличалась выраженной инфильтрацией мононуклеарами (90,3 %,56/62). В биоптатах слизистой оболочки антрального отдела желудка у детей 1-й группы (ХК) имела место насыщенность поверхностного слоя стромы слизистой оболочки мононуклеарами (9,6 %, 5/52), лимфоцитами (13,5 %, 7/52), нейтрофилами (46,2 %, 24/52), эозинофилами (7,7 %, 4/52) и смешанная инфильтрация (мононуклеары, лимфоциты, нейтрофилы) (30,8 %, 16/52).

Следует отметить, что у детей с хронической крапивницей в наибольшей степени был выражен отек интерстиция в обеих исследуемых отделах (антральный – 67,3 %, 30/52, тело желудка – 50 %, 26/52), тогда как у детей контрольной группы наблюдался в незначительном количестве (3,2 %, 2/62). ($p<0,5$). Вероятно, это связано с действием совокупности триггерных факторов (Нр и аллерген) на слизистую желудка.

Выводы. При наличии инфицирования *Helicobacter pylori* детей с хронической крапивницей происходит ухудшение течения воспалительного процесса в слизистой оболочке желудка за счет увеличения инфильтрации нейтрофилами, лимфоцитами, эозинофилами и мононуклеарами. Выраженные структурные нарушения в виде отека интерстиция так же наблюдались у детей на фоне хронической крапивницы, что ухудшало течение воспалительного процесса слизистой оболочки желудка.

В связи с полученными данными целесообразно учитывать состояние слизистой оболочки желудка при подборе терапии хронической крапивницы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлова, Н. Н., Прокопенко, В. Д. Иммунный ответ организма на инфекцию Helicobacter pylori / Н. Н. Козлова, В. Д. Прокопенко // Иммунология, аллергология, инфекторология.– 2007.– № 3.– P. 62-66.
2. Верификация атопического статуса у детей дошкольного возраста, страдающих аллергическими заболеваниями / Э. Б. Белан, М. В. Гутов, И. В. Дружинина и др. // Российский аллергологический журнал.– 2008.– № 1.– С. 75.
3. Allergic proctocolitis, food-induced enterocolitis: immune mechanisms, diagnosis and treatment / J. Boné, A. Claver, I. Guallar et al. // AllergolImmunopathol (Madr).– 2009.– V. 37 (1).– P. 36-42.
4. Helicobacter pylori in development of allergic diseases in patients with gastroduodenal diseases / L. B. Lazebnik, S. P. Chernutskaia, V. B. Gervazieva et al. // TerArkh.– 2008.– V. 80.– P. 63-66.
5. Nowak-Wegrzyn, A., Muraro, A. Food protein-induced enterocolitis syndrome / A. Nowak-Wegrzyn, A. Muraro // Curr Opin Allergy Clin Immunol.– 2009.– V. 9(4).– P. 371-377.

IMMUNOLOGICAL FEATURES OF GASTRIC MUCOSA IN CHILDREN WITH CHRONIC URTICARIAL

Nikiforova E. M., Chueva M. A., Iraklionova N. S.

Volgograd state medical University, Volgograd, Russia

The evaluation of the state of the mucous membrane of the digestive tract in children with chronic urticaria. The study revealed morphological and immunological features of chronic gastritis in children with chronic urticaria. Patients in this group revealed a more pronounced interstitial edema of the mucosa, and significant signs of inflammation characterized by mononuclear, neutrophil, lymphocyte and eosinophilic infiltration.

Keywords: chronic urticaria, gastric mucosa, morphology.

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНСЕКТНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Федоскова Т. Г., Федосеева В. Н., Мартынов А. И., Шабанов Д. В., Мирославский О. В., Маковецкая А. К.

ФГБУ "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Разработан алгоритм для «пошаговой» оценки специфической активности инсектных аллергенов с использованием маркеров активации (CD63, CD203) клеток-мишеней аллергических реакций (базофилов), количественного определения медиаторов аллергических реакций (гистамина, сульфидолейкотриенов) и IgE-специфического критерия в системе "*in vitro*". Созданная отечественная система специфической диагностики на базофилах позволяет прогнозировать интенсивность формирования аллергических реакций, выявлять состояние "готовности" клеток-мишеней (базофилов) к дегрануляции и высвобождению медиаторов в ответ на действие специфического аллергена. Проведенное изучение специфической активности инсектных аллергенов в системе "*in vitro*" на модели клеток-мишеней аллергических реакций, с использованием представленных в представленной работе методов, показало специфическую активность полученного аллергена из яда пчелы.

Ключевые слова: клетки-мишени, базофилы, яд пчелы, аллергические реакции.

В настоящее время известно более 200 видов насекомых, контакт человека с которыми вызывает аллергические реакции. При диагностике состояния сенсибилизации у пациента к инсектному аллергену необходимо учитывать специфический характер аллергической реакции на конкретный инсектный аллерген. Следует отметить, что нередко при диагностике инсектной аллергии (ИА) выявляется значительный процент реакций на токсические компоненты яда, слюны насекомых особое внимание исследователей уделяется реакциям токсического типа на контакт с продуктами жизнедеятельности насекомых и разработке способов снижения риска указанных реакций. В то же время известно, что постановка кожных (прик-) тестов сопряжена с риском обострения аллергического заболевания, вплоть до развития анафилактического шока у пациента.

В связи с этим при проведении клинико-лабораторной диагностики особую значимость приобретают тесты "*in vitro*", использование которых исключает контакт с инсектным аллергеном у больного с предполагаемой гиперчувствительностью к конкретному виду насекомого. Существующая система клинико-лабораторной диагностики ИА (анализ анамнеза болезни, оценка специфических IgE) не обладают необходимой степенью чувствительности для выявления наличия у пациентов гиперчувствительности к насекомым. В этом случае постановка тестов с использованием клеток-мишеней аллергических реакций позволит выявить наличие сенсибилизации у пациента к конкретному насекомому и обеспечит прогнозирование развития у пациента анафилактического шока.

Разработанный авторами алгоритм представляет собой последовательность методических исследований для изучения специфической активности инсектных аллергенов в системе "*in vitro*" на модели клеток-мишеней аллергических реакций.

Алгоритм включает следующие методические исследования:

1) определение специфических IgE в сыворотках крови пациентов к инсектным аллергенам

2) определение уровня либерации гистамина при воздействии инсектными аллергенами на клетки-мишени (базофилы). В работе пока-

зана необходимость использования контроля на специфическое IgE связывание с высокоафинным Fc рецептором базофилов

3) клеточный аллерген-стимуляционный тест (КАСТ) для количественного определения уровня выделения сульфидолейкотриенов из базофилов [1]

4) базофильный активационный тест (БАТ) для определения процента активированных базофилов, на поверхности которых появляется маркер CD63 [2]

5) тест "для диагностики *in vitro*" для обнаружения активированных базофилов. Этот тест позволяет четко гейтировать базофилы в образцах цельной крови ($CRTH2^{pos}CD203^{cpos}CD3^{neg}$) [3]

Использование указанных в алгоритме методов оценки специфической активности инсектных аллергенов обеспечило проведение исследований в соответствии со спецификой патофизиологических процессов, определяющих аллергореактивность суммарной аллергенной фракции (САФ) из яда пчелы медоносной – препарата отечественной разработки [4].

Проведено исследование 175 сывороток больных различными атопическими заболеваниями, имеющими в анамнезе гиперчувствительность на ужаления пчелами (диагнозы устанавливались на основании данных сбора анамнеза и общепринятых методов аллергологического обследования в клинике ФГБУ «ГНЦ Институт Иммунологии» ФМБА России. При этом было выявлено 26 пациентов с высокими показателями специфических IgE, сыворотки которых составили основной диагностический банк сывороток. Общий IgE – в интервале 400-800 МЕ/мл.

У 14 пациентов с гиперчувствительностью (ГЧ) на ужаления пчелами (3 класс ИФА) уровень гистаминолиберации составил 38,7 % ± 4,7 при воздействии аллергена яда пчелы (АЯП), при использовании специфического контроля – 45,4 % ± 5,2 (антитела против IgE- связывающего высокоактивного FcεR1 рецептора базофилов). При исследовании проб от 12 пациентов с ГЧ на ужаления пчелами (4 класс ИФА) уровень гистаминолиберации составил 52,6 % ± 5,4 при использовании АЯП, при использовании специфического контроля – 58,4 % ± 4,9. Отрицательным считали результат, когда уровень гистаминолиберации был менее 10 %.

Для 14 пациентов с ГЧ на ужаления пчелами (3 класс ИФА) уровень сульфидолейкотриенов (sLT) в супернатанте лейкоцитарной взвеси составил 539,8 ± 24,7 пг/мл при использовании АЯП, при использовании специфического контроля – 585,4 ± 28,2 пг/мл. При исследовании проб от 12 пациентов с ГЧ на ужаления пчелами (4 класс ИФА) уровень sLT составил 665,6 ± 29,5 пг/мл при использовании АЯП, при использовании специфического контроля – 694,8 ± 34,7 пг/мл.

У 14 пациентов с ГЧ на ужаления пчелами (3 класс ИФА) уровень активации базофилов по маркеру $CD63^+$ составил 42,7 % ± 5,8 при использовании АЯП, при использовании специфического контроля – 47,4 % ± 4,8. При исследовании проб от 12 пациентов с ГЧ на ужаления пчелами (4 класс ИФА) уровень активации базофилов по маркеру $CD63^+$ составил 55,6 % ± 4,7 при использовании АЯП, при использовании специфического контроля – 59,4 % ± 5,1.

Для 14 пациентов с ГЧ на ужаления пчелами (3 класс ИФА) уровень активации базофилов по маркеру $CD203^+$ составил 53,7 % ± 6,1 при использовании аллергена яда пчелы, при использовании положительного контроля – 69,4 % ± 5,8. При исследовании проб от 12 пациентов с ГЧ на ужаления пчелами (4 класс ИФА) уровень активации базофилов по маркеру $CD203^+$ составил 63,7 % ± 6,5 при использовании аллергена яда пчелы, при использовании положительного контроля – 75,4 % ± 5,6.

Показатели активации клеток-мишеней выше 10 % ± 1,2 свидетельствовали о позитивном результате при оценке специфической активности САФ полученной из яда пчелы медоносной. За 100 % брали общее количество базофилов в пробе (600 клеток) при измерении на проточном цитометре.

Разработан алгоритм для «пошаговой» оценки специфической активности инсектных аллергенов с использованием маркеров активации (CD63, CD203) клеток-мишеней аллергических реакций (базофилов), количественного определения медиаторов аллергических реакций (гистамина, сульфидолейкотриенов) и IgE-специфического критерия в системе "*in vitro*". Созданная отечественная система специфической диагностики на базофилах позволяет прогнозировать интенсивность формирования аллергических реакций, выявлять состояние «готовности» клеток-мишеней (базофилов) к дегрануляции и медиаторному ответу на специфический аллерген. Подана патентная заявка «Способ дифференциальной

диагностики гиперчувствительности к яду пчелы (Apis melliferra). Регистрационный номер 2016111927.

Проведенное изучение специфической активности инсектных аллергенов в системе "*in vitro*" на модели клеток-мишеней аллергических реакций, с использованием представленного в нашей работе алгоритма исследования, показало специфическую активность полученного аллергена из яда пчелы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. DeWeck A. L. Cellular allergen stimulation test (CAST) – A new dimension in allergy diagnostics / A.L. DeWeck // Allergy Clin. Immunol. News.– 1993.– V. 5.– P. 9-14.
2. DeWeck A.L., Sanz M. L. Flow cytometric cellular allergen stimulation Test (FAST/Flow-CAST): technical and clinical evaluation of a new diagnostic test in allergy and pseudo-allergy / A.L. DeWeck, M. L. Sanz // ACI International.– 2002.– V.14.– P. 204-215.
3. Kahlert H., Cromwel O., Fiebig H. Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD 203c / H. Kahlert, O. Cromwell, H. Fiebig // Clin. Exp. Allergy.– 2003.– V.33.– № 9.– P. 1266-1272.
4. Аллергоид из яда пчел для аллерген-специфической иммунотерапии больных с аллергическими реакциями на ужаление пчелами и способ его получения / В. Н. Федосеева, И. А. Орлова, А. И. Мартынов, Т. Г. Федоскова.– Патент на изобретение RUS 2279888 от 20.07.2006.

ALGORITHM DESIGN OF RESEARCH OF SPECIFIC ACTIVITY INSECT ALLERGENS WITH USE OF TARGET CELLS OF ALLERGIC REACTIONS

Fedoskova T. G., Fedoseeva V. N., Martynov A. I., Shabanov D. V., Mislavsky O. V., Makovetskaya A. K.

National Research Center — Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

The algorithm is developed for a step-by-step estimation of specific activity insect allergens with use of markers of activation (CD63, CD203) target cells of allergic reactions (basophiles), quantitative definition of mediators of allergic reactions (histamine, sulfidoleukotrienes) and IgE-specific criterion in system "*in vitro*". The created domestic system of specific diagnostics on basophiles allows to predict intensity of formation of allergic reactions, to reveal a condition of "readiness" of target cells (basophiles) to degranulation and to liberation of mediators in response to operation of specific allergen. The spent studying of specific activity insect allergens in system "*in vitro*" on model of target cells of allergic reactions, with use of the algorithm of research presented in this work, has shown specific activity of the received allergen from poison of a bee.

Keywords: target cells, basophiles, poison of a bee, allergic reactions.

Раздел 10
ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ И АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ

СОЦИАЛЬНЫЙ ПОРТРЕТ И ОБРАЗ ЖИЗНИ БОЛЬНЫХ СИФИЛИСОМ В МАЛЫХ ГОРОДАХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Стальмаков А. Л.[1], Москвичева М. Г.[2], Захарова М. А.[2], Гаврилова К. А.[2]

[1]ГБУЗ «Челябинский областной клинический кожно-венерологический диспансер»; [2]ГБОУ ВПО «ЮУГМУ» Минздрава РФ, Челябинск, Россия

Проведено исследование социальной характеристики и образа жизни 350 пациентов больных сифилисом, проживающих в малых городах Челябинской области в период с 2012 по 2014 год. Социально-гигиенический портрет больного сифилисом: молодые люди в наиболее репродуктивном возрасте 21-40 лет (72,1 %), имеющие среднее и неполное среднее образование (65,0 %), в 44,3 % не имеющие семейных отношений, в 68,3 % не занятые общественно-полезным трудом или занятые низко квалифицированной работой, в 70,5 % имеющие низкий доход на уровне или ниже прожиточного минимума, в 99,5 % имеющие вредные привычки, в т.ч. алкогольно-наркотические интоксикации в 12,5 %.

Ключевые слова: сифилис, медико-социальный портрет, малые города.

Цель исследования. Провести исследование медико-социальной характеристики и образа жизни пациентов больных сифилисом, проживающих в малых городах Челябинской области.

Материалы и методы. Проведен опрос 350 пациентов с сифилисом по разработанной нами анкете, в которую были включены закрытые и полузакрытые вопросы с вариантами ответов.

Результаты и обсуждение. Мужчины среди опрошенных составили – 52,5 %, женщины соответственно – 47,5 %. Абсолютное большинство опрошенных обоего пола было трудоспособного возраста 21-30 лет и составило – 39,3 %. Заболевшие сифилисом распределились по возрасту следующим образом: до 20 лет – 4,9 %; 21-30лет – 39,3 %; 31-40 лет – 32,8 %; 41-50 лет – 14,8 %; 51-60 лет – 6,6 %; 60 лет и старше – 1,6 %. Следует отметить, что среди опрошенных доля женщин в возрастной категории от 21 до 29 лет в 1,4 раза выше, по сравнению с мужчинами, а в возрастной категории 31-40 лет количество заболевших мужчин в 1,5 раза превосходит количество заболевших женщин, что отражает особенности эпидемиологии сифилиса в настоящее время.

Согласно большинству исследований, основным фактором, способствующим заражению ИППП, является низкий уровень сексуального и общего образования [1, 2].

Среди опрошенных большинство имело среднее образование – 45,0 %, среднее специальное – 26,7 %, неполное среднее – 20 %, высшее – 8,3 %. Образовательный уровень мужчин и женщин примерно одинаков: неполное среднее образование имели 22,6 из 100 опрошенных мужчин и 17,2 из 100 женщин. Следует отметить, что со средним образованием количество женщин преобладало (51,7 опрошенных женщин против 38,7 у мужчин). Среднее специальное образование имели 32,3 из 100 опрошенных мужчин и 20,7 из 100 опрошенных женщин, высшее 6,5 и 10,3 соответственно.

Среди обследованных нами пациентов состояли в зарегистрированном браке 24,6 % респондентов, 31,1 % опрошенных состояли в незарегистрированном браке. Эти данные свидетельствуют о неблагополучном семейном положении респондентов: чуть менее

трети имеют полноценную семью, 11,5 % из опрошенных разведены. Обращает на себя внимание, что лица, не имеющие семейных отношений, превалируют над всеми остальными: «холост или не замужем, живу один» – 14,8 %, «холост, не замужем проживаю с родителями» – 18 %.

Среди обследованных женатые мужчины встречаются достоверно чаще замужних женщин: 28,1 против 20,7 на 100 обследованных соответствующего пола ($p<0,05$). Мужчины реже состоят в незарегистрированном браке (28,1 на 100 респондентов мужского пола, против 34,5 на 100 женщин).

Неблагоприятный психологический микроклимат семьи, неудовлетворительные жилищно-бытовые условия и материальная обеспеченность, а также отсутствие активной жизненной позиции являются социальными факторами риска заражения ИППП [3,4].

Из опрошенных, проживают в своем благоустроенном доме – 36,7 %, в своем неблагоустроенном доме – 8,3 %, в благоустроенной квартире с площадью более 9 м^2 на человека – 25 %, в благоустроенной квартире с площадью менее 9 м^2 на человека – 16,7 %, в коммунальной квартире проживают – 3,3 %, постоянно снимают жилье – 5 %, проживают в комнате в общежитии – 3,3 %, живут, где придется – 1,7 %.

Среди опрошенных преобладали неработающие, удельный вес которых составил 35 %. Второе ранговое место принадлежало рабочим, удельный вес которых составлял 33,3 %, третье – составили домохозяйки 10 %, четвертое и пятое места составили служащие и учащиеся по 6,7 %, шестое и седьмое места пенсионеры и работники сельских хозяйств – по 3,3 %, последнее место заняли предприниматели 1,7 %.

Анализ уровня среднемесячного дохода на одного члена семьи свидетельствует, что преобладающее большинство респондентов на момент анкетирования имеет доход ниже (23 %) или на уровне прожиточного минимума в Челябинской области – 47,5 %.

Одним из факторов, определяющих распространение сифилиса, признается широкое распространение наркомании, особенно среди лиц с активным сексуальным поведением [5]. Употребление наркотических препаратов отмечено в 5 раз чаще, чем систематическое употребление алкоголя – у 10,4 и 2,1 соответственно на 100 опрошенных. В исследуемой нами совокупности факт курения отметили 87 %.

Таким образом, для больного сифилисом независимо от пола и места проживания характерен трудоспособный возраст, немногочисленная семья, невысокий уровень образования, который в большинстве случаев обуславливает либо трудовую занятость в низкоквалифицированных профессиях с вредными условиями, либо отсутствие работы. Особое значение имеет низкий уровень материальной обеспеченности, неудовлетворительные жилищные условия и значительное распространение среди них вредных привычек, таких как курение, алкоголизм и наркомания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фролова Н. И., Белокриницкая Т. Е., Сухина В. В. Образовательные программы по репродуктивному здоровью для студенток: эффективность и перспективы / Н. И. Фролова, Т. Е. Белокриницкая, В. В. Сухина // Репродуктивное здоровье детей и подростков.– 2011.– № 3.– С. 22-27.
2. Летяева О. И., Гизингер О. А., Зиганшин О. Р. Современные возможности терапии воспалительных заболеваний урогенитального тракта негонококковой этиологии у женщин / О. И. Летяева, О. А. Гизингер, О. Р. Зиганшин // Клиническая дерматология и венерология.– 2011.– № 4.– С. 95-100.
3. Рахматулина М. Р., Шашкова А. А. Инфекции, передаваемые половым путем, и их влияние на репродуктивное здоровье детей и подростков / М. Р. Рахматулина, А. А. Шашкова // Вестн. дерматологии и венерологии.– 2013.– № 4.– С. 30-37.
4. Стальмаков А.Л., Захарова М.А., Москвичева М.Г. Особенности заболеваемости сифилисом в Челябинской области / А. Л. Стальмаков, М. А. Захарова, М. Г. Москвичева // Южно-Уральский медицинский журнал.– 2014.– № 2.– С. 23-27.
5. Распространенность инфекций, передаваемых половым путем, среди лиц, потребляющих психоактивные вещества / И. Г. Шакуров, С. А. Корякин, Е. Д. Кузнецова и др. // Вестн. дерматологии и венерологии.– 2010.– № 1.– С. 15-19.

SOCIAL PORTRAIT AND LIFESTYLE OF PATIENTS WITH SYPHILIS IN SMALL TOWNS CHELYABINSK REGION

Stalmakov A. L.[1], Moskvicheva M. G.[2], Zaharova M. A.[2], Gavrilova K. A.[2]

[1]Chelyabinsk Regional Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary; [2]South Ural State Medical University the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

A study of the social and lifestyle characteristics of 350 patients with syphilis living in the small towns of the Chelyabinsk region in the period from 2012 to 2014. Socio-sanitary portrait syphilis patient: young people in the most reproductive age 21-40 years (72.1 %), with secondary and lower secondary education (65.0 %), 44.3 % in non-family relationships, 68, 3 % are not engaged in socially useful work or occupied low skilled work, in 70.5 % have a low income at or below the poverty level, 99.5 % have bad habits, including alcoholic and narcotic intoxication at 12.5 %.

Keywords: syphilis, medical and social portrait, small towns.

ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ СИФИЛИСОМ

Стальмаков А. Л.[1], Москвичева М. Г.[2], Захарова М. А.[2], Устинова Ю. В.[2]

[1]ГБУЗ «Челябинский областной клинический кожно-венерологический диспансер»; [2]ГБОУ ВПО «ЮУГМУ» Минздрава РФ, Челябинск, Россия

Проведено исследование психоэмоционального статуса 350 пациентов больных сифилисом, проживающих в малых городах Челябинской области в период с 2012 по 2014 год. Проведенное комплексное медико-социальное обследование анкетным методом выявило условия заражения сифилисом, особенности сексуального поведения пациентов больных сифилисом и их психоэмоциональную реакцию на факт заражения и необходимость лечения и информирования половых партнеров.

Ключевые слова: сифилис, медико-социальный портрет, малые города.

Цель исследования. Провести исследование психоэмоциональных реакций больных сифилисом, проживающих в малых городах Челябинской области, во взаимосвязи с имеющимся венерическим заболеванием.

Материалы и методы. Проведено анкетирование 350 пациентов с сифилисом по разработанной анкете, содержащей закрытые, полузакрытые вопросы с вариантами ответов.

Результаты и обсуждение. При проведении исследования мы учитывали, что динамика заболевания во многом зависит от первой реакции на диагноз самого больного, его семейного окружения. Установлено, что известие о диагнозе вызвало испуг у 36,2 % респондентов, паднику – 13,8 %, приняли, как факт, решили, что вылечатся 32,8 % опрошенных, известие вызвало злость и желание расправиться с источником у 13,8 %, желание уйти из жизни – 1,7 %, другой вариант отметили 1,7 %.

О своем заболевании известили партнеров 24,6 % опрошенных, супругов (мужа/жену) – 35,1 %, членов семьи – 14 %, скрыли от всех – 26,3 %. Близкие отнеслись к факту заболевания сочувственно у 40 % опрошенных, с возмущением – 18 %, требовали покинуть семью – 16 %, с укором – 2 %, безразлично – 24 %. Реакция близких привела к отчаянию 18,8 % респондентов, разозлились на непонимание – 20,8 %, ощутили чувство вины – 25 %, для 4,2 % опро-

шенных жизнь показалось конченой, 31,3 % отнеслись безразлично к реакции близких на известие о заболевании.

Своевременное и раннее выявление заболеваний, а также предотвращение факторов, способствующих их развитию и распространению, осуществление профилактической работы с контактами пациента являются основными задачами практического здравоохранения [1]. Что касается анализа по выявлению заболевания, нами установлено, что о своем заболевании 4,9 % опрошенных догадались сами, выявили при обращении к урологу 1,6 %, при обращении к гинекологу – 11,5 %, к дерматовенерологу – 37,7 %, выявили при профосмотре у 16,4 %, привлекли как контакт 24,6 % респондентов, у 1,6 % на заболевание указал партнер. 76,7 % респондентов были направлены в диспансер лечащим врачом, обратились самостоятельно по совету знакомых или родственников 10 %, с помощью знакомых работников были направлены 5 % опрошенных, другой вариант отметили 8,3 %.

Из опрошенных, обследовались только в поликлинике 6,7 %, полностью в диспансере – 38,3 %, обследовались сначала в поликлинике, потом в диспансере 55 %, не выявилось ни одного респондента, которым во время лечения в стационаре пришлось обследоваться в других медицинских учреждениях или пришлось перед госпитализацией обследоваться в частных медицинских учреждениях.

Из опрошенных, источник заражения знали 32,8 %, предполагали 32,8 %, не знали 34,4 %. Источник заражения был привлечен к обследованию по данным 27,3 % опрошенных, к лечению – 30,9 %, 5,5 % респондентов ответили, что данная информация отсутствовала. В 34,5 % случаев не был найден источник заражения.

Различные пути выявления сифилисом, высокая доля лиц, выявленных при профилактическом обследовании, подчеркивает актуальность работы по раннему выявлению сифилиса. По данным нашего исследования у дерматовенеролога выявлено лишь 37,7 % заболевших. В остальных случаях сифилис диагностирован в неспециализированных учреждениях. Это подчеркивает значимость всего комплекса мероприятий по раннему выявлению сифилиса во всех учреждениях здравоохранения.

Оценивая санитарно-гигиеническую грамотность респондентов, следует отметить, что заражение произошло при случайном контакте у 61,8 % опрошенных, при смене партнера – 21,8 %, в состоянии алкогольного опьянения у 12,7 %, умышленно искали удовольствие 1,8 % опрошенных, в результате насильственных действий – 1,8 %.

Представление о возможности выздоровления при сифилисе тоже неоднородно: в процессе лечения настрой на лечение до конца отметили 67,2 % респондентов, уверенность на излечение испытывали 16,4 %, перепады в настроении отмечали 4,9 %, жалость к себе – 4,9 %, безразличие – 6,6 %, неприязнь к окружающим или обиду и жажду мести не отметил ни один из опрошенных.

У 87,7 % опрошенных сложились доверительные отношения с врачами в ходе лечения, неприязненные – 1,8 %, не сложились отношения по причине безразличия со стороны врачей у 5,3 % опрошенных, отношения не сложились по причине высокомерия со стороны врачей у 1,8 %, сами не считали нужным доверять врачам – 3,5 %.

Предоставленной медицинской помощью во время лечения в стационаре были удовлетворены 96,7 % опрошенных, в то время как 3,3 % не были удовлетворены.

По пятибалльной шкале, качество полученной медицинской помощи во время лечения в стационаре было оценено респондентами как отлично в 40,7 % ответов, хорошо – 44,1 %, удовлетворительно – 15,3 %. Такие пункты, как плохо или очень плохо не были отмечены респондентами.

3,3 % опрошенных отметили, что им предложили форму оплаты через кассу с предоставлением документов об оплате, никому не платили – 96,7 %. 100 % опрошенных отметили, что лечащий врач не предлагал никаких платных услуг. При опросе, где опрошенные предпочли бы получить медицинскую помощь, в случае повторного заражения 98,4 % ответили, что предпочли бы получить медицинскую помощь в государственном диспансере, у частного венеролога – 1,6 %. Предпочтение получить медицинскую помощь неофициально у знакомого врача другой специальности или самолечение не отметил ни один из участников опроса.

Исходя из вышеизложенного, в целях создания комплексной стратегии профилактики сифилиса необходимо направлять усилия на такие ключевые моменты, как обеспечение

доступности первичной медико – санитарной помощи, увеличение охвата обследованием больных ИППП до 100 %, формирование направленности профилактических программ на сохранение здоровья населения в отношении ИППП и разработка и внедрение в практику комплекса межведомственных программ, направленных на изменение поведения в группах лиц, уязвимых к ИППП [2].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заболеваемость сифилисом в Российской Федерации за период 2004-2013 гг. / А. А. Кубанова, Л. Е. Мелехина, А. А. Кубанов и др. // Вестн. дерматологии и венерологии.– 2014.– № 5.– С. 24-31.
2. Изучение роли инфекций, передаваемых половым путем в развитии эпидемии ВИЧ-инфекции / М. Г. Москвичева, Л. Ю. Кытманова, М. А. Захарова и др. // Уральский медицинский журнал.– 2014.– № 06.– С. 126-130.

EMOTIONAL STATUS PATIENTS WITH SYPHILLIS

Stalmakov A. L.[1], Moskvicheva M. G.[2], Zaharova M. A.[2], Ustinova U. V.[2]

[1]Chelyabinsk Regional Clinical Skin and Venereal Diseases Dispensary;
[2]South Ural State Medical University the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

A study of mental and emotional status of 350 patients with syphilis living in the small towns of the Chelyabinsk region in the period from 2012 to 2014. Conducted a comprehensive medical and social survey questionnaire method has revealed the conditions of syphilis, especially sexual behavior of patients with syphilis and their psycho-emotional reaction to the fact of infection and the need for treatment and to inform sexual partners.

Keywords: syphilis, medical and social portrait, small towns.

Раздел 11
ТРАНСЛЯЦИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПРАКТИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ

ВОЗРАСТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КОЖИ, КАК ОСНОВА ФОРМИРОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИЙ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ СТАРЕНИЯ

Суховей Ю. Г.[2], Костоломова Е. Г.[1], Унгер И. Г.[2], Гольцов С. В.[1], Стрелин С. А.[1], Акунеева А. В.[3]

[1]ООО «Нео-Клиник»; [2]ООО НПО «Криобанк»; [3]ФГБОУ ВО «Тюменский государственный университет», Тюмень, Россия

Изучали возрастную динамику клеточных элементов и резидентных иммуноцитов кожи. Установлено, что ряд изучаемых параметров сопряжен с процессами старения. Это может быть использовано для создания новых методов предупреждения старения кожи.

Ключевые слова: кожа, возрастные изменения, резидентные иммуноциты, проточная цитометрия, фенотипирование.

Кожа, как самый крупный барьерный орган, является одновременно и индикатором старения организма. При этом, безусловно, оказывает существенное влияние на возрастные процессы организма в целом. В коже соседствуют и взаимодействуют, как основные структурные элементы (кератиноциты, фибробласты, клетки Лангерганса), так и резидентные иммуноциты. Состояние кожи, как органа является результатом сложной комбинации взаимодействия данного пула клеток.

Цель. Охарактеризовать возрастную динамику резидентных иммуноцитов кожи, как возможной основы поиска методов предупреждения старения.

Материалы и методы исследования. Обследовано 80 человек обоего пола в возрасте 15-65 лет.

В качестве источника клеток кожи использовали биоптаты кожи, полученные с ягодичной области здоровых взрослых доноров, с помощью дракара (DERMO-PUNCH 2 мм) (STERYLAB.ITALY) размером 2×2 мм. Толщина кожного лоскута позволяет проводить исследование без проведения ферментной обработки, что снижает опасность действия фермента и благоприятно сказывается на жизнеспособности клеток кожи и исключает их возможную активацию. Суспензию клеток кожи получали при помощи автоматической системы для механической гомогенизации ткани Medimachine (BectonDickinson, USA) [1].

Фенотипирование клеточной суспензии проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре CytomicsFC 500 (BeckmanCoulter, USA) с помощью специфических маркеров (CD49f, CD44, CD 73, CD 90, CD105 CD45, CD14, CD207, CD146, CD249, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56). Анализируемые клетки в виде осадка ресуспензировали в 50 мкл PBS. После добавления антител образцы помещали на 20 минут в холодильник при + 40°С. Для каждого из образцов анализировали не менее 50000-75000 клеток.

Оценку жизнеспособности клеток проводили при помощи внутриклеточного красителя 7-amino-actinomycin DRUO (*7AAD*) (Beckman Coulter, USA).

Для оценки рельефа кожи использовалась оптическая система для 3D-измерения структуры кожи PRIMOS (GFMesstechnicGmbH, Германия). Это оптический метод, используемый для измерения и представляющий собой метод цифровой проекции полос, основанный на использовании цифровых микрозеркальных проекторов (DMD™: DigitalMicromirrorDevices (Цифровые микрозеркальные цстройства)) (TexasInstruments (США)).

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения SPSSv11.5. Результаты выражали в виде% позитивных клеток. Сравнение относительного содержания клеток между группами проводили при помощи t-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили с помощью коэффициента корреляции Пирсона, характеризующую существование линейной зависимости между двумя величинами.

Результаты. Анализируя полученные данные можно сказать, что старение кожи сопряжено с изменениями субпопуляционного состава клеток эпидермиса и дермы, коррелирует с объективными характеристиками внешних проявлений старения кожи.

Основными клетками кожи являются кератиноциты эпидермиса ($CD49f^+$) и фибробласты дермы ($CD44^+$, $CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$), которые регулируют физиологические функции кожи, а продуцируемые ими вещества выступают в роли сигнальных молекул для локальной координации межклеточных взаимодействий. Наряду с этим кожа имеет резидентный пул иммуноцитов, который количественно и колиественно отличается от пула циркулирующих иммунокомпетентных клеток. Согласованная работа кератиноцитов и фибробластов определяет способность поддерживать гомеостаз кожи и реагировать на воздействие внешней и внутренней среды. Несомненно, в этом процессе существует регуляторная квота иммунокомпетентных клеток, которая недостаточно изучена. Полученные данные свидетельствуют о том, что с возрастом количество данных субпопуляций клеток закономерно снижается независимо от пола обследуемых лиц.

Отдельного внимания заслуживают клетки Лангерганса ($CD207^+$), относящиеся к специализированным клеткам эпидермиса, представляющие одну из форм дендритных клеток.

При старении кожи снижается общее количество данной субпопуляции, а, следовательно, и способность клеток Лангерганса вступать в межклеточные взаимодействия при реализации адаптивного иммунного ответа. Ярко выражена зависимость динамики показателей экспрессии антигена HLA-DR ($CD207^+CD$ $HLA\text{-}DR^+$) от возраста 1,95±0,5 в возрастной группе 15-25 лет и 0,9±0,01 в группе 55-65 лет, соответственно.

Неотъемлемой частью иммунной системы кожи являются резидентные иммуноциты. В этом аспекте рассматривается участие различных компонентов кожи (Т и В лимфоциты, NK – клетки, моноциты/макрофаги и тучные клетки). Тот факт, что соотношение данных клеток в коже отличается от их соотношения в периферической крови, свидетельствует об относительной самостоятельности кожного пула резидентных иммуноцитов [2].

Все исследуемые субпопуляции иммуноцитов кожи подвержены той же возрастной динамике, что и основные структурные элементы кожи. Установлены корреляционные связи между показателями шероховатости Sa (средним арифметическим значением шероховатости), Sv (глубиной самой глубокой впадины всего измеряемого участка) и количественным соотношением резидентных иммуноцитов. Так положительные корреляции прослеживаются между Sv и моноцитами\макрофагами ($CD45^+$ $CD14^+$) r = +0,461, Т-лимфоцитами ($CD45^+$ $CD3^+$) r = + 0,484, В-лимфоцитами ($CD45^+$ $CD3^-$ $CD19^+$) и NK-клетками r = + 0,449 и r = +0,422, соответственно. Отрицательные корреляционные связи прослеживаются между средним арифметическим значением шероховатости (Sa) и следующими иммуноцитами кожи: моноцитами\макрофагами ($CD45^+$ $CD14^+$) r = –0,407, Т-лимфоцитами ($CD45^+CD3^+$) и хелперной субпопуляцией Т-клеток ($CD45^+CD3^+CD4^+$) r = – 0,549 и r = – 0,445, соответственно, а так же В лимфоцитами ($CD45^+$ $CD3^-CD19^+$) r = –0,359.

Вывод. Таким образом, комплекс основных структурных элементов кожи и резидентных иммуноцитов является единым и синхронизируется с возрастом. По-видимому, существует возможность влиять на состояние кожи, путем воздействия на резидентные иммуноциты. Разработка подобных методов может явиться новым направлением в системе методов предупреждения старения кожи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Способ получения жизнеспособной гетерогенной популяции клеток кожи / С. В. Гольцов, Ю. Г. Суховей, П. П. Митрофанов.– Патент на изобретение RUS 2502999 от 25.07.2012.
2. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes / R. A. Warnock, S. Askari, E. C. Butcher et al. // Exp. Med.– 1998.– V. 187.– P. 205-216.

THE AGE CHARACTERISTICS OF CELL ELEMENTS SKIN INDIKATORS AS A BASIS OF TECHNOLOGIES PREVENTING AGEING

Sukhovey Y. G.[2], Kostolomova E. G.[1], Unger I. G.[2], Goltsov S. V.[1], Strelin S. A.[1], Akuneeva A. V.[3]

[1]«Neo Clinic»; [2]SPA « Tyumencriobank»; [3]FSBEEHE «Tyumen State University», Tyumen, Russia

Age – related dynamics of cell elements and resident immunocytes of skin were studied. It was determined that a number of characteristics under study is connected with ageing processes. It can be used for creating new methods of preventing skin ageing.

Keywords: skin, age-related changes, the resident immune cells, flow cytometry, phenotyping.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РЕЗОРБТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОСТНОЙ ТКАНИ

Бердюгина О. В.[1,2], Бердюгин К. А.[2,3]

[1]ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ; [2]ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; [3]ГБУ здравоохранения Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи Уральский институт травматологии и ортопедии им. В.Д. Чаклина», Екатеринбург, Россия

При установленном важном значении иммунологических реакций в остеорезорбции после эндопротезирования крупных суставов возможности использования лабораторных тестов недостаточно изучены. Выполнено исследование показателей крови 110 больных до и после первичного тотального эндопротезирования тазобедренного сустава, дифференцированных ретроспективно на группы с благоприятным исходом лечения и с развившейся в среднем через 2 года 8 месяцев резорбцией костной ткани. Оценку количественного и функционального состояния нейтрофильных фагоцитов и гуморального иммунитета проводили при поступлении больного в клинику и в динамике через 3, 10 суток, 1, 3, 6, 9 месяцев, 1,1.5, 2 и 2.5 года. Выделены критерии прогнозирования остеорезорбции: уровень сывороточных иммуноглобулинов, количество моноцитов, активность катионных белков, концентрация IL-1β.

Ключевые слова: эндопротезирование, остеорезорбция, нейтрофилы, интерлейкины.

Актуальность. Осложнения лечения заболеваний и повреждений опорно-двигательной системы в немалой степени содействуют реверсии пациента в клинику для достижения ремиссии [2]. Последнее приводит к росту стоимости лечения, занятости койко-места, в некоторых случаях к невозможности восстановить утраченное здоровье. Одним из весомых осложнений реконструктивных операций по восстановлению костной ткани с применения металлоконструкций является остеорезорбция, обусловленная взаимодействием химических элементов, входящих в состав имплантата с внутренней средой организма [4]. Известно, что активное участие в формировании нестабильности принимают фагоциты, создающие предпосылки для активного функционирования лимфоцитов, остеотропным действием обладает ряд цитокинов [1, 5]. В целом, показано важное значение иммунологических реакций в развитии резорбции костной ткани [3], однако, возможности клинического использова-

ния лабораторных тестов, позволяющих следить за происходящими процессами, требуют пристального изучения, что и определило цель работы: установить иммунологические критерии прогнозирования остеорезорбции.

Материал и методы. Проведено клинико-лабораторное обследование 110 больных до и после первичного тотального одностороннего эндопротезирования тазобедренного сустава. Основными показаниями к хирургическому вмешательству были выраженный болевой синдром и ограничение движений в тазобедренном суставе, явившиеся следствием дегенеративно-дистрофических и посттравматических заболеваний. На основании ретроспективного клинико-рентгенологического анализа пациенты были дифференцированы на 2 группы: 83,6 % – с неосложненным течением эндопротезирования тазобедренного сустава (благоприятный исход лечения) и 15,4 % человек, у которых в среднем через 2 года 8 месяцев на основании рентгенологических критериев выявлены признаки резорбции костной ткани в области чашки, ножки или обоих компонентов имплантата. Исследование крови проводили при поступлении больного в клинику и в динамике через 3, 10 суток, 1, 3, 6, 9 месяцев, 1, 1.5, 2 и 2.5 года. Изучение иммунологических показателей включало оценку количественного и функционального состояния нейтрофильных фагоцитов (поглотительная активность, продукция перекисных радикалов, активность миелопероксидазы и катионных белков), гуморального иммунитета (сывороточные иммуноглобулины, концентрация IL-1β – интерлейкина, TNF-α – фактора некроза опухолей, уровня острофазовых белков). Статистическая обработка проведена с использованием программы «Statisticav.6.1». Оценку прогностических возможностей иммунологических показателей в развитии резорбции костной ткани определяли, используя модифицированную теорему Т. Байеса.

Результаты и обсуждение. Исследование основывалось на сравнительной оценке иммунологических показателей у больных с остеорезорбцией в сравнении с результатами, полученными у пациентов с неосложненным течением эндопротезирования.

Основной акцент был сделан на изучение изменения количественных и функционально-метаболических показателей нейтрофильных фагоцитов, являющихся основными эффекторными клетками иммунной системы. Было установлено, что при резобции на дооперационном этапе у больных отмечалась незначительная нейтропения ($p<0,05$), поглотительная активность клеток, продукция ими перекисных радикалов и активность кислороднезависимых механизмов киллинга были сопоставимы с данными группы больных с неосложненным течением эндопротезирования; также было установлено, что на 11 % была повышена активность миелопероксидазы нейтрофилов ($p<0,05$).

В раннем послеоперационном периоде (3-10 сутки после операции) развивался нейтрофильный лейкоцитоз, отмечалось увеличение популяции фагоцитирующих нейтрофилов, не имевшее существенных отличий от показателей группы с благоприятным течением эндопротезирования, а также изменения проявлений кислородзависимых и кислороднезависимых механизмов киллинга (по данным цитохимической активности катионных белков и миелопероксидазы). Продукция перекисных радикалов фагоцитами снижалась у больных с осложненным течением лечения менее выражено, чем у пациентов с неосложненным течением: в сравнении с дооперационным уровнем понижение составило в среднем 16,3 % и 51,7 % соответственно ($p<0,05$).

Через месяц после операции у больных с осложнением эндопротезирования выявлена нейтропения и достоверное снижение активности миелопероксидазы (на 15,2 % в сравнении с показателями контрольной группы) и катионных белков цитоплазмы (на 14,5 % в сравнении со значениями, полученными у пациентов с благоприятным исходом лечения).

Наблюдение в отдаленном периоде позволило установить транзиторную нейтропению через 1 год после операции (на 29,6 % в сравнении с неосложненным течением эндопротезирования) и транзиторное повышение продукции перекисных радикалов нейтрофильными фагоцитами через 1,5 года наблюдения (на 63,1 %, $p<0,05$ в сравнении с показателями группы неосложненного течения).

Состояние гуморального иммунитета оценивали, прежде всего, по уровню сывороточных иммуноглобулинов. Дооперационный гомеостаз при осложненном эндопротезировании нарушался сниженными значениями уровней IgA на 34 % и IgG на 37,1 % ($p<0,05$). Через 1 месяц после операции фиксировались

различия концентрации Ig M, который был снижен на 23 %, а также существенном понижении уровня Ig G (в 3 раза ниже, чем при неосложненном течении), p<0,05.

Одна из ключевых позиций в цитокиновой сети принадлежит IL-1β, изучение концентрации которого показало значимое превышение его уровня над значениями у пациентов с благоприятным исходом эндопротезирования в раннем послеоперационном периоде: на 3 сутки (в 1,7 раза, p<0,05) и 10 сутки после операции (в 2,9 раза, p<0,05). Через 6 месяцев наблюдения IL-1β вновь транзиторно повышался – его концентрация была в 6,7 раза больше, чем при благоприятном течении эндопротезирования. В этот же период в 8,9 раза была снижена концентрация другого ключевого цитокина, продуцируемого моноцитами-макрофагами – TNF-α. Эти изменения были синергичны наблюдаемой динамике числа моноцитов периферической крови, увеличение количества которых наблюдалось в 1,5 раза (p<0,05).

Важным проявлением биологической активности IL-1β является индукция синтеза острофазовых белков. В частности, операционная травма является пусковым механизмом для развития воспалительной реакции. У больных с развившейся в отдаленном периоде наблюдения резорбцией костной ткани в раннем послеоперационном периоде отмечалось значительное увеличение концентрации С-реактивного белка, уровень которого был выше, чем в группе сравнения на 63 % (p<0,05). Кроме того, у больных с резорбцией костной ткани воспалительная реакция протекала быстрее, что обусловлено, в том числе, и значительным повышением ИЛ-1β. Через 6 месяцев после операции установлено повышение концентрации церулоплазмина и альбумина соответственно на 10,7 % и 33 % в сравнении со значениями, полученными у пациентов с благоприятным исходом лечения.

Использование теории Т. Байеса позволило установить критерии прогнозирования остеорезорбции. Они основываются на определении в разные сроки после операции иммунологических показателей. Обнаружение превышения (снижения) величин их пороговых значений позволяют предположить развитие осложнения. В частности, до операции снижение уровня сывороточного IgA до величины 1,8 г/л и менее с вероятностью 89,2 % и IgG до значения 9 г/л и менее с вероятностью 88,1 г/л позволяют прогнозировать резорбтивные изменения костной ткани после операции. Это создает предпосылки для предоперационной подготовки больного в виде назначения медикаментозной терапии, физиотерапевтических процедур. Увеличение количества моноцитов в раннем послеоперационном периоде: до величины $0,47\times10^9$/л на 3 сутки с вероятностью 80 %, на 10 сутки с вероятностью 85,7 % также позволяют предположить возможность возникновения осложнения. Через 1 месяц после операции прогноз может основываться на определении активности катионных белков цитоплазмы нейтрофилов (1,16 единиц и ниже) и концентрации IgM (1,84 г/л и менее), в этом случае развитие осложнения можно предположить в 86,7 % и 85,9 % случаев соответственно. Прогноз через 6 месяцев после операции может быть основан на увеличении уровня IL-1β до величины 178 пг/мл и более (вероятность составляет 87,1 %).

Таким образом, клинико-рентгенологическое заключение о резорбции костной ткани при эндопротезировании тазобедренного сустава может быть сделано в среднем через 2 года 8 месяцев после операции. Лабораторные иммунологические показатели позволяют выделить группу риска как до операции, так и в послеоперационном периоде в сроки до 6 месяцев с вероятностью от 80 до 89 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Macrophage polarization in response to wear particles in vitro / J. K. Antonios, Z. Yao, C. Li et al. // Cellular & molecular immunology.– 2013.– № 10.– P. 471-482.
2. Green G., Khan M., Haddad F. S. Why do total hip replacements fail? / G. Green, M. Khan, F. S. Haddad // Orthopaedics and trauma.– 2015.– V.29.– № 2.– P. 79-85.
3. Periprosthetic osteolysis after total hip replacement: molecular pathology and clinical management / D. W. Howie, S. D. Neale, D. R. Haynes et al. // Inflammopharmacology.– 2013.– V.21.– № 6.– P. 389-396.
4. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – from space holders to innovative biomaterials / A. Kolk, J. Handschel, W. Drescher et al. // Journal of cranio-maxillofacial surgery.– 2012.– V.40.– № 8.– P. 706-718.
5. Morwood M. P., Garrigues G. E. Shoulder Arthroplasty In The Patient With Metal Hypersensitivity journal of shoulder and elbow surgery / M. P. Morwood, G. E. Garrigues // Journal of shoulder and elbow surgery.– 2015.– V.24.– № 7.– P. 1156-1164.

IMMUNOLOGICAL FACTORS OF BONE RESORPTION

Berdyugina O.V.[1,2], Berdyugin K.A.[2,3]

[1]Ural Research Institute of Phthisiopulmonology; [2]Ural State Medical University, [3]Center of specialized medical assistance Ural institute of Traumatology and Orthopedics of V.D. Chaklin, Yekaterinburg, Russia

The importance of immunological reactions in resorption of bone tissue when the hip large joints are installed. The possibility of using laboratory tests are not enough explored. 110 patients of blood were studied before and after primary total hip replacement. The patients were divided into groups with favourable retrospectively on treatment and outcome with resorption of bone tissue. A complication arose after an average of 2 years 8 months. We evaluated quantitative composition and functional state of phagocytes neutrophilic and humoral immunity. A study conducted for admission of a patient to the clinic, through 3, 10 days, 1, 3, 6, 9 months, 1, 1.5, 2 and 2.5 years. Highlighted resorption of bone tissue forecasting criteria: level of serum immunoglobulins, the number of monocytes, activity of cationic proteins, concentration of IL-1β.

Keywords: arthroplasty, bone resorption, neutrophils, interleukins.

РОЛЬ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО СРЕДСТВА «CELLGEL» В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Костоломова Е.Г.[4], Кудрявцев И.В.[1,2], Суховей Ю.Г.[5], Гольцов С.В.[4], Унгер И.Г.[5], Серебрякова М.К.[1], Трулев А.С.[1] Терпиловский М.А.[3], Гончаров Н.В.[3]

[1]ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; [2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург; [3]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург; [4]ООО «Нео-Клиник», Тюмень; [5]ООО НПО «Тюменькриобанк», Тюмень, Россия

Более глубокое изучение механизмов репаративной регенерации ран кожи, в частности роли апоптоза, может способствовать поиску новых подходов к терапии, связанной с воздействием на иммунные механизмы регуляции гибели клеток и оценке эффективности применяемых лекарственных препаратов для профилактики образования рубцов.

Ключевые слова: ранозаживляющее средство «Cellgel», репаративная регенерация, апоптоз, проточная цитометрия.

На сегодняшний день является бесспорным мнение, что любое ранозаживление – это комплекс мероприятий, направленных на все звенья патологического процесса [1]. Одним из перспективных направлений является применение новых технологий, в частности разработка препаратов, обладающих способностью к нейтрализации и элиминации патогенных микроорганизмов, хорошо проникающих в рану и обладающих репаративными свойствами. Ранозаживляющее средсво «Цельгель» [2] разработано с учетом фазы течения раневого процесса, что позволяет применять его при повреждениях кожи различной этиологии. Действующее вещество средства «Цельгель», получено из экстракта клеток куриного эмбриона, обладает антибактериальной активностью, а так же активизирует процессы репаративной регенерации кожи [3]. Процессы заживления подчиняются тем же принципам,

что и любая соединительная ткань в организме, которые регулируется через клеточно-клеточные и клеточно-матриксные сигналы и процессы пролиферации и апоптоза. Американские ученые в своем исследовании показали, что апоптоз играет важную роль в процессах регенерации ткани при заживлении раны [4]. Если процесс апоптоза не возникает, то воспалительные процессы продолжаются, поскольку из некротизированных клеток продолжают поступать провоспалительные факторы, такие как, например, лизосомальные протеолитические ферменты и метаболиты арахидоновой кислоты. Замедление же процессов аппоптоза приводит к замене грануляционной ткани окончательной рубцовой тканью. Для понимания роли апоптоза в образовании рубцовой ткани необходимы дополнительные исследования, результаты которых, возможно, помогут разработать патогенетически обоснованное лечение и профилактику рубцов.

Цель – изучить влияние вещества, выделенного из экстракта клеток куринного эмбриона, на жизнеспособность и процессы апоптоза клеток в культуре, в зависимости от разных концентраций.

Материалы и методы. Исследуемое вещество получали по авторскому методу [2]. В качестве объекта исследования были выбраны клетки суспензионные культуры THP-1 (клетки моноцитарной лейкемии человека). Культивирование клеток линии THP-1 осуществляли с использованием среды RPMI-1640 («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10 % инактивированной ЭТС («Биолот», Санкт-Петербург), 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Санкт-Петербург) и 2 мМ L-глутамина («Биолот», Санкт-Петербург). Пересев производили каждые 2-3 дня. Для ведения клеток использовали пластиковые флаконы объемом 50 мл («Sarstedt», Германия). Клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2. При постановке экспериментов в лунки 96-луночного плоскодонного планшета («Sarstedt», Германия) вносили 200 мкл клеточной суспензии (2×10^6 клеток в мл) в соответствующей полной культуральной среде. В качестве индуктора апоптоза использовали камптотецин, основной проапоптотической действие которого основывается на подавление активности ДНК топоизомеразы I, в финальных концентрациях 1 и 0,2 мкМ. Вещество интереса вносили в финальных концентрациях 7, 70 и 350 мкМ. Также инкубацию клеток осуществляли в присутствии обоих стимуляторов. Время инкубации в присутствии стимуляторов составляло 24 часа 37 °С в атмосфере 5 % CO_2.

Оценку жизнеспособности клеток проводили при помощи проточной цитофлуориметрии. Для оценки относительного содержания клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза, применяли два флуоресцентных красителя PI и YO-PRO-1 по описанной ранее методике [5]. При окраске клеток к 100 мкл клеточной суспензии ($2\text{-}3\times10^6$ клеток/мл) добавляли раствор YO-PRO-1 («Invitrogen», США) в финальной концентрации 250 нМ и раствор йодистого пропидия («Sigma-Aldrich», США) в финальной концентрации 1 мкг/мл. Окраску проводили при комнатной температуре в течение 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации к образцам добавляли по 200 мкл ЗФР и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ («BeckmanCoulter», США). Для каждого из образцов анализировали не менее 20000 одиночных клеток. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Матричный анализ. Концентрации камптотецина и вещества, использованные в экспериментах, обозначим через множества: $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}, X \in \mathbb{R}$ и $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}, Y \in \mathbb{R}$, соответственно.

Каждой паре значений (x_i; y_i) соответствуют процентные значения величины гибели клеток на ранней стадии от апоптоза (z_i) и на поздней стадии от апоптоза и некроза (z'_i). Таким образом, мы получаем две матрицы, в которой вектор-строки (x_i; y_i; z_i) и (x_i; y_i; z'_i) определяют точки, лежащие на двух поверхностях в трехмерном пространстве, $\mathbb{R}^3$. Полученные данные в виде двумерного массива, обрабатывались с помощью языка программирования Python (Python Software Foundation, http://www.python.org) и модулей SciPy и Numpy. На первом этапе проводилось формирование узлов двумерной сетки с помощью функции numpy.meshgrid [6], а затем данные интерполировались с помощью функции scipy.interpolate.griddata [7]. Графическое построение поверхностей выполнялось с помощью модуля Matplotlib. Также статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты выражали в виде% позитивных клеток. Сравнение отно-

сительного содержания клеток на различных стадиях апоптоза между экспермиетами проводили при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты. В контрольных образцах клеток линии THP-1 относительно содержание живых клеток составляло 96,53±0,46 %. Внесение вещества в финальной концентрации 350 мкг/мл сопровождалось достоверным снижение (p<0,001) относительного содержания жизнеспособных клеток до 91,72±0,44 %. Более того, отмечено достоверное увеличение относительного содержания клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза (3,16±0,19 % против 1,99±0,39 % в контроле, p=0,024), а также погибших клеток (поздний апоптоз/некроз), когда результаты контрольных образов были превышение более чем в 4 раза (5,12±0,28 % и 1,47±0,21 %, соответственно, при p<0,001). Что касается серии экспериментов, в рамках которых вещество применятся в финальной концентрации 70 мкл, то было отмечено достоверное двукратное увеличение (p=0,009) клеток, находящихся на терминальных стадиях апоптоза и в некрозе (2,69±0,29 %). Препарат в финальной концентрации 7 мкг/мл не оказывал достоверное влияние ни на один из исследованных показателей.

Внесение в среду для культивирования камптотецина, индуктора апоптоза, в финальной концентрации 1 мкМ сопровождалось снижением (p<0,001) относительного содержания жизнеспособных клеток до 31,58±1,68 %, а также увеличением относительного содержания клеток на ранних и поздних стадиях апоптоза (до 30,12±1,94 % и 38,30 %, соответственно). Вместе с тем, в присутствие препарата в финальной концентрации 350 мкг/мл уровень жизнеспособных клеток увеличивался (p=0,001) и достигал значений в 45,11±2,17 %. Более того, относительное содержание THP-1, находящихся на ранних стадия апоптоза снижалось до 21,49±2,15 % (p=0,018), а клеток, находящихся на стадии позднего апоптоза и некроза – до 33,40±2,49 % (p=0,165). Внесение препарата в концентрациях 70 и 7 мкл/мл не оказывало достоверного влияния на распределение клеток по фазам апоптоза.

В рамках отдельного эксперимента концентрация камптотецина в клетки была понижена до 0,2 мкМ, что привело к увеличению относительного содержания живых клеток до 47,76±3,17 %, тогда как на ранних и поздних стадиях апоптоза находилось уже 20,75±2,40 % и 31,49±1,31 % клеток, соответственно. Инкубация THP-1 в присутствие камптотецина и препарата в финальной концентрации 350 мкг/мл достоверно не влияла на жизнеспособность клеток (51,11±1,49 %, p=0,367), однако сопровождалась почти двукратным снижением относительного содержания клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза (до 12,86±2,00 при p=0,036). По остальным концентрациям препарата, достоверных изменений жизнеспособности клеток линии THP-1 отмечено не было.

Выводы. В результате проведенных исследований были получены данные о дозозависимом влиянии исследуемого вещества на жизнеспособность и процессы апоптоза клеток в культуре.

Более глубокое изучение механизмов репаративной регенерации ран кожи, в частности роли апоптоза, может способствовать поиску новых подходов к терапии, связанной с воздействием на иммунные механизмы регуляции гибели клеток и оценке эффективности применяемых лекарственных препаратов для профилактики образования рубцов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Regulation of Retinoid Mediated Signaling Involved in Skin Homeostasis by RAR and RXR Agonists / Antagonistsin Mouse Skin / J. Gericke, J. Ittensohn, J. Mihályetal // PLoSOne.– 2013.– V. 8(4).– e62643.
2. Средство для заживления ран "целльгель", способ его получения и способ лечения ран различной этиологии полученным средством / Ю. Г. Суховей, И. Г. Унгер, Е. Г. Костоломова, С. В. Гольцов.– Патент на изобретение RUS 2011141622 от 13.10.2011.
3. Регенераторно-репаративные и антибактериальные свойства препарата «Cellgel» в эксперименте / Ю. Г. Суховей, Е. Г. Костоломова, С. Б. Цирятьева и др. //Российский Иммунологический Журнал.– 2015.– Т. 9(18),№ 2(1).– С. 44-46.
4. Sept4/ARTS Regulates Stem Cell Apoptosis and Skin Regeneration / Y. Fuchs, S. Brown, T. Gorenc et al. // Science.– 2013.– V. 341 (6143).– P. 286-289.
5. Индукция апоптоза и некроза клеток эндотелия пупочной вены человека пероксидом водорода / А. Д. Надеев, И. В. Кудрявцев, М. К. Серебрякова и др. // Цитология.– 2015.– Т. 57. № 12.– С. 909-916.
6. Tallarida R. J. Drug synergism and dose-effect data analysis / R. J. Tallarida.– CRC Press, 2000.– 264 p.
7. Khuri A. I., Mukhopadhyay S. Response surface methodology / A. I. Khuri, S. Mukhopadhyay // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics.– 2010.– Т. 2.– № . 2.– С. 128-149.

THE FUNCTION OF ANTIAPOPTOSIS EFFECT OF HEALING REMEDI OF «CELLGEL»

Kostolomova E. G.[4], Kudryavtsev I. V.[1,2], Sukhovey Y. G.[5], Goltsov S. V.[4], Unger I. G.[5], Serebryakova M. K.[1], Trulev A. V.[1], Terpilovskiy M. A.[3], Goncharov N. V.[3]

[1]FSBSE « The Institute of Experimental Medicine», Saint-Petersburg; [2]SBEEHPE «The First I. P. Pavlov Saint Petersburg State Medicine University», Saint-Petersburg; [3]Ministry of Public Health of the Russian Federation, The I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint-Petersburg; [4]«Neo Clinic», Tyumen; [5]SPA « Tyumencriobank», Tyumen, Russia

A more profound study of work of restorative repair of skin wounds, apoptosis in particular, may contribute to search of new approaches to therapi connected with effects on immune mechanisms which regulate death of cells and efficiency assessment of application of medical preparation for prevention of scar formation.

Keywords: healing wounds «Cellgel», reparative regeneration, apoptosis, flow cytometry.

СПОСОБ ИММУНОДИАГНОСТИКИ РИСКА РЕЦИДИВА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Бухтояров О. В.[1], Самарин Д. М.[2],

[1]НИИ ФСИН России, Москва; [2]МСЧ-39 ФСИН России, Калининград, Россия

Цель настоящей работы заключалась в исследовании степени достоверности предложенного нами способа иммунодиагностики риска рецидива/прогрессии злокачественных опухолей, основанного на оценке состояния специфической противоопухолевой активности иммунной системы у больных различными злокачественными опухолями. В исследовании приняли участие 133 больных с 24 видами злокачественных опухолей (рак молочной железы, яичников, меланома, почки, желудка, прямой кишки, толстой кишки, шейки матки, матки, сигмовидной кишки, мочевого пузыря, лёгких, щитовидной железы, гортани, вульвы, простаты, слизистой ротовой полости, базалиома, мезотелиома, саркома, лимфома, лимфосаркома, острый миелолейкоз, неходжкинская лимфома).Для оценки состояния специфической противоопухолевой активности иммунной системы исследовалась кожная реакция ГЗТ на ОАА линии человеческой меланомы BRO. Установлены высоко достоверные корреляционные связи кожной реакции ГЗТ на ОАА в диапазоне от 0 до 5 мм с наступлением рецидива/прогрессии онкозаболевания ($r=0.83$; $p<0.0001$), что соответствовало 95±3 % вероятности наступления рецидива/прогрессии злокачественного опухолевого заболевания в течение 5.5±3.15 месяцев с момента постановки кожной реакции ГЗТ. Таким образом, предложенный способ иммунодиагностики в определённой мере может помочь своевременно начать проведение противорецидивной терапии злокачественных опухолей.

Ключевые слова: онкобольные, рак, реакция гиперчувствительности замедленного типа, опухолеассоциированные антигены.

Актуальность. Возможность прогнозирования рецидива и прогрессии злокачественного опухолевого процесса после завершения стандартной комбинированной терапии позволила бы повысить эффективность лечения онкозаболеваний. Хорошо известно, что течение злокачественного опухолевого процесса во многом зависит от состояния противоопухолевой активности иммунной системы, оценка которой могла бы стать основой персонифицированной иммунодиагностики риска возникновения рецидива/прогрессии злокачественных опухолей.

Цель работы состоит в исследовании достоверности предлагаемого способа иммунодиа-

агностики риска рецидива/прогрессии злокачественных опухолей, основанного на оценке состояния специфической противоопухолевой активности иммунной системы у больных злокачественными опухолями.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 133 онкобольных (108 женщин и 25 мужчин) с 24 видами злокачественных опухолей, которым завершено стандартное комбинированное лечение онкозаболеваний. Критерии отбора онкобольных: 1) завершение стандартной комбинированной терапии злокачественных опухолей; 2) письменное согласие пациентов. По видам злокачественных опухолей больные распределились следующим образом: рак молочной железы – 45 пациентов (33.8 %), рак яичников – 16 (12 %), меланома – 11 (8.2 %), рак почки – 10 (7.5 %), рак желудка – 7 (5.3 %), рак прямой кишки – 7 (5.3 %), другие виды рака (рак толстой кишки, шейки матки, матки, сигмовидной кишки, мочевого пузыря, лёгких, щитовидной железы, гортани, вульвы, простаты, слизистой ротовой полости, базалиома, мезотелиома, саркома, лимфома, лимфосаркома, острый миелолейкоз, неходжкинская лимфома) – 37 пациентов (27.9 %). Стадии онкопроцесса онкобольных: I стадия – 18 больных (13.5 %), II стадия – 49 больных (36.8 %), III стадия – 37 больных (27.8 %), IV стадия – 29 больных (21.9 %). Возрастные характеристики онкобольных: 30-40 лет – 12 пациентов (9 %), 41-50 лет – 35 пациентов (26.3 %), 51-60 лет – 54 пациента (40.6 %), 61-70 лет – 22 пациента (16.5 %), 71-81 лет – 8 пациентов (6 %), свыше 80 лет – 2 пациента (1.6 %). Средний возраст онкобольных составил 54.3±0.96 лет.

Исследование специфической противоопухолевой активности иммунной системы у больных различными злокачественными опухолями проводилось с помощью кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на опухолеассоциированные антигены (ОАА), в качестве которых использовались лизированные клетки линии человеческой меланомы BRO в количестве 25×10^3 клеток на один тест, что позволяло получать нативную (нестимулированную) реакцию ГЗТ. Оценка результатов кожной реакции ГЗТ проводилась по размерам (наибольший размер) зоны гиперемии кожи в миллиметрах через 12 часов после внутрикожного введения ОАА. Предложенная доза ОАА и время оценки кожной реакции ГЗТ были определены нами в предварительных исследованиях. Ранее также установлено отсутствие вакцинального эффекта и каких-либо побочных реакций иммунодиагностического способа оценки риска рецидива/прогрессии онкозаболевания [1].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью StatsoftSTATISTICA 6.1.487 RussianEnterpriseSingle, где использовались непарный t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни, критерий Шапиро-Уилка, коэффициент корреляции Пирсона. Различия считались достоверными при уровне значимости $p<0.05$.

Результаты. Размер гиперемии кожи у больных злокачественными опухолями (n=133) при проведении кожной реакции ГЗТ, через 12 часов после внутрикожного введения ОАА, находился в диапазоне от 0 до 23 мм. В течение всего периода наблюдения у 97 пациентов (68.4 %) из 133 онкобольных клинико-инструментальными методами верифицированы рецидив или прогрессия злокачественного опухолевого заболевания. В этой группе больных с рецидивом/прогрессией онкозаболевания среднее значение показателя ГЗТ составило 1.9±1.9 мм (среднее ± среднеквадратичное отклонение) при диапазоне значений ГЗТ от 0 до 6 мм (у 43 % пациентов показатель ГЗТ = 0 мм). В группе больных без рецидива/прогрессии онкозаболевания (36 пациентов) среднее значение показателя ГЗТ составило 11.7±4.7 мм при диапазоне значений от 5 мм до 23 мм (у 61 % пациентов ГЗТ >10 мм). Наблюдаемые значения кожной реакции ГЗТ на ОАА в этих группах онкобольных имели высоко достоверные различия ($p<0.0001$). При корреляционном анализе выявлены высоко достоверные связи между показателями кожной реакции ГЗТ на ОАА в диапазоне от 0 до 5 мм с наступлением рецидива/прогрессии онкозаболевания ($r=0.83$; $p<0.0001$). Среднее время до клинико-инструментальной верификации рецидива/прогрессии онкозаболевания с момента постановки кожной реакции ГЗТ на ОАА составило 5.5±3.15 месяцев при диапазоне значений от 1 до 9 месяцев. При значениях кожной реакции ГЗТ на ОАА в пределах от 0 мм до 5 мм, в данных условиях наблюдения, вероятность наступления рецидива/прогрессии злокачественного опухолевого заболевания составила 95±3 %.

Заключение. Предложенный способ иммунодиагностики риска наступления рецидива/прогрессии злокачественного опухолевого

заболевания, показал высокую прогностическую значимость и в перспективе может быть с успехом использован в широкой клинической практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bukhtoyarov O.V., Samarin, D.M. Advances in cancer management. Psychogenic Carcinogenesis / R. Mohan (Ed.).– Rijeka: InTech, 2012.– P. 17-56.

IMMUNODIAGNOSTIC METHOD OF THE RISK OF MALIGNANT TUMORS RECURRENCE

Bukhtoyarov O.V.[1], Samarin D.M.[2]

[1]SRI Federal Penal Service of Russia, Moscow; [2]Medical and Sanitary Unit № 39 of the FPS of Russia, Kaliningrad, Russia

The aim of this research was to study the degree of reliability of our proposed immunodiagnostic method of the risk of cancer recurrence or progression. This method is based on an assessment of the state of specific anti-tumor activity of the immune system in patients with various malignant tumors. The study involved 133 patients with 24 types of cancer (breast, ovarian, melanoma, kidney, stomach, rectum, colon, cervix, uterus, sigmoid colon, bladder, lung, thyroid, larynx, vulva, prostate, oral mucosa, basal cell carcinoma, mesothelioma, sarcoma, lymphoma, lymphosarcoma, acute myelogenous leukemia, and non-Hodgkin's lymphoma). To assess the state of specific anti-tumor activity of the immune system the DTH (delayed-type hypersensitivity) skin reaction on TAA (tumor-associated antigens) of human melanoma cell line BRO studied. It was established a highly significant correlation of DTH skin reaction to the TAA in the range of 0 to 5 mm between the onset of recurrence/progression of cancers ($r = 0.83$; $p < 0.0001$), which corresponded to 95 ± 3% probability of recurrence/progression of malignant tumor diseases in within 5.5 ± 3.15 months from the time of DTH skin reaction. So, the proposed method of immunodiagnostic can assist to promptly initiate preventive treatment of malignant tumors to some extent.

Keywords: cancer patients, cancer, delayed type hypersensitivity reaction, tumor-associated antigens.

ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОСТРОЙ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ КРОВОПОТЕРЕ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДОВ

Зотова Н.В.[1], Бражников А.Ю.[2], Гусев Е.Ю.[1], Зубова Т.Э.[1]

[1]ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН; [2]ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

Охарактеризовали системное воспаление (СВ) при острой патологической кровопотере с позиции общепатологического процесса. При обследовании 39 пациенток с патологической кровопотерей (13 с шоком) выявлено, что развитие СВ носит молниеносный характер и в сочетании с коагулопатией является патогенетической основой прогрессирования критических состояний.

Ключевые слова: системное воспаление, геморрагический шок, острая патологическая кровопотеря.

Острая патологическая кровопотеря (ОПК) в акушерстве, осложненная развитием полиорганной недостаточности (ПОН) и шока [1,2], является одной из основных причин мате-

ринской смертности [3]. Эта патология может являться пусковым фактором для развития системной воспалительной реакции (СВР) и системного воспаления (СВ), являющихся патогенетической основой ПОН. Для оценки выраженности СВР и развития СВ были разработаны шкала УР (Уровень Реактивности) и шкала СВ [4, 5], последняя включает диагностику и частных патологических процессов: 1) системная альтерация (по накоплению в крови маркеров деструкции мышечной ткани); 2) полиорганная дисфункция (шкала SOFA/ Sequential Organ Failure Assessments Score); 3) системное микротромбообразование (по накоплению в крови D-димера); 4) дистресс-реакция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (по уровню кортизола). Таким образом, интегральная шкала СВ предназначена для описания его патогенетического образа. Известны три критичные для жизни пациентов фазы СВ: фазы первичного и вторичного флогогенного удара (гиперэргические) и депрессивная фаза (гиперэргическая) [5]. Острая патологическая кровопотеря, осложнившая течение беременности и родов, в качестве индуктора СВ, практически не изучена.

Цель работы: охарактеризовать развитие системного воспаления при острой патологической кровопотере во время беременности и родов.

Материалы и методы. Обследовали 39 женщин с осложненным течением беременности и родов из отделений реанимации и интенсивной терапии родильных домов г. Екатеринбурга в возрасте 16-41 год (средний возраст 29,1±1,1 года). В плазме крови иммунохемилюминесцентным методом (“Immulite” Siemens Medical Solutions Diagnostics, USA) определяли уровни цитокинов (интерлейкинов (ИЛ)-6, -8, -10, фактора некрозаопухоли альфа (ФНОα)), С-реактивного белка (СРБ), тропонина I, миоглобина, кортизола, D-димеров. Для оценки СВР использовали значения (от 0 до 5 баллов) шкалы УР, рассчитанной на основе концентраций в плазме крови цитокинов и СРБ [4, 5]. Патогенетическое значение уровней СВР следующее: УР-0 – уровень нормы, УР-1 – типичен для СВР при классическом, но не СВ, УР-2 и УР-3 – может быть при классическом воспалении, но и депрессивной фазе СВ (шоковое состояние), УР-4 и УР-5 характеризуют гиперэргические фазы СВ. Развитие СВ оценивалось с помощью шкалы СВ от 0 до 9 баллов [5]. Наличие СВ регистрировали при значениях шкалы СВ≥5 баллов. Синдром ПОН оценивали клиницисты с помощью шкалы SOFA.

Основным критерием включения в исследуемую группу было наличие острой патологической кровопотери более 10-15 % объема циркулирующей крови. Обследовали следующие группы:

1. Группа сравнения – 12 условно здоровых женщин от 18 до 40 лет (28,7 ± 1,8), не имеющих хронических и инфекционных заболеваний, после срочных родов без осложнений с кровопотерей, не превышающей физиологическую (0,5 % массы тела).

Основная группа (n=39) в зависимости от реакции на кровопотерю была разделена на две подгруппы:

2. «Без шока» – пациенты, у которых течение беременности и родов было осложнено кровотечением без развития геморрагического шока и синдрома ПОН (n=13, возраст 16-35 лет, средний возраст 26,8±1,7 года).

3. «Шок» – пациенты, у которых течение беременности и родов было осложнено кровотечением с развитием геморрагического шока у всех (100 %) пациенток и синдрома ПОН – у 23 женщин (88,5 %), (n=26, возраст 19-41 лет (30,3±1,3)). Летальных исходов – 7 случаев (26,9 %).

В контрольную группу вошли 24 практически здоровых женщины-доноры в возрасте от 18 до 49 лет (31,6 ± 1,7).

Статистический анализ проводили с применением программ Statistica 6,0 (Stat Soft, Inc., USA), SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Il, USA) и MedCalc version 7.4.4.1 for Windows (MedCalc Software). Диагностическую эффективность шкал при разделении групп по исходу процесса оценивали по значению площади под ROC-кривыми (AUROC, AreaUndertheReceiver OperatingcharacteristicCurve). Для сравнения частотных распределений в группах применяли критерий χ^2. Уровень статистической значимости соответствовал $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Феномены системного повреждения и ПОН регистрировали только группе с развитием шока в 65,4 % и 100 % случаев, соответственно. Эта группа имеет более высокую частоту критических значений выраженности СВР (УР 4-5 в 34,6 %) в сравнении с группой ОПК без шока (7,7 %). При этом развитие шока и ПОН ассоции-

рованы с СВ у 84,6 % пациенток, а в случаях с летальными исходами (26,9 % этой же группы) – с регистрацией СВ в 100 % случаев. Для развития ОПК без шока характерны умеренные проявления СВР (УР≤ 3 баллов в 92,3 % случаев) и незначительная вероятность развития процесса СВ в целом – 7,7 % (один случай из 13). Диагностическая эффективность шкал при разделении групп по исходу шок/ПОН, была сопоставима: AUROC шкалы СВ составила 0,923/0,868, а шкалы SOFA – 0,922/0,978.

Таким образом, развитие СВ при острой кровопотере с явлениями геморрагического шока характеризуется молниеносностью с преобладанием гиперэргических фаз в первые сутки после инициирующего повреждения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программа фундаментальных исследований РАН, проект № 15-3-4-26.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузник Б.И. ТГС, ДВС или гипер-гипокоагуляционный синдром / Б. И. Кузник // Пробл. клин. мед.– 2009.– № 2.– С. 74-91.
2. Макацария А. Д. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови в акушерской практике / А. Д. Макацария, А. Л. Мищенко, В. О. Бицадзе – М.: Триада-Х, 2002.– 497 с.
3. Шифман Е. М. Интенсивная терапия и анестезия при кровопотере в акушерстве: клинические рекомендации / Е. М. Шифман, А. В. Куликов, С. Р. Беломестнов – М.: Медицина, 2014.– 24 с.
4. Методология изучения системного воспаления / Е. Ю. Гусев, Л. Н. Юрченко, В. А. Черешнев и др. // Цитокины и воспаление.– 2008.– Т. 7, № 1.– С. 15-23.
5. Способ диагностики и прогноза системного воспаления с верификацией фаз и стадий/ Е. Ю. Гусев, Л. Н. Юрченко, В. А. Черешнев, Н. В. Зотова, Ю. А. Копалова.– Патент на изобретение RUS 2335771 от 10.10.08.

CHARACTERICSTIC OF SYSTEMIC INFLAMMATION UNDER ACUTE PATHOLOGICAL BLOOD LOSS

Zotova N. V.[1], Braghnikov A. Yu.[2], Gusev E. Yu.[1], Zubova T. E.[1]

[1]Institute of immunology and physiology of UB RAS; [2]Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

Systemic Inflammation (SI) under an acute pathologic blood loss was characterized from the common pathologic process point of view. In total 39 obstetrics patients with pathological blood loss (13 of them with haemorrhagic shock) were included in the study. SI was defined to develop in the fulminant manner, and in case of associating with a coagulopathy SI became a pathogenic base for critical state progressing in obstetrics patients.

Keywords: systemic inflammation, haemorrhagic shock, acute pathological blood loss.

ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО И ОСТРОФАЗНОГО ОТВЕТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Зотова Н. В., Соломатина Л. В., Зубова Т. Э.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Проведен сравнительный анализ содержания в крови цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНОα) и СРБ у 9 групп больных с различными острыми и хроническими заболеваниями. Разделение групп на острые/хронические нозологии получено по уровням ИЛ-10 и СРБ, а по тяжести состояния пациентов объединенные группы с хронической и острой патологиями дифференцируются по содержанию ИЛ-8 и ФНОα.

Ключевые слова: цитокины, С-реактивный белок, патология.

Развитие системной воспалительной реакции (СВР) и системного воспаления (СВ) при острых септических и асептических (травма, патологическая кровопотеря), а также при хронических заболеваниях общепризнанно [1,2]. Для диагностики СВР и СВ используют более 200 различных медиаторов, в том числе и цитокинов [3]. Однако ни один из показателей не является универсальным. Результаты собственных исследований показали, что развитие острых критических осложнений, таких как полиорганная недостаточность (ПОН) и шок, в большинстве случаев, ассоциированы с развитием СВ. Ключевым проявлением СВ является СВР, которая определяется по накоплению медиаторов воспаления в крови. В ИИФ УрО РАН разработан метод расчета индекса реактивности (ИР) интерлейкинов (ИЛ)-6, 8, 10, ФНОα и СРБ по кратности превышения допустимых значений нормы (ПДЗ) для каждого фактора в крови [4]. Последовательный ряд диапазонов концентраций каждого медиатора в плазме крови, имеющих различную патогенетическую и диагностическую значимость, полуколичественно выражается в значениях ИР от 0 (норма) до 5, а для ИЛ-10 и СРБ – до 6 и до 3, соответственно.

Цель работы: провести сравнительный анализ содержания в крови цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНОα) и СРБ у больных с различными острыми и хроническими заболеваниями.

Материалы и методы. Концентрацию цитокинов (ИЛ-6, -8, -10, ФНОα) и С-реактивного белка в плазме крови исследовали иммунохемилюминесцентным методом («Immulite», Siemens Medical Solutions Diagnostics, USA). Последовательный ряд дозовых диапазонов каждого медиатора выражали в значениях ИР [4]. В исследование были включены следующие группы пациентов с острыми септическими (наличие инфекции и признаков синдрома СВР), асептическими и хроническими заболеваниями:

1. Острый сепсис, 1-2 сутки госпитализации. Исходные заболевания: тяжелые пневмонии, перитониты, акушерский сепсис и другие причины. Часть пациентов имели дисфункции только по 1 органной системе, но не признаки ПОН, n=31, средний возраст – 41,1±18,0 лет;

2. Сепсис с ПОН, также на 1-2 сутки госпитализации, n=46, ср. возраст – 50,1±16,6 лет;

3. Септический шок (СШ, наличие гипотензии, не купируемой вазопрессорами), n=14, ср. возраст – 54,9±16,4 года;

4. Острые множественны травмы, 1-2 сутки госпитализации в отделение реанимации и интенсивной терапии, без развития ПОН (n=37, ср. возраст – 40,4±14,3 лет);

5. Тоже, но с развитием ПОН на 1-3 сутки от момента госпитализации, n=38, ср. возраст – 35,0±13,3 лет;

6. Терминальная почечная недостаточность (ТПН) – n=42, ср. возраст – 45,4±13,0 лет. Пациенты находились на заместительной почечной терапии программным гемодиализом (12 ч/нед).

7. Ревматоидный артрит (РА) – n=26, возраст (M±m) – 54,8±14,0 лет;

8. Системная красная волчанка (СКВ), во всех случаях многолетний анамнез заболевания – n=49, возраст – 43,6±13,2 лет;

9. Хроническая дисфункция почечного аллотрансплантата (ХДТ) – пациенты после аллотрансплантации почки, сроком более 6 месяцев, с признаками дисфункции трансплантата – n=23, возраст – 42,0±9,4 лет;

В контрольную группу (К) вошли практически здоровые люди – доноры крови в возрасте 18-55 лет (34,1±10,4), n=50. Синдром ПОН оценивали клиницисты с помощью шкалы SOFA / SequentialOrganFailureAssessmentsScore.

Статистический анализ проводили с применением программ Statistica 6,0 (Stat Soft, Inc., USA). Уровень статистической значимости соответствовал $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ межгрупповых отличий непараметрическими методами (медианный тест и Н-тест по Краскелу-Уоллису) показал статистически значимые отличия между группами по всем исследуемым медиаторам, однако эти методы не дают представления о направлении различий, что решается с помощью параметрических методов. Использование тестов Ньюмана-Кейлса и Дункана позволил выделить несколько кластеров, объединяющих группы, значимо не отличающиеся по каждому медиатору. А именно, по ИР-ИЛ-6 два кластера групп: «Сепсис/ Сепсис+ПОН/ Травма+ПОН» (средние значения ИР в кластере (min-max) 3,3-3,5) и «СКВ/ Травма» (2,4-2,7); по ИР-ИЛ-8 три кластера: «Сепсис/ Травма/ ХДТ/ РА» (0,7-1,3), «Сепсис+ ПОН/ Травма+ПОН/ ТПН» (2,0-2,4) и «СКВ/ СШ» (3,35); по ИР-ИЛ-10: «Сепсис+ПОН/ Травма» (2,5-2,7), «Травма+ПОН/ СШ» (3,6-4,0),

«ТПН/ СКВ/ ХДТ/ РА/ К» (0-0,7); по ИР-ФНОα: «Сепсис/ Травма/ Травма + ПОН/ РА» (0,7-1,3), «Сепсис+ПОН/ХДТ»(1,9ч2,0),«СШ/ТПН/СКВ» (2,6ч2,8), по ИР-СРБ: «Сепсис/ Сепсис+ПОН/ СШ» (2,4-2,7), «Травма/ Травма+ПОН» (1,4-1,5) и «ТПН/ СКВ/ ХДТ/ К» (0-0,3).

Уровни ИЛ-8 и ФНОα позволили разделить все группы по тяжести состояния пациентов и объединить в кластеры хроническую и острую патологию. Содержание в крови ИЛ-10 позволяет, наоборот, выделить в отдельный кластер группы хронических нозологий (уровень нормальных значений), что свидетельствует о сдерживающей роли этого цитокина от резких повышений других провоспалительных медиаторов при острых состояниях. Разделение острые/хронические нозологии получено и по уровню СРБ, за исключением «РА», который отличается от всех групп, что может свидетельствовать как о роли этого белка в патогенезе РА, так и значимости в качестве маркера оценки адекватности проводимой терапии. Сопоставимые с группой «СШ» уровни цитокинов (кроме ИЛ-10) при СКВ подтверждают тяжесть состояния пациентов и активность адаптивных к таким высоким концентрациям медиаторов механизмов.

Таким образом, ни один из изученных показателей не может быть использован в качестве универсального критерия оценки тяжести состояния и прогноза течения заболевания. Для решения этих задач необходимы интегральные критерии, на основе использования нескольких показателей СВР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программа фундаментальных исследований РАН, проект № 15-3-4-26.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусев Е. Ю. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 1. Общая характеристика процесса / Е. Ю. Гусев, В. А. Черешнев // Патол. физиол. и эксп. терапия.– 2012.– № 4.– С. 3-14.
2. Low-gradeinflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation / A. M. Minihane, S. Vinoy, W. R. Russell et al. // Br. J. Nutr.– 2015.– V. 114(7), No14.– P. 999-1012.
3. Pierrakos C., Vincent J.-L. Sepsis biomarkers: a review / C. Pierrakos, J.-L. Vincent // Crit Care.– 2010.– No. 14(1).– R15.
4. Методология изучения системного воспаления / Е. Ю. Гусев, Л. Н. Юрченко, В. А. Черешнев и др. // Цитокины и воспаление.– 2008.– Т. 7, № 1.– С. 15-23.

CYTOKINES AND ACUTE-PHASE RESPONSE UNDER ACUTE AND CHRONIC DISEASES

Zotova N. V., Solomatina L. V., Zubova T. E.

Institute of immunology and physiology of UB RAS, Yekaterinburg, Russia

A comparative analysis of cytokines rates (Il-6, Il-8, Il-10, TNFα) and CRP level in 9 groups of patients with acute and chronic diseases was carried out. All groups were differentiated to chronic/ acute nosologies by Il-10 and CRP rates, as well as groups were divided in combined (chronic and acute pathology) clusters under severity of condition by Il-8 and TNFα.

Keywords: cytokines, C-reactive protein, pathology.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К МЕТАБОЛИЧЕСКОМУ СИНДРОМУ И РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ

Якушева М. Ю.[1], Якушев А. М.[2]

[1]Институт иммунологии и физиологии УрО РАН;
[2]Уральская государственная медицинская академия,
Екатеринбург, Россия

Изучена предрасположенность к метаболическому синдрому. Исследование особенностей дерматоглифики при сахарном диабете 2 типа и метаболическом синдроме позволило выделить дерматоглифический морфогенотип МС. Найдены достоверные корреляции между лабораторными параметрами МС и некоторыми дерматоглифическими признаками. Изучение взаимосвязи дерматоглифических и лабораторных параметров МС позволило обосновать применение выделенного морфогенотипа для диагностики индивидуальной предрасположенности.

Ключевые слова: метаболический синдром, дерматоглифика, факторы риска.

Метаболический синдром (МС) по определению ВОЗ – это пандемия 21 века с широкой распространенностью 20-42 %, высоким риском развития артериальной гипертензии, коронарной болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, и увеличением смертности. МС это комплекс регуляторно-метаболических нарушений, под влиянием средовых и биологических факторов приводящих к инсулинорезистентности, абдоминально-висцеральному ожирению, и системным висцеральным поражениям, проявляющимся еще на нормогликемической стадии МС. Анализ научной литературы по изучаемой теме показал, что дерматоглифика у пациентов с МС имеет свои ярко выраженные особенности [1, 2, 3], что позволяет использовать метод медицинской дерматоглифики для оценки предрасположенности к МС и разработки методов превентивной его диагностики.

Цель – изучение взаимосвязи дерматоглифических и лабораторных параметров МС для разработки метода диагностики индивидуальной предрасположенности к МС.

Обследованы 63 пациента городского эндокринологического центра, в возрасте от 39 до 65 лет, 23 мужчины и 40 женщин, болеющих сахарным диабетом 2 типа, рассматриваемым как финальная стадия МС, в течение 5-10 лет, находящихся в стадии компенсации и субкомпенсации по углеводному и липидному обмену. Все обследованные имели сохранную эндо- и экзокринную функцию поджелудочной железы. Из историй болезни пациентов были взяты следующие лабораторные данные: Гл – глюкоза, HbA1c – гликозилированный гемоглобин, Тг – триглицериды, ОХс – общий холестерин и его фракции – Хс ЛПНП, Хс ЛПВП, а также ИРИ – иммунореактивный инсулин и показатель инсулинорезистентности – HOMA-IR, С-пептид, Дерматоглифическая картина была получена с помощью дактилоскопических сканнеров «ДС-16» и «ДС-22», разработанных ЗАО «Папиллон» г. Миасс, Россия, с последующей расшифровкой по разработанной нами программе Дерматоглифика с использованием Международной дерматоглифической классификации [4, 5]. Всего оценивали 61 дерматоглифический параметр, отражающий пальцевые (гребневой счет и тип узора на каждом пальце) и ладонные узоры (ладонный гребневой счет, наличие и расположение ладонных и осевых трирадиусов, направление главных ладонных линий A, B, C и D, величина угла atd, характер рисунков на тенаре и гипотенаре и в межпальцевых полях). Затем были изучены корреляционные связи каждого из 61 элементов дерматоглифи-

ческой картины с каждым из лабораторных параметров МС. Верификация диагностически значимой совокупности элементов дерматоглифической картины, тесно связанной с лабораторными параметрами МС, осуществлена с использованием метода канонической корреляции (SPSS, версия 13). Верифицированная методом канонической корреляции совокупность элементов дерматоглифической картины, названная нами «метаболическим морфогенотипом», характеризовалась высокой достоверностью связей (значения канонических корней 0,86-0,97; p = 0,0012-0,00001).

Результаты. На первом этапе исследования были установлены дерматоглифические признаки, тесно связанные с таким показателем, как гипергликемия натощак – характер рисунка в зоне между 3 и 4 пальцем ПР и тип расположения ладонных линий ЛР (p=0,017 и p=0,04), величина гребневого счета на 3 пальце ПР, величина суммарного гребневого счета на всех пальцах правой руки и левой руки, общий гребневой счет на всех пальцах ПР (p=0,031; p=0,04 и 0,046 соответственно). Снижение уровня ЛПВП коррелирует с положением осевого трирадиуса t ПР и окончанием ГЛЛ D ПР (p=0,042 и p=0,026). Положение осевого трирадиуса tПР достоверно ассоциировалось с повышенным HbA1c (p=0,047); характер рисунка на 5 пальце ПР – с ЛПНП (p=0,008); характер рисунка на гипотенаре ПР – с ТГ (p=0,036). Установленные корреляционные связи указывают на наличие дерматоглифической картины, характерной для метаболических нарушений, происходящих у пациентов с СД 2 типа.

На втором этапе исследования проводилось сравнение лабораторных показателей МС с различными значениями дерматоглифических признаков. Учитывали дискретность дерматоглифических признаков, когда каждый признак может принимать одно из нескольких значений. Установлены достоверно большие значения С-пептида у пациентов с окончанием ГЛЛ DПР в поле 7 (p=0,003), окончанием ГЛЛ С ПР в поле 5 и 7 (p=0,002 и p=0,004), окончанием ГЛЛ В в поле 5 (p=0,003), а так же окончанием ГЛЛ D ЛР в поле 7 и окончанием ГЛЛ В ЛР в поле 5 (p=0,004 и p=0,003). Уровень гликозилированного гемоглобина был достоверно выше при промежуточном t^1 и боковом t^1б положении осевого трирадиуса t правой руки и ладонном гребневом счете cd ЛР более 38 уровень (p=0,047). Повышенный уровень ТГ ассоциируется с наличием любого рисунка на гипотенаре правой руки(p=0,004). Повышенный уровень ЛПНП тесно связан с наличием ульнарной петли на 1 пальце правой руки (p=0,038). Снижение уровня ЛПВП более выражено у пациентов с промежуточным t^1 и боковым t^1б положением осевого трирадиуса t правой руки и окончанием главной ладонной линии D в поле 7 (p=0,004 и p=0,002). Гипергликемия натощак тесно ассоциируется с I типом расположения ладонных линий ЛР, отсутствием рисунка и наличием петли с дополнительным трирадиусом (D) в зоне между 3 и 4 пальцами ПР (p=0,002 и p=0,003). Выявленные закономерности в распределении дерматоглифических параметров подтвердили обоснованность выделенного нами метаболического морфогенотипа.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований показали наличие достоверных корреляций между лабораторными параметрами МС и некоторыми дерматоглифическими признаками, свидетельствующих о существовании адаптофенотипа предрасположенности к развитию МС. Выявленный дерматоглифический адаптофенотип использован при разработке метода диагностики индивидуальной предрасположенности к развитию МС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seema M.A., Gandhi D., Singh M. Dermatoglyphics – Study and Review of literature / M. A. Seema, D. Gandhi, M. Singh // Novel Science International Journal of Medical Science.– 2012.– T.1, N.6.– P. 191-198.
2. Kahn H. S., Ravindranath R., Valdes R. Fingerprint Ridge-Count Difference between Adjacent Fingertips (dR 45) Predicts Upper-Body Tissue Distribution-Evidens for Early Gestational Programing / H. S. Kahn, R. Ravindranath, R. Valdes // American Journal of Epidemiology.– 2003.– V. 153, N. 4.– P. 338-344.
3. Ţarcă A. Dermatoglyphics in diabetes mellitus of type 2 (T2DM) or non-insulindependent / A. Tarca // Journal of preventive medicine.– 2006.– T.14, N.1-2.– P. 60-70.
4. Cummins H. Finger prints, palm and soles. An introduction to dermatoglyphics / H. Cummins, Ch. Midlo.– Philadelphia.– 1943, 1961. Dover Publications Inc.– 307 p.
5. Penrose L. S. Memorandum on Dermatoglyphic Nomenclature / L. S. Penrose // Birth Defects: Orig. Art.Ser.– 1968.– V.4, N 3.– P. 1-13.

STUDYING PREDISPOSITION TO METABOLIC SYNDROME AND THE DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC METHODS

Yakusheva M.[1], Yakushev A.[2]

[1]Institute of Immunology and Physiology, Ural branch of Russian Academy of Science;
[2]Ural state medical university, Ekaterinburg, Russia

Studying predisposition to metabolic disorders helps to prevent the disease. Studying dermatoglyphic peculiarities of type 2 diabetes and metabolic syndrome helped us to distinguish morpfologic and genetic type of metabolic syndrome. Significant correlations between laboratory parameters of metabolic syndrome and some dermatoglyphic patterns were found out. Studying these correlations allowed us to use morpfologic and genetic type distinguished to diagnose individual predisposition to metabolic syndrome.

Keywords: metabolic syndrome, dermatoglyphic, risk factors.

РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ПЕЧЕНИ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

Блинкова Н. Б.[1,2], Данилова И. Г.[1,2], Гетте И. Ф.[1,2], Смирных С. Е.[1,2], Пьянкова З. А.[1], Булавинцева Т. С.[1,2]

[1]ФГАОУ ВПО Уральский федеральный университет; [2]ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия

На модели аллоксанового диабета у крыс изучали реакцию тучных клеток на повреждение печени. Структурные нарушения и угнетение регенераторных процессов в печени в условиях хронической гипергликемии сопровождались усилением миграции тучных клеток в портальную строму и их дегрануляцией.

Ключевые слова: тучные клетки, аллоксановый диабет, печень.

Сахарный диабет (СД) характеризуется системными метаболическими нарушениями, деструктивными процессами в различных органах. Изменение морфо-функционального состояния печени – инсулинзависимого органа, регулирующего основные виды обмена, участвующего в поддержании углеводного гомеостаза и в инактивации инсулина, приобретает особое значение при СД. Известно, что в регуляции восстановительных процессов при повреждении печени участвуют клеточные элементы соединительной ткани, в частности, тучные клетки (мастоциты). Доказано, что мастоциты являются биологическими регуляторами, поскольку могут синтезировать цитокины, молекулы адгезии, гликозаминогликаны, участвуют во всех фазах воспаления, регулируют репаративные процессы в различных органах [1]. При экспериментальном СД в коже, жировой ткани, слизистой оболочке и железах полости рта описана реакция тучных клеток, которая проявляется увеличением их численности [2, 3] или носит непостоянный характер, изменяясь в разные сроки эксперимента [4]. В современной научной литературе нам не встретилось исследований, посвященных оценке влияния тучных клеток на морфофункциональное состояние печени при СД.

Цель работы: оценить реакцию тучных клеток на повреждение печени при экспериментальном СД у крыс.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 15 крысах-самцах породы Wistar массой 210±5,6 г. СД 1 типа моделировали вве-

дением аллоксана по ранее разработанной методике [5]. Животных разделили на 3 группы: интактные (n=5), СД 30 суток (n=5), СД 60 суток (n=5). Биохимические показатели определяли с использованием стандартных наборов реактивов Витал-диагностикс СПб, ФОС-ФОСОРБ и полуавтоматического фотометра «Cormay Plus». Содержание инсулина в крови определяли методом иммуноферментного анализа (Rat/Mouse Insulin ELISA; Millipore). Выполняли гистологическое исследование образцов печени крыс на срезах толщиной 3-5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Тучные клетки в печени окрашивали толуидиновым синим, накопление секрета к цитоплазме оценивали по оптической плотности (ОП) в условных единицах (у.е). Проводили ИГХ исследование маркера пролиферации Ki67 (anti-human Ki-67 clone B 56; BD, США). Морфометрическое исследование выполнено с помощью программы анализа изображений ВидеоТест Морфология 5.2., подсчитывали количество двуядерных и полиплоидных гепатоцитов, Ki67-позитивных гепатоцитов при увеличении микроскопа х400 и тучных клеток при увеличении ×1000 в 20 полях зрения каждого образца с пересчетом на 1мм^2. Для статистического анализа непараметрических выборок использовали Mann-Whitney U-test с помощью программного обеспечения BioStat Pro 5.9.8.

Основные результаты. Результаты биохимического исследования периферической крови крыс подтвердили формирование аллоксанового диабета. Через 30 суток после введения аллоксана зафиксировано повышение уровня глюкозы (25,98±1,84 ммоль/л; p<0,05) и гликозилированного гемоглобина (7,10±0,60 %; p<0,05), по сравнению с интактными крысами (5,9±0,3 ммоль/л и 5,1±0,2 %, соответственно) иснижение концентрации инсулина в 2,5 раза. Повышение уровня АлАТ (26,2±3,2 мкмоль/л·мин; p<0,05) и АсАТ (16,8±1,0 мкмоль/л·мин; p<0,05) по сравнению с интактными крысами (6,0±0,9 и 10,8±1,0, соответственно) указывало на цитолиз гепатоцитов. На 60 сутки СД на фоне нарастающей гипергликемии достоверно снижался уровень АсАТ (13,1±0,8 мкмоль/л·мин; p<0,05) по сравнению с показателем при СД 30 суток.

При морфологическом исследовании печени крыс с СД 30 суток обнаружены очаговые дистрофические изменения гепатоцитов, лейкоцитарная инфильтрация портальной стромы, отек и расстройства кровообращения. Деструктивные изменения паренхимы печени нарастали при пролонгировании гипергликемии до 60 суток. На этом фоне снижалась численность Ki67-позитивных гепатоцитов на 30-е (492,12±17,2; p<0,05) и 60-е (384,24±11,15; p<0,05) по сравнению в интактными животными (732,81±17,09). На 60 сутки СД значительно уменьшалось количество двуядерных (49,34±3,69; p<0,001) и полиплоидных гепатоцитов (69,16±2,24; p<0,001) по сравнению с интактными крысами(134,91±2,89 и 297,37±15,76, соответственно).

Тучные клетки в печени локализовались преимущественно в портальных трактах, периваскулярно. Реакция тучных клеток на повреждение печени характеризовалась повышением их численности на 30-е (86,5±9,25; p<0,001) и 60-е (72,6±8,62; p<0,05) сутки СД по сравнению с интактными крысами (40,4±6,77). Наряду с количественной характеристикой изменялось накопление секрета в цитоплазме тучных клеток. Так, на 30 сутки ОП тучных клеток существенно снижалась (0,19±0,018; p<0,05), по сравнению с интактными крысами (0,27±0,04), указывая на активацию секреции и дегрануляцию мастоцитов в ответ на повреждение. Показатель ОП тучных клеток на 60 сутки СД существенно выше, чем на 30 сутки (0,27±0,02 у.е; p<0,05), что свидетельствовало о восстановлении секреторной функции мастоцитов до уровня интактных животных.

Таким образом, в печени крыс с аллоксановым диабетом прогрессирующее повреждение и угнетение регенерации сопровождается миграцией тучных клеток в портальную строму с развитием дегрануляции и последующим восстановлением секреторной функции. Использование агентов, стабилизирующих миграцию тучных клеток в печень, может способствовать уменьшению альтерации и стимуляции регенерации, являясь теоретическим обоснованием для направленной коррекции метаболических и структурных нарушений при СД.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ, № проекта 16-15-00039.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юшков Б. Г. Тучные клетки: физиология и патофизиология / Б. Г. Юшков, В. А. Черешнев, В. Г. Климин и др.– М.: Медицина, 2011.– 240 с.

2. Kispély, B., Altdorfer, K., Fehér, E. Changes of the innervation in the mucous membrane and glands of the tongue in diabetes mellitus / B. Kispély, K. Altdorfer, E. Fehér // Fogorvosi szemle.– 2015.– V. 108, № .1.– P. 19-24.
3. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice / J. Liu, A. Divoux, J. Sun et al. // Nature medicine.– 2009.– V. 15, № .8.– P. 940-945.
4. Григорьева, М.В., Божко, Н.П., Либо, Ю.М. Функциональная морфология соединительной ткани при экспериментальном сахарном диабете / М.В. Григорьева, Н.П. Божко, Ю.М. Либо // Морфология.– 2006.– № 4.– С. 40-41.
5. Метод моделирования аллоксанового диабета / И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте, Т.С. Булавинцева.– Патент на изобретение RUS 253441 от 27.11.14.

REACTION OF MAST CELLS TO LIVER ALTERATION IN ALLOXAN DIABETES IN RATS

Blinkova N.B.[1,2], Danilova I.G.[1,2], Gette I.F.[1,2], Smirnikh S.E.[1,2], Pyankova Z.A.[1], Bulavintseva T.S.[1,2]

[1]Ural Federal University; [2]Institute of Immunology and physiology UB RAS, Yekaterinburg, Russia

The reaction of mast cells to liver alteration was studied on the model of alloxan diabetes in rats. Structural violations and oppression of regenerative processes in the liver in a chronic hyperglycemia accompanied by increased migration of mast cells in the portal stroma and their degranulation.

Keywords: mast cells, alloxan diabetes, liver.

ПРЕИМУЩЕСТВЕННОЕ ВЫЖИВАНИЕ NKG2C-ПОЗИТИВНЫХ КЛОНОВ NK-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПО СРАВНЕНИЮ С NKG2C- НЕГАТИВНЫМИ

Стрельцова М.А., Бойко А.А., Коваленко Е.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

В работе представлены данные по изучению продолжительности жизни клонов NK-клеток, полученных из субпопуляций NKG2C$^-$ и NKG2C$^+$. Было выявлено, что клоны из популяции NKG2C$^+$ имеют больший пролиферативный потенциал и лучше выживают, по сравнению с клонами NKG2C-негативных NK-клеток. NKG2C-позитивные клоны демонстрировали низкий уровень экспрессии маркера конечной дифференцировки CD57.

Ключевые слова: NK-клетки, клоны, рецептор NKG2C.

Введение. Натуральные киллеры (NK-клетки) известны как лимфоциты, способные уничтожать опухолевые и инфицированные вирусами клетки без предварительной активации антигеном. Выделяют две основные популяции NK-клеток, различные по функциям и поверхностным рецепторам. Клетки с фенотипом CD56^{bright}CD16$^{-/dim}$ являются активными продуцентами IFNγ и других цитокинов, но проявляют слабую цитотоксичность по отношению к клеткам-мишеням, в то время как CD56^{dim}CD16$^+$-клетки обладают выраженной цитотоксической активностью и относительно слабо продуцируют цитокины. Часть CD56dim-клеток экспрессирует маркер конечной дифференцировки CD57.

На NK-клетках экспрессируется лектин-подобные рецепторы NKG2A и NKG2C, которые обладают ингибирующими и активирующими свойствами, соответственно. Оба

рецептора, NKG2A и NKG2C, экспрессируются в виде гетеродимеров с CD94 и узнают неклассические молекулы HLA-E, при этом NKG2A/CD94 связывается с HLA-E с более высокой аффинностью, чем NKG2C/CD94. HLA-E экспрессируется на здоровых клетках и, как правило, не вызывает активации NK-клеток. Однако, предполагается, что изменения в пептидном репертуаре HLA-E при цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции могут вызвать специфическую активацию NK-клеток NKG2C$^+$ [4]. Недавно была обнаружена уникальная популяция NK-клеток, высоко экспрессирующих рецептор NKG2C у серопозитивных по ЦМВ людей, которая способна к реактивации при трансплантации гематопоэтических клеток. Данные клетки являются высокопролиферирующими и проявляют высокий цитолитический потенциал против опухолевых клеток [2]. Поэтому, они представляют интерес для адоптивной противоопухолевой терапии.

Целью данной работы было изучение у здоровых доноров отличий в пролиферации и выживании NK-клеток NKG2C$^-$ и NKG2C$^+$ на клональном уровне и выявление фенотипических особенностей клонов.

Материалы и методы. Для получения клонов NK-клеток выделяли периферические мононуклеары здоровых добровольцев. NK-клетки выделяли с помощью метода магнитной сепарации на колонках фирмы MiltenyiBiotec. Клоны NK-клеток получали путем клеточной сортировки единичных клеток различных субпопуляций в лунки 96-луночного планшета на клеточном сортировщике FACSVantageDiVa (BectonDickinson). Для индукции роста клонов использовали IL-2 (100 ед./мл) и предварительно облученные (100 Гр) модифицированные фидерные клетки K562-mbIL21 (любезно предоставлены доктором DeanLee, университет Техаса, Хьюстон, США), в концентрации 2 тыс./лунку [1]. Через 3, 4, 5, 6, и 8 недель в культурах клонов проводили частичную замену среды. В процессе анализа фенотипа клонов измеряли экспрессию CD56, CD57, NKG2C, NKG2A методом иммунофлуоресценции с помощью проточной цитометрии.

Результаты и обсуждение. Были получены клоны из следующих популяций NK-клеток: CD56$^+$CD57$^-$NKG2C$^-$, CD56$^+$CD57$^-$NKG2C$^+$, CD56$^+$CD57$^+$NKG2C$^-$, CD56+CD57$^+$NKG2C$^+$. Частота образования клонов из субпопуляции CD56$^+$CD57$^-$NKG2C$^+$ через 3 недели составила 53 %, в остальных популяциях – от 9 до 18 %. Количество клонов NK-клеток из популяции CD56$^+$CD57$^-$NKG2C$^-$ на 4-й неделе увеличилось с 18 % до 45 %, однако 94 % этих клонов погибли к 7-й неделе, продемонстрировав более низкую выживаемость по сравнению с клонами NK-клеток из субпопуляции CD56$^+$CD57$^-$NKG2C$^+$, в которой к 7-й неделе выжило около 50 % всех полученных клонов. Частота получения клонов NK-клеток из субпопуляций CD56$^+$CD57$^+$NKG2C$^-$ и CD56$^+$CD57$^+$NKG2C$^+$ составила 13 % и 9 %, соответственно. В процессе культивирования было обнаружено, что к 5-й неделе все клоны из популяции CD56$^+$CD57$^+$NKG2C$^+$ активно пролиферировали, что регистрировалось по увеличению числа клеток в лунках. Клоны клеток с начальным фенотипом CD56$^+$CD57$^+$NKG2C$^-$ имели наиболее низкий уровень пролиферации среди исследованных субпопуляций, и уже к 5-й неделе доля погибших клонов составляла 56 % от ранее полученных.

При проведении фенотипического анализа клонов было выявлено, что часть протестированных клонов из субпопуляции CD56$^+$CD57$^-$NKG2C$^+$ утрачивала экспрессию NKG2C, имело пониженный уровень экспрессии NKG2A, и только 15-27 % клеток в клонах несли на себе маркер конечной дифференцировки CD57. Все клоны NK-клеток из субпопуляции CD56$^+$CD57$^-$NKG2C$^-$ были высоко позитивны по NKG2A. Также они были позитивны по CD57, что коррелировало с их низкой продолжительностью жизни. Часть клонов из субпопуляции CD56$^+$CD57$^+$NKG2C$^+$ утратило экспрессию рецептора NKG2C. Однако, такие клоны демонстрировали высокий уровень экспрессии CD57 в течение всего периода наблюдения и низкий пролиферативный потенциал, тогда как клоны из этой популяции, которые сохранили экспрессию NKG2C, были CD57-негативны. В то же время, в условиях стимуляции IL-2 и модифицированными фидерными клетками экспрессия рецептора NKG2C могла появляться на клонах, полученных из NKG2C-негативных NK-клеток.

Заключение. Таким образом, наибольшая частота получения клонов NK-клеток зарегистрирована в субпопуляции CD57$^-$NKG2C$^+$. Клоны, полученные из NKG2C-позитивных NK-клеток, имели больший пролиферативный потенциал, по сравнению с изначально NKG2C-негативными клонами. Клоны из

NKG2C-позитивных клеток также обладали низким уровнем экспрессии маркера терминальной дифференцировки CD57, однако в процессе культивирования могли утрачивать экспрессию NKG2C.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-01842).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новые возможности получения клонов NK-клеток человека с использованием модифицированных фидерных клеток / М. А. Стрельцова, С. А. Ерохина, Л. М. Каневский и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9 (18) № 3.– С. 218-220.
2. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C^{+} natural killer cells with potent function / B. Foley, S. Cooley, M. R. Verneris et al. // Blood.– 2011.– V. 119 (11).– P. 2665-2674.
3. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire / M. Gumá, A. Angudim, C. Vilches et al. // Blood.– 2004.– V. 104 – P. 3664-3671.
4. NKG2C^{bright}CD57^{+} NK cells respond specifically to acute infection with cytomegadimvirus and not epstein-barrvirus / D. W. Hendricks, Jr H. H. Balfour, S. K. Dunmire et al. // Cutting Edge: The Journal of Immunology.– 2014.– V.192 (10) – P. 4492-4496.
5. Lanier, L.L. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity / L. L. Lanier // Immunol. Rev.– 2009.– V. 227 – P. 150-160.

PREFERENTIAL SURVIVAL OF NKG2C-POSITIVE NK-CELL CLONES COMPARED TO NKG2C-NEGATIVE CLONES

Streltsova M. A., Boyko A. A., Kovalenko E. I.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

This work presents the results of the study of lifetime of NK-cell clones derived from NKG2C^{-} and NKG2C^{+} subpopulations. NK-cell clones from NKG2C^{+} population had a higher proliferative potential and survived better in comparison with the clones derived from originally NKG2C^{-} NK cells. NKG2C-positive NK-cell clones demonstrated low expression of terminal differentiation marker CD57.

Keywords: NK cells, clones, receptor NKG2C.

ПЕПТИДЫ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА МОДУЛИРУЮТ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Жаркова М. С.[1], Артамонов А. Ю.[1], Гринчук Т. М.[2], Буцкина Е. А.[1], Пазина Т. Ю.[1], Орлов Д. С.[1,3], Шамова О. В.[1,3]

[1]ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; [2]ФГБУН Институт цитологии РАН; [3]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Изучено совместное цитотоксическое действие антимикробных пептидов врожденного иммунитета (кателицидин человека LL-37, протегрин 1 (PG1), бактенецин ChBac3.4) и противоопухолевых антибиотиков доксорубицина и актиномицина D *in vitro* в отношении клеток эритромиелолейкоза человека К562, аденокарциномы легких человека А-549, асцитной карциномы Эрлиха мыши, а также линии клеток К-562 с выработанной устойчивостью к доксорубицину. Синергические эффекты совместного цитотоксического действия выявлены при применении комбинаций доксорубицина и PG1 в отношении клеток К562 (в том числе доксорубицин-устойчивой линии) и асцитной карциномы Эрлиха мыши, а также актиномицина и PG1 для клеток К562.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, антимикробные пептиды.

Система врожденного иммунитета обеспечивает быстрое реагирование живых организмов на вторжение инфекционных агентов, а также участвует в обеспечении широкого спектра других защитных механизмов, направленных на поддержание гомеостаза. В функционировании этой системы участвуют разнообразные регуляторные и эффекторные молекулы. Некоторые такие соединения представляют интерес и с точки зрения практического применения как прототипы новых терапевтических препаратов. Одними из наиболее перспективных в этом отношении природных соединений являются антимикробные пептиды (АМП), содержащиеся преимущественно в фагоцитирующих клетках и обладающие высокой антибактериальной активностью. Известно, что ряд АМП проявляет синергическое антимикробное действие с конвенциальными антибиотиками. Некоторые АМП, кроме микробоцидных эффектов, демонстрируют и цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток, в том числе и клеток с множественной лекарственной устойчивостью [1]. Поиск соединений, эффективных в борьбе с онкологическими заболеваниями, при которых имеет место множественная лекарственная устойчивость опухолей, а также соединений, повышающих эффективность применяемых в медицине противоопухолевых препаратов, является актуальной проблемой современных биомедицинских исследований.

Целью представленной работы явилось изучение цитотоксического действия АМП семейства кателицидинов на опухолевые клетки, а также эффектов сочетанного применения пептидов с доксорубицином и актиномицином D *in vitro*.

Методы. Оценка цитотоксической активности исследуемых соединений и их комбинаций *in vitro* проводилась с применением МТТ-теста [2], как детально описано [3], в отношении клеток эритромиелоидного лейкоза человека К562, аденокарциномы легких человека А549, асцитной карциномы Эрлиха мыши, а также линии клеток К562 с выработанной устойчивостью к доксорубицину. Для определения медианной ингибирующей концентрации пептидов (ИК50) использовали программу Prism 5 (GraphPad Software Inc., США). При оценке характера совместного действия АМП и доксорубицина или актиномицина D определяли

минимальные эффективные концентрации (МЭК) препаратов – наименьшие концентрации, для которых наблюдалось статистически значимое отличие от контроля – интактных клеток (без добавления антибиотиков). Достоверность различий между группами оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни при уровне значимости $p \leq 0.05$, статистическую обработку данных проводили в программе Prism 5. На основе расчета индекса фракционной эффективной концентрации (иФЭК = $ФЭК_1/МЭК_1 + ФЭК_2/МЭК_2$) оценивали характер совместного действия: при иФЭК≤0,5 – синергизм, 0,5<иФЭК≤1 – аддитивность, 1<иФЭК≤2 – независимое действие, иФЭК>2 – антагонизм.

Результаты исследований. Объектами исследования явились АМП различной структуры: альфа-спиральный кателицидин человека LL-37, протегрин 1 (PG1), имеющий конформацию бета-шпильки, и пролин-богатый линейный бактенецин ChBac3.4 [4]. Показано, что изучаемые АМП обладают цитотоксической активностью в отношении использованных клеточных линий: $ИК_{50}$ для LL-37 и PG1 составляли 46 мкМ, а для ChBac3.4 810 мкМ. При этом в отношении линии К562, устойчивой к противоопухолевому антибиотику группы антрациклинов – доксорубицину, $ИК_{50}$ АМП существенно не изменялась по сравнению с таковой в отношении исходной линии К562, тогда как $ИК_{50}$ для доксорубицина возрастала на два порядка.

Исследовано влияние АМП на цитотоксическую активность двух противоопухолевых антибиотиков, применяемых в медицине: доксорубицина и другого препарата-цитостатика – актиномицина D. При совместном применении противоопухолевых препаратов и АМП для большинства комбинаций наблюдался аддитивный эффект (иФЭК = 0,75-1,0) в отношении всех исследованных клеточных линий. Синергическое цитотоксическое действие было выявлено при совместном применении доксорубицина в комбинации с PG1 для клеток К562 (в том числе доксорубицин-устойчивой линии) и асцитной карциномы Эрлиха мыши (иФЭК = 0,5 в обоих случаях), и актиномицина D в комбинации с PG1 в отношении клеток К562 (иФЭК = 0,5). Интересно, что и при изучении совместного действия PG1 и актиномицина в отношении бактерии *Escherichia coli* ML35p (метод серийных разведений в жидкой питательной среде по принципу «шахматной доски») тоже наблюдалось синергическое антимикробное действие (индекс фракционной ингибирующей концентрации – 0,2). Ранее нами было изучено совместное антимикробное действие АМП и конвенциальных антимикробных препаратов; были показаны синергические эффекты при применении пептидов в сочетании с различными антимикробными препаратами [5] в отношении бактерий. Как и в случае опухолевых клеток, наиболее часто синергическое антимикробное действие наблюдалось для комбинаций различных антибиотиков с пептидом, имеющим конформацию бета-шпильки – PG1. Эти наблюдения позволяют предположить, что на основе природных АМП с такой конформацией, возможна разработка новых антимикробных или противоопухолевых препаратов, не только имеющих прямое цитотоксическое действие на микробные или малигнизированные клетки, но и усиливающих терапевтический эффект применяемых в медицине антибиотиков.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности изучения эффектов сочетанного действия АМП врожденного иммунитета с применяемыми в медицине противоопухолевыми препаратами, которое может рассматриваться как трансляция фундаментальных исследований в практическую медицину в направлении разработки новых путей комплексной терапии онкологических заболеваний, в том числе в случае развития лекарственной устойчивости опухолей к конвенциальным антибиотикам.

Работа поддержана грантом ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы». Соглашение с Минобрнауки России № 14.604.21.0104 от 05.08.2014. Идентификатор RFMEFI60414X0104.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gaspar D., Veiga A. S., Castanho M. A. From antimicrobial to anticancer peptides / D. Gaspar, A. S. Veiga, M. A. Castanho // Front Microbiol.– 2013.– V. 4.– P. 294.
2. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // J Immunol Methods.– 1983.– V. 65.– P. 55-63.
3. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре / О. В. Шамова,

Г. А. Сакута, Д. С. Орлов и др. // Цитология.– 2007.– Том 49, № 12.– С. 1000-1010.
4. A novel proline-rich antimicrobial peptide from goat leukocytes / O. Shamova, D. Orlov, C. Stegemann et al. // Int. J. Pept. Res. Therap.– 2009.– V. 15. № 1.– P. 31-35.
5. Жаркова М. С. Синергизм антибактериального действия антимикробных пептидов и конвенциальных антибиотиков / М. С. Жаркова // Российский иммунологический журнал.– 2014.– Т. 8 (17), № 3.– С. 792-795.

PEPTIDES OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM MODULATE THE CYTOTOXIC ACTION OF ANTITUMOR ANTIBIOTICS

Zharkova M. S.[1], Artamonov A.Yu.[1], Grinchuk T. M.[3], Butskina E. A.[1], Pazina T. Yu.[1], Orlov D. S.[1,2], Shamova O. V.[1,2]

[1]Institute of Experimental Medicine; [2]Saint-Petersburg State University; [3]Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

The combined cytotoxic action of antimicrobial peptides of the innate immune system (human cathelicidin LL-37, protegrin 1 (PG1), bactenecin ChBac3.4) with antitumor antibiotics doxorubicin and actinomycin D *in vitro* toward human erythroleukemia cells K562 (doxorubicin sensitive and resistant K562 lines), human lung adenocarcinoma A549, murine Ehrlich ascites carcinoma cells have been explored. The synergistic effects have been revealed for the combination of doxorubicin with PG1 applied for K562 (including the doxorubicin-resistant cell line) as well as for Ehrlich ascites carcinoma, and for the combination of PG1 with actinomycin applied for K562 cells.

Keywords: innate immunity, antimicrobial peptides.

РОЛЬ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА (TGF-β1) В ПАТОГЕНЕЗЕ ФЕТАЛЬНОГО АЛКОГОЛЬНОГО СИНДРОМА

Малахова Ж. Л., Перминова Л. А.

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Медицинский институт, Калининград, Россия

Представлены данные концентрации трансформирующего фактора роста (TGF-β1) в крови беременных женщин, злоупотребляющих алкоголем и в контрольной группе (72,5 нг/мл и 6,6 нг/мл соответственно). Параллельное экспериментальное исследование на крысах также показало высокие концентрации TGF-β1 у алкоголизированных беременных животных: опытная группа 189 нг/мл, контрольная – 129,7 нг/мл. Сравнительные результаты исследования могут свидетельствовать о недостаточности рецепторов к фактору роста TGF-β1, сопряженным с воздействием этанола и объясняющим проявления фетоплацентароной недостаточности и задержку внутриутробного развития плода при фетальном алкогольном синдроме.

Ключевые слова: дети, плод, алкогольные эффекты плода, факторы роста.

Результаты всех антиалкогольных программ, проводимых как в нашей стране, так и за рубежом, к сожалению, приходится признать неудовлетворительными. Это влечет за собой целый ряд других проблем. Однако ни одна из них не является столь животрепещущей, как женский алкоголизм и развитие фетального алкогольного синдрома (ФАС). По литературным данным именно ФАС занимает лидирующую позицию в списке известных

причин задержки умственного развития [1]. Следует отметить, что в широкой врачебной среде этот диагноз используется крайне редко. Данный факт объясняется как отсутствием четких и законченных критериев диагностики, так и неясностью многих сторон патогенеза, разбросом эпидемиологических данных.

В научной литературе имеется ряд гипотез, объясняющих механизм развития ФАС. Это, прежде всего, тератогенное действие этанола на эмбрион и плод [2]. Большая часть детей, рожденных от злоупотребляющих алкоголем женщин, имеют малую массу при рождении и в дальнейшем отстают в физическом развитии, формируя группу детей с хронической белково-энергетической недостаточностью, которая резистентна к проводимой терапии. В связи с этим представляет большой интерес изучение факторов роста (ФР), которые предопределяют морфологию (развитие) как плаценты, так и плода. В результате наметилось новое направление в изучение патогенеза ФАС [3]. Есть основания считать его перспективным, поскольку ФР – клеточные полипептиды, способные стимулировать или тормозить рост тканей. Изменение их уровня может быть одним из ведущих механизмов формирования задержки физического развития как в антенатальном, так и в постнатальном периодах, приводить к морфологическим и клиническим проявлениям недоразвития центральной нервной системы, мозгового и лицевого черепа, зрительного и слухового анализаторов, что составляет клиническую основу ФАС.

Большой интерес представляет трансформирующий фактор роста β1 (TGF-β1), оказывающий множественные влияния на большое число типов клеток. Так, TGF-β1 участвует в регуляции роста клеток, их дифференцировки и апоптозе, а также в модуляции иммунной системы, начиная с оплодотворенного яйца.

Все вышесказанное явилось обоснованием **цели нашего исследования:** анализ возможных различий содержания TGF-β1 в сыворотке крови беременных женщин, страдающих хроническим алкоголизмом, и не употребляющих спиртные напитки.

Используемые методы исследования. В обследовании приняло участие 30 беременных женщин, которые были разделены на две группы: 1 группу (основную) составили 9 женщин, имеющих в анамнезе указания на злоупотребление алкоголем; 2 группу (сравнения) – 20. На 11-12 неделе беременности у всех женщин проводилось определение TGF-β1 с использованием метода гетерогенного твердофазного иммуноферментного анализа (тест-система Human TGF-β1 ELISABMS 249/2 and BMS 249/2TEN, BenderMedSystems, Австрия).

Учитывая, что у многих женщин в анамнезе были документированы гестозы, экстрагенитальная патология, гинекологические заболевания было решено провести параллельное исследование TGF-β1 у крыс. Исследования проводились в осеннее-зимний период на 26 крысах стадного разведения линии Вистар в возрасте 1-2 месяцев, массой 280-300 г. Животные содержались при комнатной температуре в условиях свободного доступа к пище. Они были разделены на две группы: 1 – основная (13 животных, получавших вместо воды в течение 1 месяца до беременности и в течение всей беременности 15 % раствор спирта), 2 – сравнения (13 интактных крыс). Для определения TGF-β1 также использовали метод гетерогенного твердофазного иммуноферментного анализа (тест-система Rat TGF-β1 ELISABMS 623 and BMS 623TEN, BenderMedSystems, Австрия). Учет результатов производился с использованием фотометра STATFAX.

Статистическая обработка фактического материала осуществлялась на персональном компьютере при помощи программы Microsoft® Excel2002 (10.3506.2625), в приложении MicrosoftOffice 2002, используя метод альтернативного варьирования с определением t-критерия.

Основные результаты. В первой группе средний возраст женщин составил 34,5 года, во второй – 31,5. Статистически значимых различий в документировании как генитальной патологии (внутриматочная инфекция, мертворождения, выкидыши, гестозы и т.п.) так и соматической (не считая алкоголизма у женщин 1-й группы) не выявлено.

Напротив, средний показатель TGF-β1 в 1 группе составил 72,5 нг/мл, во 2-й – 6,6 нг/мл ($t = 2,18$, $p < 0,05$). Референтные значения TGF-β1 0-3,46 нг/мл. Логически следовало бы ожидать снижение фактора роста в первой группе, напротив, в результате проведенного исследования мы получили увеличение его в несколько раз, что требует своего объяснения. Кроме алкоголизации, мы имели практически одинаковый спектр воздействий на

течение беременности и развитие плода. Все вышесказанное подвигло нас провести экспериментальные исследования на животных, исключающее влияние генетических факторов и экстрагенитальной патологии, имевшей место у беременных женщин, бытовые и стрессовые влияния (никотин и т.п.). Как было сказано выше, крысы были разделены на две группы – «пьющие» и «непьющие», т.е. получавшие только алкоголь или только воду. В результате проведенного эксперимента также были получены статистические значимые различия в значениях TGF-β1: в 1-й группе M = 187,9 нг/мл, во 2-й – M = 129,7 нг/мл, t = 2,68, p< 0,02. И хотя этот вопрос мало изучен и требует дальнейшего осмысливания, параллелизм показателей фактора роста у беременных женщин и опытных животных позволяет высказаться о дефектности рецепторного аппарата клеток-мишеней. По данным ряда авторов накопление этого фактора в крови [8] может быть связано с блокированием TGF-β1-рецепторов развивающихся клеток алкоголем, в результате чего нарушается рост и миграция клеток и активизируется апоптоз.

Так же TGF-β1 ингибирует пролиферацию клеток цитотрофобласта нормальной плаценты [9], что при повышении концентрации данного фактора роста может привести к первичной плацентарной недостаточности, а это, в свою очередь, к развитию синдрома задержки внутриутробного развития плода, который является одним из диагностических критериев ФАС.

Выводы. Полученные данные – повышение концентрации TGF-β1 у женщин, принимавших алкоголь во время беременности, и подобная тенденция в эксперименте у «алкоголизированных» беременных крыс – позволяют высказаться о имеющемся блоке рецепторов к фактору роста, связанном с действием этанола. Возможно, в условиях этаноловой интоксикации реализуется обратная связь. Исходя из этих положений становится возможным объяснение комплекса клинических данных, свойственных новорожденным с ФАС: задержка внутриутробного развития, фациальные отклонения, изменения со стороны ЦНС, а также патология плаценты у алкоголизированных родильниц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verbal and nonverbal fluency in children with heavy prenatal alcohol exposure / A. M. Schonfeld, S. N. Mattson, A. R. Lang et al. // J Stud Alcohol – 2001.– V. 62.– P. 239-246.
2. Zuba D. Ethanol and other volatile compounds. Kinetics in alcohol dependent patients with ethanol / D. Zuba // Toxicol. Clin. Toxicol – 2001.– V. 3.– P. 229-230.
3. Малахова Ж. Л. Клинико-патогенетические основы фетального алкогольного синдрома у детей раннего возраста: автореф. дисс. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук (14.01.08) / Малахова Жанна Леонидовна – Екатер-г, 2012.– 50 с.

ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β1(TGF-β1) INDUCED FETAL ALCOHOL SYNDROME

Malachova Zh.L., Perminova L.A.

Federal STATE Autonomous educational institution «Baltic Federal University of Immanuel Kant», Medical Institute, Kaliningrad, Russia

We present laboratory dates on concentrations of the transforming growth factor (TGF-β1) in blood of pregnant alcohol misusing women as well as of women of a control group (72.5 ng/ml and 6.6ng/ml respectively). The simultaneous experimental investigations with rats also demonstrate high concentration of TGF-β1 in the blood of pregnant animals: rats, which used alcohol had the growth factor 189 ng/ml, whereas the rats in a control group had 129.7 ng/ml. The comparative dates can indicate lack of receptors to the TGF-β1. This blockade is connected with the ethanol action and explains the fetoplacental lack and the intrauterine fetal hypotrophy with Fetal Alcohol Syndrome.

Keywords: children, fetus, alcohol, alcohol effects of fetus, growth factors.

НЕПЕРЕНОСИМОСТЬ ГИСТАМИНА И АКТИВНОСТЬ ДИАМИНООКСИДАЗЫ: ПРОБЛЕМЫ ВИРТУАЛЬНОГО СКРИНИНГА

Зайцев В. Г.[1,2], Желтова А. А.[1]

[1]ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; [2]ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет», Волгоград, Россия

Для оценки и прогноза способности лекарственных препаратов ингибировать диаминооксидазу (DAO) млекопитающих была сформирована коллекция из 117 соединений, 44 из которых являются лекарственными препаратами. Показано, что полученные в ходе докинга расчетные величины K_i ингибиторов DAO не коррелируют с величинами, определенными в экспериментах *in vitro*. Обсуждаются возможные причины несоответствия экспериментальных и расчетных данных.

Ключевые слова: непереносимость гистамина, диаминооксидаза, виртуальный скрининг, докинг.

Более 20 % жителей развитых стран мира страдают непереносимостью различных пищевых продуктов. Лишь у каждого пятого из больных имеется истинная аллергия, в то время как большинство случаев не связано с иммунологическими причинами, т.е. может быть отнесено к псевдоаллергии [1]. Часто псевдоаллергия связана с состоянием, называемым «непереносимостью гистамина». Его распространенность в популяции различные авторы оценивают в 1-8 % [2]. Одной из причин развития непереносимости гистамина является снижение активности и/или секреции одного из ферментов катаболизма гистамина – диаминооксидазы (DAO, EC 1.4.3.22) [2, 3]. В литературе есть упоминания о лекарственных препаратах, употребление которых может вызывать симптомы непереносимости гистамина. Для многих из них предполагается способность подавлять активность DAO, но в публикациях не приводится ссылок на прямые экспериментальные доказательства.

Цель работы – провести анализ экспериментальных данных о способности лекарств ингибировать DAO и оценить их соответствие результатам предсказания ингибирующей активности с помощью рутинных методов виртуального скрининга.

Для решения первой задачи был проведен библиографический поиск в базах данных PubMed и HighWire по ключевым словам 'drug diamineoxidase inhibition' и поиск соединений, обладающих активностью в отношении DAO различных видов млекопитающих в базах данных PubChem, CHEMBL, ZINC и BindingDB. Была сформирована коллекция из 117 соединений, для которых экспериментально установленные величины константы ингибирования (K_i) или полуингибирующей концентрации (IC_{50}) в отношении DAO любого вида млекопитающих были ниже, чем 1 мМ. В полученной коллекции было 44 соединения, используемых в качестве лекарственных препаратов. Наиболее эффективными ингибиторами DAO млекопитающих оказались ветеринарный антипротозойный препарат диминазен (беренил, K_i = 13±1 нМ) и фенипразин (K_i = 9 нМ), использующийся в медицине в качестве антидепрессанта и анксиолитика. Большинство соединений являлись смешанными или неконкурентными ингибиторами DAO. Еще для 5 лекарственных препаратов удалось обнаружить сведения о степени подавления активности DAO при фиксированной концентрации ингибитора. Однако для существенной части лекарственных средств, предположительно ингибирующих DAO, прямых экспериментальных подтверждений найти не удалось.

При отсутствии экспериментальных данных о взаимодействии низкомолекулярных соединений с белками в настоящее время часто применяют подходы с использованием ме-

тодов виртуального скрининга, основанных на докинге. Несмотря на широкое применение докинга в современных исследованиях, успех указанного подхода не является гарантированным, в том числе из-за большого числа возможных методологических проблем [4]. Для проверки степени согласованности экспериментальных данных и результатов виртуального прогноза мы использовали выборку из 22 соединений. Для проведения докинга были использованы три пространственных модели DAO человека: кристаллографическая структура 3HI7 из ProteinDataBank (лиганды и молекулы воды были удалены в UCSF Chimera), модель m483156dc0cc360d0769f4d6d8c8c31e6_s27_e751_t3hi7 из SWISS-MODELRepository и модель на основе первичной структуры UNIPROT P19801, сформированная с помощь сервиса COACH. Докинг проводили с помощью онлайн-сервисов DockingServer (использует программу AutoDock 4) и SwissDock (EAdockDSS).

Результаты докинга соединений с любой из трех использованных моделей DAO продемонстрировали отсутствие статистически значимых корреляций между экспериментальными величинами K_i и оценочными показателями докинга. Расчетные величины K_i, полученные с помощью DockingServer, во всех случаях были существенно (на 2-3 порядка) выше, чем экспериментальные величины. В некоторых случаях различия между результатами эксперимента и докинга были весьма значительными. Так, докинг высокоэффективного ингибитора диминазена с DAO в «карман», автоматически определяемый DockingServer, показал полное отсутствие связывания независимо от использованной пространственной модели белка. При ручной настройке размера и положения «кармана» с использованием кристаллографических данных о комплексе DAO-диминазен из [5] моделирование демонстрировало наличие связывания, однако расчетные величины K_i были на уровне сотен. Несколько лучшее результаты докинга были получены для модели белка от SWISS-MODEL. Докинг с помощью SwissDock давал для большинства лигандов несколько меньшие величины расчетной K_i, чем DockingServer.

Таким образом, полученные нами результаты показали, что использование так называемого «рутинного» докинга (с настройками программного обеспечения по умолчанию) не позволяет получить качественный прогноз взаимодействия лигандов с DAO человека. Вероятно, использование более тонких пользовательских настроек способно улучшить качество согласования экспериментальных и расчетных результатов. Кроме того, в случае DAO животных определенное влияние на качество докинга может оказывать наличие в активном центре фермента необычной модифицированной аминокислоты топахинона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The differential diagnosis of food intolerance / Y. Zopf, H.– W. Baenkler, A. Silbermann et al. // Dtsch. Arztebl. Int.– 2009.– V.106, № 21.– P. 359-370.
2. Histamine, histamine intoxication and intolerance / E. Kovacova-Hanuskova, T. Buday, S. Gavliakova et al. // Allergol. Immunopathol.(Madr).– 2015.– V.43, № 5.– P. 498-506.
3. Maintz, L., Novak, N. Histamine and histamine intolerance / L. Maintz, N. Novak // Am. J. Clin. Nutr.– 2007.– V.85.– P. 1185-1196.
4. Recognizing pitfalls in virtual screening: a critical review / T. Scior, A. Bender, G. Tresadern et al. // J. Chem. Inf. Model.– 2012.– V.52, № 4.– P. 867-881.
5. The structure and inhibition of human diamine oxidase / A.P. McGrath, K.M. Hilmer, C.A. Collyer et al. // Biochemistry.– 2009.– V.48, № 41.– P. 9810-9822.

HISTAMINE INTOLERANCE AND DIAMINE OXIDASE ACTIVITY: ISSUES OF VIRTUAL SCREENING

Zaitsev V.G.[1,2], Zheltova A.A.[1]

[1]Volgograd State Medical University; [2]Volgograd State University, Volgograd, Russia

We composed 117 compounds (44 of them were drugs) in library to estimate and predict mammalian diamine oxidase inhibitory activity. We found that values of K_i estimated by use of 'routine' docking didn't show significant correlations with *in vitro* observed K_i values. Possible causes of contradictions between experimental and calculated data were discussed.

Keywords: histamine intolerance, diamine oxidase, virtual screening, docking.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ ЛЕЙКОЗНЫХ Т-КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT НА КРАТКОСРОЧНЫЙ КОНТАКТ С РЕЛЬЕФНОЙ КАЛЬЦИЙФОСФАТНОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ

Литвинова Л. С.[1], Шуплецова В. В.[1], Юрова К. А.[1], Дунец Н. А.[1], Хазиахматова О. Г.[1], Хлусов И. А.[2,3], Хлусова М. Ю.[2], Шаркеев Ю. П.[3,4]

[1]Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград; [2]Сибирский государственный медицинский университет, Томск; [3]Томский политехнический университет, Томск; [4]Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

Смоделирована морфофункциональная реакция лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека (далее Jurkat Т-клетки) на 24-часовой контакт *in vitro* с подложками из коммерчески чистого титана, несущими двустороннее рельефное кальцийфосфатное (КФ) покрытие. Показано повышение концентрации IL-8 и снижение соотношения CD4/CD8 после культивирования клеточной культуры с микротекстурированным КФ покрытием. При этом IL-8 индуцировал апоптоз Jurkat Т-клеток в низких концентрациях (пг/мл). Обсуждаются механизмы выявленного феномена.

Ключевые слова: мембранные маркеры, цитокины, апоптоз, некроз, *in vitro*, титановые подложки, микродуговое кальцийфосфатное покрытие, микрорельеф.

Биологическое и медицинское материаловедение быстро развивается в направлении искусственного воспроизведения (симуляции) условий естественного микроокружения для моделирования и изучения сигналов, регулирующих как поведение клеток [1], так и судьбу имплантатов в организме-хозяине [2]. Так, показана возможность имитации физиологической границы раздела кость/костный мозг с помощью кальцийфосфатных покрытий, нанесенных на металлические подложки [3].

Ответ клеточных систем на искусственный материал основан на каскаде событий, развитие которых неизбежно сопровождается активацией и хомингом иммунокомпетентных клеток, в частности, Т-лимфоцитов, которые являются «дирижерами» интенсивности воспалительных и регенеративных процессов. Быстро пролиферирующая Jurkat линия лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток (далее Jurkat Т-клетки) обладает характеристиками, сходными с Т-лимфоцитами человека [4], активно используется для *in vitro* изучения иммунных и цитотоксических реакций на биоматериалы [5].

В связи с этим, представляло интерес исследование иммунофенотипических и секреторных реакций Т-клеток линии Jurkat на краткосрочный контакт *in vitro* с рельефным кальцийфосфатным покрытием, сформированным методом микродугового оксидирования.

Использованы Jurkat Т-клетки для моделирования морфофункциональной реакции Т-лимфоцитов на 24-часовой контакт *in vitro* с рельефными (индекс шероховатости Ra = 2,2-2,7 мкм) подложками (12×12×1 мм^3) из коммерчески чистого титана, несущими двустороннее кальцийфосфатное (КФ) покрытие. Покрытие сформировано методом микродугового оксидирования в водном растворе ортофосфорной кислоты (20 весовых%), карбоната кальция (9 весовых%) и синтетического гидроксиапатита (6 весовых%). Контролями сравнения служили культура Jurkat Т-клеток на пластиковой поверхности культуральных планшетов, а также клетки после контакта с оксидной (TiO_2) микродуговой поверхностью. 27-98 % иммортализированных клеток в контрольной культуре без добавления образцов имела $CD3^+CD4^+CD71^+CD45RA^+$ иммунофено-

тип и спонтанно секретировала IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 и TNFα, но не IL-1b и IL-6. Другие маркеры клеточной активации, дифференцировки, созревания и смерти (CD8, CD16, CD56, CD25, CD95) обнаруживались у 0-2,5 % клеточной популяции. Добавление образцов с оксидным покрытием статистически значимо снижало на Jurkat T-клетках презентацию мембранных маркеров (CD3, CD4, CD8 и CD95), уменьшало секрецию IL-4 и TNFα. Микрорельефная КФ поверхность образцов статистически значимо повышала концентрацию IL-8 до 183 % и 160 % от соответствующих контрольных значений в культуре Jurkat T-клеток на пластике и в группе TiO2 покрытия. Соотношение CD4/CD8 падало до 9:1 (при 13:1 на пластике и 82:1 в группе TiO_2 покрытия), как за счет снижения доли $CD4^+$, так и увеличения процента $CD8^+$ клеток. Процент CD8-позитивных Т-клеток рос линейно с увеличением шероховатости КФ покрытия (коэффициент регрессии r = 0,69; <0,005). Общее количество кариоцитов (ОКК) в культуре Jurkat T-клеток после 24-часового контакта с КФ покрытием оказалось сниженным до 88 % от контроля на пластике (P<0,04), что может свидетельствовать в пользу торможения процессов клеточного деления. Снижение ОКК в культуре Jurkat T-клеток сопровождалось усилением спонтанной секреции IL-8 (r= –0,97; <0,00009). При этом IL-8 индуцировал апоптоз (r = 0,94; <0,0001) в низких концентрациях (пг/мл). Полученные результаты, присущие реакции Jurkat T-клеток на кальцийфосфатные, но не оксидные покрытия на титане, могут иметь значение в случае выбора материала при эндопротезировании и остеосинтезе переломов у больных, страдающих опухолями кроветворной и костной тканей.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10031). Изготовление и тестирование физико-химических свойств трехмерных матриксов для культивирования клеток поддержано РФФИ (проект № 15-03-07659).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lutolf M. P., Gilbert P. M., Blau H. M. Designing materials to direct stem-cell fate / M. P. Lutolf, P. M. Gilbert, H. M. Blau // Nature.– 2009.– V. 462.– P. 433-441.
2. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2nd edition / B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons.– San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.– 851 p.
3. Niche-relief conception for stem cells as a basis of biomimetic approach to bone and hemopoietic tissues engineering / I. A. Khlusov, N. M. Shevtsova, M. Yu. Khlusova et al. // Cellular Transplantation and Tissue Engineering.– 2011.– V. 6(2).– P. 55-64.
4. Nickel and Vanadium Metal Ions Induce Apoptosis of T-lymphocyte Jurkat Cells / A. Au, J. Ha, M. Hernandez et al. // J. Biomed. Mater. Res. A.– 2006.– V. 79(3).– P. 512-521.
5. Oxide-dependent adhesion of the Jurkat line of T lymphocytes / M. J. Stevens, L. J. Donato, S. K. Lower et al. // Langmuir.– 2009.– V. 25(11).– P. 6270-6278.

MORPHOFUNCTIONAL REACTION OF LEUKEMIC JURKAT LINE T CELLS ON SHORT-TERM CONTACT WITH RELIEF CALCIUM PHOSPHATE SURFACE

Litvinova L. S.[1], Shupletsova V.V[1], Yurova K. A.[1], Dunets N. A.[1], Khaziakhmatova O. G.[1], Khlusov I. A.[2,3], Khlusova M. Yu.[2], Sharkeev Yu.P.[3,4]

[1]Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad; [2]Siberian State Medical University, Tomsk; [3]Tomsk Polytechnic University, Tomsk; [4]Institute of Strength Physics and Materials Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Morphofunctional reaction of human leukemic T lymphoblastoid cells (hereinafter Jurkat T cells) to 24-hour *in vitro* contact with pure titanium substrates covered by relief calcium phosphate (CP) bilateral coating has been modeled. Elevated IL-8 outcome and decreased CD4/CD8 ratio has been shown after cell culturing with microtextured CP surface. For all this, IL-8 induced apoptosis in low concentrations (pg/ml). The possible mechanisms of phenomenon were discussed.

Keywords: membrane markers, cytokines, apoptosis, necrosis, in vitro, titanium substrates, micro-arc calcium phosphate coating, microtopography.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ ГИППОКАМПА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК-ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ

Рыбачук О. А.[1,2,3], Родниченко А. Е.[2,3], Нестеренко Д. Г.[1,2], Зубов Д. А.[2,3], Савицкая Н. О.[1], Литвинова Л. С.[4], Шуплецова В. В.[4], Лабунец И. Ф.[2], Пивнева Т. А.[1,2], Новикова С. Н.[2], Васильев Р. Г.[2,3]

[1]Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина; [2]ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев, Украина; [3]Биотехнологическая лаборатория ilaya.regeneration, Медицинская компания ilaya®, Киев, Украина; [4]Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

В работе исследовали влияние трансплантации МСК-ПНГ на органотипическую культуру гиппокампа после ее кислородно-глюкозной депривации. МСК-ПНГ длительное время сохраняют свою жизнеспособность, интегрируются в реципиентную ткань, но не дифференцируются ни в один из типов клеток ЦНС. Трансплантация МСК-ПНГ приводит к уменьшению степени выраженности реактивного глиоза и сохранению количества нейронов в зоне CA1 гиппокампа. Таким образом, МСК-ПНГ в данной модели демонстрируют значительный нейропротекторный эффект.

Ключевые слова: органотипическая культура гиппокампа, мультипотентные стволовые клетки — производные нервного гребня, кислородно-глюкозная депривация, иммуногистохимия, нейропротекция.

Органотипическая культура гиппокампа (ОКГ) способна сохранять цитоархитектонику, клеточный состав, межклеточные связи и другие характеристики нативного гиппокампа при длительном культивировании. В тоже время ОКГ является более удобной моделью для проведения экспериментальных манипуляций с последующей трансплантацией клеток с целью изучения их судьбы и влияния на нервную ткань, чем соответствующие модели *in vivo* [1]. Так кратковременная кислородно-глюкозная депривация органотипической культуры гиппокампа вызывает изменения в зоне CA1, сходные с последствиями ишемического повреждения гиппокампа *in vivo* и широко используется для изучения терапевтического потенциала различных типов стволовых/прогениторных клеток [2].

Использование клеточной терапии в настоящее время является одним из актуальных направлений в регенеративной медицине, в частности – для лечения нейродегенеративных заболеваний и последствий инсульта головного мозга. Одним из наиболее перспективных клеточных типов для лечения неврологической патологии являются постнатальные мультипотентные стволовые клетки – производные нервного гребня (МСК-ПНГ) [3].

Постнатальные МСК-ПНГ выделены из ряда тканей и органов взрослых млекопитающих, в том числе – из утолщения наружного корневого влагалища волосяного фолликула (регион bulge) [4]. МСК-ПНГ способны к дифференциации *in vitro* в нейроны и клетки глии, секретируют ангиогенные и нейротрофические факторы, что указывает на перспективность их использования для разработки методов лечения повреждений центральной и периферической нервной системы [3].

В связи с вышесказанным, целью данной работы было исследовать влияние трансплантации МСК-ПНГ на органотипическую культуру гиппокампа после моделирования *in vitro* ишемического повреждения (кислородно-глюкозная депривация) и определить судьбу трансплантированных клеток.

Для получения ОКГ использовали 8-9-дневных мышей линии *FVB*. Гиппокампы выделяли из мозга в охлажденной среде, при помощи автоматического чоппера (McIllwain, Великобритания) нарезали срезы толщиной 350-375 мкм и культивировали их 5-7 дней на полупроницаемых мембранах, которые помещались между газовой (смесь атмосферного воздуха с 5% CO_2) и жидкой средой при +37°С [2].

Для моделирования ишемического повреждения головного мозга проводили кратковременную (10 мин.) кислородно-глюкозную депривацию (КГД), помещая срезы в специальную камеру (при +35°С), в которой кислород был замещен на азот, а в среде культивирования глюкоза заменена на сахарозу. Через 2 часа реоксигенации трансплантировали МСК-ПНГ в количестве $2{,}5\times10^5$ на органотипические культуры гиппокампа.

МСК-ПНГ выделяли из региона bulge волосяного фолликула вибрисс мышей линии FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J по методу M. Sieber-Blum [4] в нашей модификации [5]. Перед трансплантацией проводили иммунофенотипирование МСК-ПНГ по маркерам Sox10, nestin, CD44, CD73, CD90, CD117, CD271, Sca-1 и CD45.

На 3-, 7-, 14-е сутки после КГД и трансплантации МСК-ПНГ проводили двойное иммуногистохимическое окрашивание культуры гиппокампа. Для идентификации нейронов, клеток глии и трансплантированных клеток использовали первичные антитела к NeuN (1:1000, Chemicon, США), β-III-tubulin (1:500, Sigma, США), GFAP (1:1500, Dakocytomation, Дания), Iba-1 (1:750, Wako, Япония), olig-2 (1:500, Chemicon, США), nestin (1:300, Chemicon, США), GFP (1:700, Novus Biologicals, США) и соответствующие вторичные антимышиные Alexa Fluor 555 (1:1000, Invitrogen, США), анти-козьи Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen, США) и анти-кроличьи Alexa Fluor 647 (1:1000, Invitrogen, США) антитела. Окрашенные срезы гиппокампа анализировали с помощью конфокального микроскопа FluoView™ FV1000 (Olympus Inc., USA).

Показано, что кратковременная КГД вызывает повреждение органотипической культуры гиппокампа, которое постепенно развивается во времени и проявляется в увеличении количества поврежденных/погибших нейронов зоны CA1, а также значительно увеличивает активацию глиальных клеток. На 14-е сутки после КГД в срезах гиппокампа мышей линии FVB наблюдали значительное уменьшение количества нейронов зоны CA1 вследствие их гибели: контрольные срезы (n=7) – относительное количество нейронов – 454,0±39,3; срезы после КГД (n=7) – относительное количество нейронов – 197,1±22,19.

Использовавшиеся в работе МСК-ПНГ имели характерный фенотип $Sox10^+/nestin^+/CD44^+/CD73^+/CD90^+/CD117^+/CD271^+/Sca\text{-}1^+/CD45^-$ и обладали способностью к направленной дифференциации *in vitro* в адипоциты, остеобласты, хондроциты, меланоциты, нейроны и глиальные клетки.

После трансплантации МСК-ПНГ наблюдали значительное уменьшение уровня активации глиальных клеток, а также сохранение количества нейронов зоны CA1 культуры гиппокампа (n=23) (относительное количество нейронов на 14-е сутки – 468,1±19,20).

Трансплантированные на ОКГ МСК-ПНГ сохраняли свою жизнеспособность в течение всего периода культивирования, размещались в зонах наибольшего повреждения, но и не дифференцировались ни в один тип клеток ЦНС.

Результаты исследования указывают на выраженное нейропротекторное действие МСК-ПНГ, которое может быть использовано для разработки методов клеточной терапии ишемических повреждений ЦНС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies / N. Daviaud, E. Garbayo, P. Schiller et al. // Exp. Neurol.– 2013.– V. 248.– P. 429-440.
2. Пластичность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при трансплантации в ишемически поврежденную нервную ткань invitro / О. А. Рыбачук, В. М. Кирик, П. А. Побережный и др. // Гены и Клетки.– 2015.– Т. 10, № 1.– С. 51-61.
3. Concise review: adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: a state of play. / V. Neirinckx, C. Coste, B. Rogister et al. // Stem Cells Transl. Med.– 2013.– V.2.– P. 284-296.
4. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. / Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y. et al. // Dev. Dyn.– 2004.– V.231, № 2.– P. 258-269.
5. Biological properties of neural crest-derived multipotent stem cells from the bulge region of whisker follicle expanded in new culture conditions. / R. Vasyliev, A. Rodnichenko, D. Zubov et al. // Biopolym. Cell.– 2014.– V.30, № 6.– P. 469-476.

ORGANOTYPIC HIPPOCAMPAL CULTURE USE FOR STUDY OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF NEURAL CREST-DERIVED MULTIPOTENT STEM CELLS

Rybachuk O.A.[1,2,3], Rodnichenko A.E.[2,3], Nesterenko D.G.[1,2], Zubov D.A.[2,3], Savytska N.O.[1], Litvinova L.S.[4], Shupletsova V.V.[4], Labunets I.F.[2], Pivneva T.A.[1,2] Novikova S.N.[2], Vasyliev R.G.[2,3]

[1]Bogomoletz Institute of Physiology NAN of Ukraine, Kyiv, Ukraine; [2]State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine; [3]Medical company ilaya®, Kyiv, Ukraine; [4]Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

It was studied the effect of transplanted NC-MSCs over hippocampal organotypic cultures after oxygen-glucose deprivation. NC-MSCs for a long time maintain their viability and integrate into the recipient tissue, but they do not differentiate in any of CNS cell types. NC-MSC transplantation reduces the severity of the reactive gliosis and preserves the neuron number in CA1 region of the hippocampus. Thus, NC-MSCs in this model demonstrated significant neuroprotective effect.

Keywords: organotypic hippocampal slice culture, neural crest-derived multipotent stem cells, oxygen-glucose deprivation, immunohistochemistry, neuroprotection.

Раздел 12
КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ И ГЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРОФИЗМА ГЕНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ГЕНОВ ДЕТОКСИКАЦИИ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ АЭРОГЕННОЙ ЭКСПОЗИЦИИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Долгих О. В.[1,2], Зайцева Н. В.[1,2], Дианова Д. Г.[1], Кривцов А. В.[1], Бубнова О. А.[1], Мазунина А. А.[2], Безрученко Н. В.[1,2]

[1]ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; [2]ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Проведено изучение особенностей полиморфизма генов иммунной системы и генов детоксикации у взрослых и их детей в условиях аэрогенной экспозиции тяжелыми металлами. Выявлены достоверные ассоциации в виде преобладания мутантных аллелей генов иммунорегуляции у детского населения (ген TLR4, ген промоторной области TNFA) и вариантных аллельных изменений генов, отвечающих за детоксикацию первой и второй фазы (CYP2D6_rs38, CPOX, MTHFR), у взрослого населения исследуемой территории, не наблюдаемых у аналогичного контингента территории сравнения.

Ключевые слова: ген TNF альфа, ген TLR4.

Ответ организма на воздействие средовых химических факторов в значительной мере зависит от особенностей генетических ассоциаций определяющих состояния компонентов иммунного ответа и активности ферментов системы детоксикации ксенобиотиков [1]. Актуальным на сегодняшний день является выделение маркерных иммунологических и генетических показателей, которые могут быть использованы в качестве ранних маркеров нарушений здоровья [1, 2].

Цель исследования: оценка особенностей полиморфизма генов иммунной системы и генов детоксикации у взрослых и их детей в условиях аэрогенной экспозиции тяжелыми металлами

Материалы и методы. Группу наблюдения составили 139 детей и 104 взрослых, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции металлами (кадмий, марганец, мышьяк, свинец, никель, хром, вольфрам, ванадий). Группу сравнения составили 29 пар взрослых и детей, проживающих вне территории экспозиции тяжелыми металлами. Группы были сопоставимы по полу, возрасту, хронической заболеваемости и этническому составу.

Для диагностики генного полиморфизма на уровне ДНК в условиях факторной нагрузки на основании изучения специализированной литературы нами подобраны гены и их участки в качестве маркеров чувствительности вероятных рисков возникновения индуцированных средой нарушений иммунитета: иммуногенетические маркеры – FAS, FOXP3, TLR4 (толл-рецептор 4), HLA-DRA, *TP53* (rs3950989, rs1042522), ген промоторной области *TNFA* (rs1800629) фактора некроза опухолей; гены систем детоксикации – цитохром P-450 *CYP1A1* (rs4646421 и rs1048943), CYP2D6_rs38, CYP2D6_rs10, CYP17, копропорфириногеноксидазы *CPOX* (rs1131857), метилентетрагидрофолатредуктазы (rs1801133) *MTHFR*; гены сосудистых факторов – VEGF, эндотелиальной NO-синтазы *eNOS* (rs1799983), белка аполипопротеина E *ApoE* (rs429358); гены иммуноассоциированных белков (в том

числе принимающих участие в апоптозе) – матриксных протеиназ *MMP9* (rs17576), сульфотрансферазы *SULT1A1* (rs9282861), GSTA4 (глутатион-трансаминаза), GSTP1_rs16 и GSTP1_rs11 (глутатион-трансфераза), супероксиддисмутаза SOD2, ZMPSTE24 (цинк-металлопептидаза), теломераза TERT, сиртуин SIRT1, маркеры нейро-эндокринной регуляции иммунной системы – ANKK, MTNR, PER2, HTR2A и обмена – TCF7L2, SLC2A, NR3C1, гены системы рецепторов пироксисом PPAR. Для определения генотипа человека использовали метод аллельной дискриминации, когда различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливали по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров. Обработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт».

Основные результаты. Результаты генетического анализа 36 генных полиморфизмов у детей и взрослых позволили выявить ключевые гены, распространенность полиморфизмов которых достоверно отличалась от группы сравнения ($p<0,05$).

У детей в условиях избыточной средовой экспозиции металлами преобладанием патологического гомозиготного генотипа над показателями группы сравнения отличался полиморфизм генов отвечающих за иммунный ответ – фактор некроза опухоли (контроль клеточной гибели), ТОЛЛ-подобный рецептор (активация иммунного ответа), а также генов ответственных за долголетие и старение (гены телолмеразы и сиртуина), развитие онкологических процессов (ген металлопротеиназы), патологии нервной системы и обмена веществ (ген мелатонина и ген переносчика глюкозы), (частота мутантного аллеля превышала аналогичную в группе сравнения более чем в 1,5 раза).

Преимущественными полиморфными изменениями по гетерозиготному варианту генотипа в отличии от показателей группы сравнения характеризовался полиморфизм генов детоксикации и оксигенации, в частности генов копропорфириногеноксидазы, сульфтрансаминазы и глутатионтрансферазы, отвечающих за конъюгацию тяжелых металлов и ряда органических соединений, а также гена пролифератора пероксисом, связанных со 2 фазой детоксикации ксенобиотиков (частота мутантного аллеля превышала аналогичную в группе сравнения до 4 раз).

Поведенный анализ 36 генных полиморфизмов у взрослых позволил выявить кандидатные гены, распространенность вариантного аллеля которых достоверно отличалась от группы сравнения ($p<0,05$). Так, преобладанием патологического гомозиготного генотипа над показателями группы сравнения отличался полиморфизм генов отвечающих преимущественно за патологию нервной системы (ген мелатонина, ген серотонинового рецептора и ген синхронизации и времени), (частота мутантного аллеля превышала аналогичную в группе сравнения более чем в 1,3 раза).

Преимущественными полиморфными изменениями по гетерозиготному варианту генотипа в отличии от показателей группы сравнения характеризовался полиморфизм генов детоксикации, в частности генов цитохрома (CYP2D6_rs38), копропорфириногеноксидазы, метилентетрагидрофолатредуктазы, отвечающих за метаболизм и конъюгацию органических соединений и металлов, а также гена пролифератора пероксисом, связанных с 1 и 2 фазами детоксикации ксенобиотиков (частота мутантного аллеля, например, гена цитохрома превышала аналогичную в группе сравнения в 4,3 раза).

Таким образом, анализ передачи генетического полиморфизма в условиях средовой экспозиции металлами позволил выявить достоверные нарушения в виде преобладания мутантного аллеля преимущественно генов иммунорегуляции у детского контингента, тогда как у взрослого населения исследуемой территории преобладали вариантные аллельные изменения преимущественно генов, отвечающим за детоксикацию первой и второй фазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гены иммунорегуляции и детоксикации и иммунологические эффекты у детей в условиях экспозиции хлороформом / О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, А.В. Кривцов и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9 (18), № 3 (1).– С. 59-61.
2. Кандидатные гены нарушений иммунного ответа у детей в условиях экспозиции хлороформом / О.В. Долгих, О.А. Бубнова, Н.В. Безрученко и др. // Российский иммунологический журнал.– 2015.– Т. 9 (18), № 2 (1).– С. 553-555.

ASSOSIATION BETWEEN POLYMORPHISM OF THE IMMUNE RESPONSE GENES AND DETOXIFICATION GENES IN CHILDREN AND INHALATION EXPOSURE TO HEAVY METALS

Dolgikh O.V.[1,2], Zaitseva N.V.[1,2], Dianova D.G.[1], Krivtsov A.V.[1], Bubnova O.A.[1], Mazunina A.A.[2], Bezruchenko N.V.[1,2]

[1]FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies"; [2]FBSEI HPE "Perm State National Research University", Perm, Russia

The features of genes' polymorphism of the immune system and detoxification genes of adults and their children in condition of inhalation exposure to heavy metals have been studied. Significant associations, manifested by the prevalence of mutant alleles of the immune regulation genes in child population (TLR4 gene, TNFA gene promoter region) and variant alleles changes, that are responsible for the detoxification of the first and second phase (CYP2D6_rs38, CPOX, MTHFR), have been revealed. The adult population of the study area displays obvious association, what was not demonstrated by the population of the control area.

Keywords: TNF-alpha gene, TLR4 gene.

АДОПТИВНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ АКТИВИРОВАННЫМИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ ЛИМФОЦИТАМИ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ

Абакушина Е.В., Пасова И.А., Кудрявцев Д.В., Фомина Е.С., Кудрявцева Г.Т., Каприн А.Д.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия

К перспективным подходам лечения злокачественных новообразований относится клеточная иммунотерапия с использованием активированных лимфоцитов. В работе описан опыт применения адоптивной иммунотерапии у 51 больного меланомой. Лимфоциты культивировали *in vitro* 14 дней с IL-2 и с IL-15 или без него в низких концентрациях. Показана регрессия метастатических поражений у 4 больных (7,8 %), стабилизация процесса у 24 больных (47,1 %). Эти данные доказывают положительный эффект иммунотерапии.

Ключевые слова: адоптивная иммунотерапия, активированные лимфоциты, меланома.

Введение. Вопрос повышения эффективности лечения онкологических больных является актуальным. Различные методы клеточной иммунотерапии, активно изучаются и внедряются в клиническую практику, а злокачественные новообразования являются хорошей мишенью для адоптивной иммунотерапии [1]. Ключевая роль в защите организма от трансформированных клеток принадлежит цитотоксическим Т-лимфоцитам и NK-клеткам [2]. Именно эти эффекторные клетки участвуют в распознавании и элиминации клеток опухоли. Комплексные подходы на основе культивируемых *in vitro* лимфоцитов приобретают большое значение в терапии онкологических заболеваний [1, 3]. Активация противоопухолевой активности лимфоцитов основана на получении лимфокин-активированных киллеров (ЛАК) или цитокин-индуцированных киллеров (ЦИК) *in vitro*. Эффективность ЦИК клеточной терапии была показана в клинических исследованиях последних лет [4]. Ана-

лиз базы данных клинических испытаний II/III фазы применения ЦИК клеток обнаружил существенное увеличение полугодовой, годичной и двухлетней выживаемости онкологических больных, а также безрецидивной выживаемости и среднего времени до прогрессирования. Развитие данного направления представляют собой новую стратегию, которая может способствовать снижению риска метастазирования и рецидива опухолевого роста. Последние исследования и клинические испытания показали, что иммунотерапия может быть многообещающей и перспективной для онкологических больных. Адоптивная иммунотерапия (АИТ) активированными *in vitro* лимфоцитами не потеряла своей актуальности в комплексных подходах лечения меланомы.

Цель исследования: оценить безопасность и эффективность сопроводительной иммунотерапии активированными цитотоксическими лимфоцитами при комплексном лечении больных меланомой.

Материалы и методы. В исследовании принимал участие 51 больной меланомой кожи Iв-IIIc стадии в возрасте от 26 до 82 лет. В качестве основного лечения проводилось хирургическое лечение, лучевая и/или химиотерапия. Все больные проходили лечение в МРНЦ им. А.Ф. Цыба с января 2013 года по настоящее время. Сроки наблюдения составили от 4 до 27 месяцев.

Для получения большого количества цитокин-индуцированных киллеров (ЦИК) выделенные из периферической крови мононуклеарные клетки культивировали на протяжение 14 дней в полной питательной среде RPMI1640 с добавлением IL-2 (ронколейкин, Биотех, Россия) (250 мкл/мл) или в X-vivo20 (Lonza, США) с добавлением IL-2 и IL-15 (50 нг/мл) (ImmunoTools, Германия) в CO_2 инкубаторе во влажной атмосфере при 37°C. Каждые 72 часа культивирования часть суспензионных клеток собирали для иммунотерапии, а 50% питательной среды заменяли новой. Это позволило длительно культивировать лимфоциты и получить большое количество активированных цитотоксических лимфоцитов с высокой цитотоксической активностью без уменьшения их жизнеспособности [5]. Введение клеток в количестве от 2 до 10 млн. проводили на 3, 5, 7, 9 и 11 дни, лечение продолжали клеточным продуктом 2 раза в неделю по 1,5 мл на протяжении месяца. Далее АИТ продолжали по индивидуальной схеме. Исследование было одобрено этическим комитетом МРНЦ им. А.Ф. Цыба.

Результаты. В работе оценен опыт применения адоптивной иммунотерапии активированными цитотоксическими лимфоцитами у 51 больных меланомой. Всем пациентам было проведено от 2 до 6 курсов АИТ. Введение активированных лимфоцитов не вызывало побочных реакций. В некоторых случаях наблюдалась гиперемия в местах введения и зуд, субфебрильная температура. Большинство больных отметили уменьшение токсических эффектов химиотерапии на фоне АИТ, что проявлялось отсутствием диспепсических явлений, тошноты, расстройства стула и ухудшения настроения. После комбинированного лечения больных меланомой с АИТ стабилизация (SD) процесса наблюдалась у 24 (47,1%) пациентов, регрессия (PR) метастатических поражений у 4 (7,8%) больных. Проведенная оценка клинической эффективности адоптивной иммунотерапии у этих больных меланомой позволила диагностировать полную и частичную регрессию метастатических образований и появление реактивных лимфоузлов после проведения иммунотерапии активированными лимфоцитами в монорежиме. Прогрессирование заболевания (PD) отмечено у 27 (52,9%) пациентов, средний срок до прогрессирования составил 7 месяцев, что выше среднестатистических показателей на 4 месяца. Анализ полученных данных обнаружил увеличение полугодовой и годичной выживаемости у пациентов с минимальной опухолевой массой и с большим числом курсов ИТ.

Заключение. Результаты работы показывают, что сопроводительная иммунотерапия ЦИК у онкологических больных с неблагоприятным прогнозом может дополнить стандартные схемы лечения, как в комбинации с химиотерапией, так и в монорежиме и является безопасным методом лечения, позволяющим увеличить продолжительность жизни пациентов и уменьшить количество побочных эффектов химиотерапии, что подтверждает данные международных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prospects in adoptive cell transfer therapy for cancer / Y. Li, Q. Huang Y., Zhong et al. // J Immunol Clin Res.– 2013.– V.1.– P. 1008.
2. Молекулярные механизмы взаимодействия опухоли и иммунной системы / А.Е. Бережной,

Н. В. Гнучев, Г. П. Георгиев и др. // Вопросы онкологии.– 2008.– Т. 54, № 6.– С. 669-683.
3. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных при комбинированном лечении с включением адоптивной иммунотерапии / Е. В. Абакушина, Ю. В. Маризина, Г. С. Неприна и др. // Сибирский онкологический журнал.– 2015.– № 1.– С. 45-50.
4. Zhou J. Advances and prospects in cancer immunotherapy / J. Zhou // New J Sci.–2014.– V.1.– P. 13.
5. Абакушина Е. В. Эффективность совместного применения IL-2 и IL-15 для активации цитотоксических лимфоцитов *in vitro* / Е. В. Абакушина, Ю. В. Маризина, Г. С. Неприна // Гены и клетки.– 2015.– Т. 10, № 2.– С. 78-85.

THE ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY OF ACTIVATED CYTOTOXIC LYMPHOCYTES OF PATIENT WITH MELANOMA

Abakushina E. V., Pasova I. A., Kudryavtsev D. V., Fomina E. S., Kudryavtseva G. T., Kaprin A. D.

A. Tsyb MRRC, Obninsk, Russia

Promising approaches for treatment of melanoma are cellular immunotherapy with activated lymphocytes. The paper describes the experience of the application of the adoptive immunotherapy in 51 patients with melanoma. The expansion *in vitro* of cytotoxic lymphocytes was 14 days with IL-2 and/w/o IL-15 has been used at low doses. The effectiveness has allowed regression (PR) of metastatic lesions in 4 (7,8 %) patients, stabilization (SD) in 24 (47,1 %) cases after immunotherapy. These data demonstrate the positive effect of accompanying immunotherapy of melanoma patients.

Keywords: adoptive immunotherapy, activated lymphocytes, melanoma.

МЕСТО АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ В КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ

Пасова И. А.[1], Абакушина Е. В.[1], Маризина Ю. В.[1], Каприн А. Д.[2]

[1]МРНЦ им. А. Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России;
[2]ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск, Россия

Опираясь на клинико-иммунологический мониторинг, полученный при среднем сроке наблюдения 24 месяца, был оценен вклад адоптивной иммунотерапии активированными *in vitro* лимфоцитами в комплексную терапию больных меланомой с точки зрения эффективности, переносимости этого вида биотерапии опухолей, а также целесообразности её проведения в каждом конкретном случае.

Ключевые слова: меланома, сопроводительная иммунотерапия, активированные лимфоциты, эффективность адоптивной иммунотерапии.

Меланома составляет лишь 3 % опухолей кожи, но проявляет высокую склонность к метастазированию и составляет 65 % смертей от рака кожи [1]. Применение стандартных подходов лечения меланомы кожи, включающих лучевую и химиотерапию, при малой их эффективности, часто сопровождается развитием нежелательных реакций и осложнений, приводящим и к иммунодефицитным состояниям, что требует иммунокоррекции за счет

биотерапии [2]. Клинические исследования демонстрируют, что адоптивная клеточная терапия эффективна при лечении меланомы. Для этого используют лимфокинактивированные клетки (ЛАК) или цитокининдуцированные киллеры (ЦИК).

Цель исследования – оценить эффективность сопроводительной иммунотерапии ЛАК-клетками и цитокин-индуцированными киллерами (ЦИК) при комплексном лечении онкологических больных меланомой.

Материалы и методы. В исследовании принимал участие 51 пациент, имеющий подтверждённый диагноз меланома кожи III-IV стадии и получивший комбинированное лечение в МРНЦ им. А.Ф. Цыба с марта 2013 года по настоящее время. Средний возраст пациентов составил 53 года, мужчин среди них было 41 %, женщин – 59 %. Больные были разделены на две группы по способу проведения иммунотерапии активированными *in vitro* лимфоцитами. Первая включала 23 человека, которые получали интерлейкин-2 (ИЛ-2) /ЛАК-терапию, вторая состояла из 28 человек, которым проводили иммунотерапию цитокининдуцированными киллерами (ЦИК). Иммуномониторинг по разработанной нами панели маркеров проводился до начала иммунотерапии, через месяц, 3, 6 и 12 месяцев, УЗИ и СКТ проводилось по плану наблюдения. До лечения производился забор 15-20 мл периферической крови пациента, выделение МНК и культивировались *in vitro* в полной питательной среде. Для первой группы в качестве адьюванта использовали ИЛ-2 (Ронколейкин), а для второй группы два цитокина – ИЛ-2 (Ронколейкин) и ИЛ-15 [3]. Инкубация длилась в течение 7-10 суток в CO_2 инкубаторе, при температуре 37°С. Каждые 72 часа производилась пересадка лимфоцитов и забор необходимого количества клеток 2-10 (млн.) и клеточного продукта. Активированные лимфоциты вводились внутрикожно паравертебрально в 2-4 точки на 3, 5, 7, 9 дни в количестве 2-10 млн., затем супернатант 1,5 мл № 10-2 раза в неделю [4].

Результаты. Нами разработаны критерии включения больных в протокол иммунотерапии активированными лимфоцитами, основанные на последних исследованиях в области иммунологии опухолевого процесса и собственных научных работах.

На этапах культивации ЛАК и ЦИК клетки обладали различными морфологическими особенностями. У ЦИК была более выражена пролиферативная активность и жизнеспособность. Все пациенты хорошо переносили иммунотерапию, отмечали улучшение самочувствия на фоне комбинированной терапии, однако внутрикожное введение Ронколейкина вызывало болезненность, воспаление вплоть до некроза тканей в месте введения.

На март 2016 года из 23 пациентов первой группы, получавших ЛАК-иммунотерапию, живы 13 человек (56,6 %), стабилизация процесса отмечена только у 7 человек (30,4 %), прогрессирование у остальных 16 человек (69,6 %), среди которых умерли 10 человек (44,5 %). Во второй группе из 28 человек, получавших иммунотерапию ЦИК показатели выживаемости и эффективности были лучше, чем в первой группе. Так, живы 24 (85,7 %) пациента, стабилизация процесса у 19 (67,9 %), прогрессирование у 9 (32,1 %), среди которых умерли 4 пациента (14,3 %). Кроме того, во второй группе мы наблюдали 3 случая (10,7 %) частичной и полной регрессии метастазов у пациентов, находившихся на монотерапии активированными лимфоцитами, чего не было отмечено в первой группе.

Выводы. Сравнительная оценка эффективности сопроводительной иммунотерапии ЛАК- и ЦИК-терапии выявила преимущества использования цитокининдуцированных киллеров для адоптивной иммунотерапии. В этом случае чаще наблюдали появление реактивных лимфатических узлов и стабилизацию процесса, у 11 % пациентов наблюдали регрессию метастатических поражений [5]. Приведенные результаты доказывают положительный эффект адоптивной иммунотерапии, который может способствовать снижению риска метастазирования и рецидива опухолевого роста. Можно заключить, что сопроводительная иммунотерапия ЦИК у онкологических больных с неблагоприятным прогнозом, как в комбинации с химиотерапией, так и в монорежиме, является эффективным методом лечения, позволяющим увеличить продолжительность жизни пациентов и уменьшить количество побочных эффектов химиотерапии, что подтверждает данные международных исследований. Таким образом, комбинированная терапия с включением иммунотерапии активированными ЦИК лимфоцитами будет приоритетным выбором для терапии онкологических заболеваний в будущем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн А. Д. Злокачественные образования в России в 2013 году / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова.– Москва, 2015.– 250 с.
2. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных при комбинированном лечении с включением адоптивной иммунотерапии / Е. В. Абакушина, Ю. В. Маризина, Г. С. Неприна и др. // Сибирский онкологический журнал.– 2015.– № 1.– С. 45-50.
3. Абакушина Е. В. Эффективность совместного применения IL-2 и IL-15 для активации цитотоксических лимфоцитов *in vitro* / Е. В. Абакушина, Ю. В. Маризина, Г. С. Неприна // Гены и клетки.– 2015.– Т. 10, № 2.– С. 78-85.
4. Маризина Ю. В. Метод выращивания и активации лимфоцитов и NK-клеток / Ю. В. Маризина, Е. В. Абакушина, Г. С. Неприна // Клинико-лабораторный консилиум.– 2014.– № 2 – Приложение 2 (49).– С. 31-32.
5. Фенотип лимфоцитов у больных меланомой кожи после иммунотерапии активированными лимфоцитами / Е. В. Абакушина, Ю. В. Маризина, Г. С. Неприна и др.// Медицинская иммунология.– 2014.– Т. 16, № 6.– С. 567-576.

THE POSITION OF ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY WITH ACTIVATED LYMPHOCYTES IN COMBINATION THERAPY OF MELANOMA

Pasova I. A.[1], Abakushina E. V.[1], Marizina Yu.V.[1], Kaprin A. D.[2]

[1]A. Tsyb MRRC; [2]NMRRC, Obninsk, Russia

Based on the clinical and immunological monitoring, obtained by a median observation of 24 months was to evaluate the contribution of adoptive immunotherapy by lymphocytes activated *in vitro* in the complex therapy of patients with melanoma in terms of efficacy, tolerability of this type of biotherapy of tumors. as well as the feasibility of its holding in each case.

Keywords: melanoma, accompanying immunotherapy, activated lymphocytes, efficiency of adoptive immunotherapy.

СОВРЕМЕННЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА И ПОДГОТОВКИ ПРЕПАРАТОВ

Сидоренко О. Е.

ООО БиоВитрум, направление «Клеточные технологии», Санкт-Петербург, Россия

Традиционное клеточное культивирование предполагает содержание культур клеток в CO_2-инкубаторе и проведение визуального анализа с помощью отдельно установленного микроскопа. В этом случае можно сколько угодно улучшать условия содержания клеток в инкубаторе, но при переносе культуры к микроскопу или станции визуального анализа риск контаминации и клеточного стресса остается довольно высоким. Современные интегрированные системы анализа клеточных параметров позволяют в автоматическом режиме исследовать динамические процессы в клетках, не нарушая при этом оптимальных параметров инкубирования. Исследователь может в любой момент оценить состояние культуры и сделать снимок, либо задать протокол анализа, по которому система автоматически будет снимать отмеченные лунки или области чашки/флакона через заданный временной интервал и сохранять изображения на собственный сервер.

Ключевые слова: культивирование, визуализация, автоматизация.

Традиционное клеточное культивирование предполагает содержание культур клеток в CO_2-инкубаторе и проведение визуального анализа с помощью отдельно установленного микроскопа. В этом случае можно сколько угодно улучшать условия содержания кле-

ток в инкубаторе, но при переносе культуры к микроскопу или станции визуального анализа риск контаминации и клеточного стресса остается довольно высоким.

Современные интегрированные системы анализа клеточных параметров позволяют в автоматическом режиме исследовать динамические процессы в клетках, не нарушая при этом оптимальных параметров инкубирования. Исследователь может в любой момент оценить состояние культуры и сделать снимок, либо задать протокол анализа, по которому система автоматически будет снимать отмеченные лунки или области чашки/флакона через заданный временной интервал и сохранять изображения на собственный сервер.

Подобные системы идеально подходят для ведения долгосрочных экспериментов с непрерывным мониторингом и съемкой фазово-контрастных и флуоресцентных изображений, а также для быстрого многопараметрического скрининга. Все данные сохраняются на сервере вместе с параметрами инкубирования на момент съемки, и могут быть доступны в любое время, в том числе удаленно. Удобно также вести покадровую документацию и снимать в автоматическом режиме time-lapse ролики изменения клеточной морфологии, миграции, дифференцировки стволовых клеток, изменения экспрессии генов, образования колоний и прочие динамические эксперименты по заданному протоколу без необходимости постоянного присутствия исследователя в лаборатории. Современные приложения для обработки изображений позволяют быстро и точно обрабатывать серии снимков и представлять результаты экспериментов в удобной форме графиков, диаграмм или таблиц для статистического анализа.

Биостанции и другие системы визуализации позволяют получать высокое качество изображения, однако для получения наилучшего результата требуется и высокое качество подготовки препаратов. Многие современные лаборатории переходят на high tech оборудование, однако недостаточно внимания уделяется повышению качества препаратов и методам его подготовки, по-прежнему используются методики переноса покровных стекол для последующей микроскопии, т.к. классический культуральный пластик не позволяет проводить флуоресцентный анализ или более сложные методики в тех же емкостях.

Однако из множества производителей культурального пластика для лабораторий, год от года повторяющих классические емкости и конфигурации, значительно выделяется команда разработчиков из Мюнхена – среди изобретений Ibidi нет ни одного тривиального решения, даже каталог был переименован в практическое руководство.

Команда специалистов Ibidi разработала целый спектр уникальных решений для конкретных приложений, специфику которых они изучили досконально:

- Микроскопия живых клеток
- Флуоресцентные окраски
- Хемотаксис в 2D и 3D
- Миграция и сокультивирование
- Wound healing модель
- Ангиогенез
- Проточные эксперименты

Особенности конфигурации чашек и слайдов в разы упрощают процесс окраски и подготовки препарата для микроскопии, вот только некоторые из них:

- Стекло или тонкий пластик для разных задач
- Толщина донца 170-180 мкм соответствует толщине покровного стекла
- Специальный пластик с оптическими свойствами стекла – коэффициент оптического преломления 1,52
- Превосходная адгезия клеток к поверхности ibiTreat
- Минимальная автофлуоресценция – специализированный пластик для иммунных окрасок
- На выбор 6 вариантов покрытий: адгезивное, гидрофобное, фибронектин, коллаген IV, поли-L-лизин, поли-D-лизин
- Съемные силиконовые камеры
- Клейкие слайды на любые стекла

Теперь нет необходимости растить клетки на покровных стеклах – культивируйте их в чашках или на слайдах с тонкими (coverslip-like) донцами, затем производите процессы фиксации и окраски в них же. Толщина и свойства пластика позволяют получать изображения непревзойденного качества с помощью любых методов – от фазового контраста до конфокальной и high-end микроскопии. Также изделия рекомендованы для флуоресцентной микроскопии и DIC.

Помимо слайдов, рассчитанных на работу с инвертированным микроскопом, раз-

работаны специальные решения для прямых методов. Особенный интерес представляют слайды для подготовки клеточных препаратов после культивирования их в силиконовых лунках на том же предметном стекле. В этом случае силиконовые стенки снимаются, после чего препарат можно красить и заключать под покровное стекло.

Совместное использование современного оборудования и новых средств подготовки препаратов позволяет получать результаты нового уровня, это эволюция Ваших исследований!

MODERN SOLUTIONS FOR CELL ANALYSIS AND DRUGS PREPARATION

Sidorenko O. E.

BioVitrum Ltd, Saint-Petersburg, Russia

With conventional cell monitoring procedures, a culture vessel has to be taken out of the incubator for microscope observation, where cells are subjected to stressful environmental changes and vibration. Researchers then have to spend additional time repositioning the vessel to find the same observation points. Nikon's BioStation CT eliminates these problems by providing a stable environment so that the cultures don't suffer while they are being imaged and allowing for a complete trace of the same live cells, including stem cells. BioStation CT houses a microscope and camera within the Incubator. It automatically captures the images of cells being culture; there is no need to remove the vessel from the incubator and move it to the microscope.

Keywords: culturing, visualization, automatization.

Раздел 13
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

РЕЗУЛЬТАТЫ ДОЛГОСРОЧНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО СОСУДИСТОГО ГРАФТА МАЛОГО ДИАМЕТРА НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА/ВАЛЕРАТА И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО СОСУДИСТЫМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМ ФАКТОРОМ РОСТА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Антонова Л. В., Севостьянова В. В., Миронов А. В., Бурков Н. Н., Матвеева В. Г., Великанова В. В., Сергеева Е. А., Бураго А. Ю., Васюков Г. Ю., Кудрявцева Ю. А., Барбараш О. Л., Барбараш Л. С.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

Создание тканеинженерного кровеносного сосуда является одним из решений проблемы недостатка сосудистых протезов для проведения шунтирующих операций. Цель исследования – оценить тромбообразование и сроки формирования эндотелиального монослоя на внутренней поверхности биодеградируемых графтов малого диаметра из полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона (PHBV/PCL), немодифицированных и модифицированных сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF) и имплантированных в сосудистое русло лабораторных животных сроком на 6 месяцев. PGBV/PCL и PHBV/PCL/VEGF-графты изготавливали методом электроспиннинга. Структуру поверхности графтов изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Графты имплантировали в брюшную часть аорты крыс на 1, 3 и 6 месяцев. Далее проводили гистологический и иммуногистохимический анализ эксплантированных графтов. Установлено, что наличие VEGF в составе PHBV/PCL- графтов способствовало эндотелизации 50-75 % графтов в различные сроки имплантации, а также снижению, в среднем, на 25 % частоты тромбообразования. Таким образом, инкорпорирование VEGF приближает структуру поверхности PHBV/PCL- графтов к структуре внеклеточного матрикса, ускоряет формирование эндотелиального монослоя *in situ* и улучшает проходимость графтов, снижая тромбообразование.

Ключевые слова: поликапролактон, полигидроксибутират/валерат, сосудистый графт, сосудистый эндотелиальный фактор роста, электроспиннинг.

Введение. Создание тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра является одним из решений проблемы недостатка сосудистых протезов для проведения шунтирующих операций. Однако известно, что сосудистые графты диаметром меньше 2 мм практически всегда подвергаются окклюзии тромботическими массами, несмотря на антикоагулянтную терапию не только за счет низкой скорости кровотока, но и низкой тромборезистентности самого материала [1]. Поэтому стимуляция скорейшего формирования эндотелиального монослоя на внутренней поверхности сосудистых графтов может значимо улучшить их долгосрочную проходимость. В своих предыдущих работах мы показали, что через 12 месяцев имплантации спонтанная эндотелизация немодифицированных биодеградируемых

сосудистых графтов диаметром 2 мм происходит в 25 % случаев [2].

Цель исследования – оценить тромбообразование и сроки формирования эндотелиального монослоя на внутренней поверхности биодеградируемых графтов малого диаметра из полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона (PHBV/PCL), немодифицированных и модифицированных сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF) и имплантированных в сосудистое русло лабораторных животных сроком на 6 месяцев.

Методы. Полимерные графты диаметром 2 мм (n=12) на основе полигидроксибутирата/валерата (PHBV) (Sigma-Aldrich, США) и поликапролактона (PCL) (Sigma-Aldrich, США) в хлороформе в соотношении 1:2 были изготовлены методом электроспиннинга на аппарате NANON-01A (MECC, Япония). PHBV/PCL/VEGF-графты (n=12) изготовлены методом двухфазного электроспиннинга. Сосудистый эндотелиальный фактор роста крысы (VEGF) (Sigma-Aldrich, США), разведенный в фосфатно-солевом буфере в концентрации 10 мкг/мл, был введен в состав полимерного PHBV/PCL-раствора в соотношении 1:20. Структура поверхности графтов изучена методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе Hitachi S-3400N (Hitachi, Japan). После стерилизации этиленоксидом графты PHBV/PCL и PHBV/PCL/VEGF (n=12 в каждой группе) длиной 10 мм имплантированы в брюшную часть аорты самцов крыс линии Wistar по методике конец в конец. Спустя 1, 3 и 6 месяцев животных выводили из эксперимента. Эксплантированные графты фиксировали в 10 % забуференном формалине и проводили гистологическое (с окраской образцов гематоксилин-эозином) и иммуногистохимическое (с окраской образцов антителами к CD31) исследования.

Основные результаты. При проведении СЭМ выявлено, что стенка PHBV/PCL-графтов состояла из нитей диаметром до 4 мкм, которые при своем хаотичном расположении образовывали поры размером до 45 мкм. PHBV/PCL/VEGF-графты в основном состояли из наноразмерных волокон, формирующих небольшие поры. Образование в процессе двухфазного электроспиннинга наноразмерных нитей полимера подтвердило успешность инкорпорирования VEGF в состав графтов.

Через 1 месяц имплантации в 50 % PHBV/PCL- графтов (2 из 4) выявлены пристеночные тромбы, занимавшие большую часть просвета. Спустя 3 и 6 месяцев имплантации подобная картина наблюдалась в 75 % графтов (3 из 4 в каждой группе). В остальных обнаружена фиброзно-тромбоцитарная выстилка в зонах анастомозов. Слой эндотелиальных клеток выявлен лишь через 6 месяцев имплантации в 25 % PHBV/PCL- графтов (1 из 4). Через 1 месяц имплантации PHBV/PCL/VEGF-графтов внутренний просвет 75 % из них (3 из 4) был полностью проходим. По всей внутренней поверхности выявлены группы клеток $CD31^+$, соответствовавших по морфологии эндотелиальным. Через 3 месяца имплантации данная тенденция сохранилась в 50 % (2 из 4), а через 6 месяцев – в 75 % PHBV/PCL/VEGF- графтов (3 из 4) с формированием неоинтимы, покрытой слоем $CD31^+$ эндотелиальных клеток.

Выводы. Инкорпорирование VEGF приближает структуру поверхности PHBV/PCL-графтов к структуре внеклеточного матрикса, ускоряет формирование эндотелиального монослоя *in situ* и улучшает проходимость графтов, снижая тромбообразование.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00050) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Local hemodynamic disturbance accelerates early thrombosis of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts / S. Lu, X. Sun, P. Zhang et al. // Perfusion.– 2013.– V. 28, № 5.– P. 440-448.
2. Оценка биосовместимости биодеградируемого сосудистого графта малого диаметра из полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона: морфологическое исследование / Л. В. Антонова, Р. А. Мухамадияров, А. В. Миронов и др. // Гены & Клетки.– 2015.– Т. 10, № 2.– С. 71-77.

LONG-TERM IMPLANTATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE)/POLYCAPROLACTONE SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFTS MODIFIED WITH VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR: AN EXPERIMENTAL STUDY

Antonova L. V., Sevostyanova V. V., Mironov A. V., Burkov N. N., Matveeva V. G., Velikanova E. A., Sergeeva E. A., Burago A. Yu., Vasyukov G. Yu., Kudryavtseva Yu. A., Barbarash O. L., Barbarah L. S.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

Background: Tissue-engineered blood vessels are the way to deal with the lack of vascular grafts for bypass surgery. Aim: To compare patency and endothelialization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/polycaprolactone small-diameter vascular grafts with and without VEGF (PHBV/PCL/VEGF and PHBV/PCL, respectively) using a rat abdominal aorta replacement model. Grafts were fabricated using electrospinning with the further morphological assessment by scanning electron microscopy. Grafts were implanted into rat abdominal aorta for 1, 3, and 6 months with the further histological and immunohistochemical examination. Results: Three-fourths of PHBV/PCL/VEGF grafts had an endothelial cell monolayer 6 months postimplantation. All PHBV/PCL/VEGF grafts were patent. So, incorporation of VEGF makes PHBV/PCL- grafts more similar to extracellular matrix and brings its physico-mechanical properties closer to those of IMA. Furthermore, it promotes formation of endothelial cell monolayer *in situ* and improves graft patency.

Keywords: polycaprolactone, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), vascular graft, vascular endothelial growth factor, electrospinning.

РАЗРАБОТКА БИОТРАНСПЛАНТАТА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ

Данилкович Н. Н.[1], Космачева С. М.[1], Деркачев В. С.[2], Потапнев М. П.[1,2]

[1]ГУ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий; [2]УО Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Изучено влияния препаратов растворимых факторов тромбоцитов на пролиферацию и остеогенную дифференцировку МСК *in vitro*. Разработана конструкция биотрансплантата для замещения дефектов костной ткани и показана эффективность его применения на экспериментальной модели *in vivo*.

Ключевые слова: биотрансплантат, мезенхимальные стволовые клетки, растворимые факторы тромбоцитов.

Актуальность. Для конструирования костных трансплантатов и их эффективного приживления необходимы три компонента: остеогенные клетки, материал-носитель, биоактивные молекулы [1]. Поэтому, выбор оптимального носителя и создание микроокружения, которые будут способствовать пролиферации и дифференцировке предшественников остеогенных клеток являются ключевыми этапами в разработке костных трансплантатов.

Цель исследования. Разработать состав биотрансплантата на основе остеогенно-диффе-

ренцированных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для восстановления обширных дефектов костной ткани.

Материалы и методы. В состав биотрансплантата включали остеопластические материалы, пре-дифференцированные в остеогенном направлении МСК костного мозга человека, ростовые факторы тромбоцитов (РФТ).

Исследовали следующие остеопластические материалы: «Кафам Д» – гранулы размером около 1,2 мм, полученные при термической обработки (700-1400 °С) (ИБОХ НАН Беларусь); «Коллапан», включающий гидроксиапатит и коллаген с добавлением антибиотика линкомицина гидрохлорида в виде пластин и гранул («Интермедапатит», РФ); «Остеоматрикс» – высокоочищенный костный матрикс с сохраненными коллагеновым и минеральным компонентами, содержащий аффинно-связанные костные сульфатированные глюкозаминогликаны («Конектобиофарм», РФ).

МСК выделяли из костного мозга здоровых лиц методом адгезии на пластике. Культивировали в среде α-МЕМ (Sigma, США) с10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и антибиотиками при 37 °С и 5 % CO_2 со сменой среды каждые 3-4 дня. Прилипшие к пластику МСК, снимали 0,25 % раствором трипсин-ЭДТА.

Дифференцировали МСК в остеогенном направлении в течение трех недель в среде с добавлением 10 мМ β-глиферофосфата, 50 μМ аскорбиновой кислоты и 0,1 μМ дексаметазона. Оценку остеогенной дифференцировки МСК проводили по окрашиванию на щелочную фосфатазу (Sigma), образованию оссификатов кальция (окраска ализариновым красным и von Kossa), экспрессии мРНК щелочной фосфатазы, остеопонтина и остеокальцина на 21-йдень дифференцировки МСК (ОТ-ПЦР в реальном времени). В состав биотрансплантата входили МСК, пре-дифференцированные в остеогенном направлении в течение четырех дней.

РФТ получали из концентрата тромбоцитов доноров крови методом активации тромбином (релизат тромбоцитов, РТ) или методом шоковой заморозки тромбоцитов (лизат тромбоцитов, ЛТ).

Регенерацию трубчатых костей с использованием биотрансплантата изучали на модели краевого дефекта лучевой кости кроликов (1,5 см). Контролем служил дефект кости, заживающий под кровяным сгустком, и дефект, заполненный остеопластическим материалом без МСК и РФТ. Биотрансплантат в дефекте фиксировали фибриновым гелем («Фибриностат М», Беларусь). Восстановление костного дефекта оценивали с помощью компьютерного томографии (КТ) и окрашиванием гематоксилин-эозином гистологических срезов костей в месте формирования биотрансплантата через 1, 2 и 3 месяца после операции.

Результаты. РФТ являются источником биоактивных молекул для роста и дифференцировки клеток [2, 3]. В предварительно проведенных экспериментах *in vitro* показано, что культивирование МСК в присутствии РФТ приводит к увеличению скорости деления клеток. Так, за 7 дней культивирования МСК в присутствии 5 % РТ или ЛТ кратность прироста составила 16,6 (p=0,005) и 14,4 (p=0,003) раза по сравнению с МСК, культивированными в полной питательной среде. В среде без добавления РФТ прирост МСК составил 2,6 раза к начальной концентрации клеток. Кроме этого, РФТ оказывают влияние на процесс дифференцировки МСК в остеогенном направлении [3]. Интенсивность образования фосфатов кальция остеогенно-индуцированных МСК прямо пропорционально зависела от концентрации вносимых в дифференцировочную среду РФТ (1-5 %). При анализе влияния РФТ на экспрессию генов остеопонтина и остеокальцина установлено, что при добавлении 5 % ЛТ в дифференцировочную среду экспрессия мРНК остеопонтина увеличивалась в 4,7 раза (p=0,04), а мРНК остеокальцина – в 18,9 раза (p=0,002) по отношению к контрольным остеогенно дифференцированным МСК.

Исследование регенеративной активности композитного биотрансплантата на основе остеогенно-дифференцированных МСК, остеопластического материала и РФТ проводили на сформированных продольных костных дефектах размером 1,5×0,5 см на лучевой кости передних лап кроликов. Наблюдение за животными в раннем послеоперационном периоде не выявило признаков общего или локального воспаления. При сравнении эффективности используемых остеопластических материалов по результатам денситометрии установлено увеличение плотности костных дефектов через 2 месяца наблюдения с использованием в составе биотрансплантата Кафама и Остематрикса по сравнению с контролем биотранс-

плантата, не включавшего МСК и РФТ. Через 3 месяца наблюдения плотность данных биотрансплантатов снижалась и не отличалась от значений в контроле. Плотность биотрансплантата, в состав которого входил Коллапан, нарастала через 3 месяца и составила 2200±100 единиц Хаусфильда, что было гораздо выше по отношению к контролю с остеоплаплатическим материалом (p=0,008). Морфологический анализ показал, что применение Коллапана в составе биотрансплантата приводит к полной регенерации костного дефекта (первичное заживление), активации остеогенеза с избыточным формированием пластинчатой костной ткани в зоне дефекта ко 2-му месяцу наблюдений. При использовании Остеоматрикса и Кафама отмечено сегментарное замещение костного дефекта вновь сформированной незрелой и зрелой пластинчатой костной тканью (первичное заживление, но с сохранением костных кист, содержащих материал). В контроле без МСК и РФТ отмечаются многочисленные кисты и инкапсуляция материала.

Вывод. На основе оценки *in vitro* влияния препаратов РФТ на пролиферацию и остеогенную дифференцировку МСК разработана конструкция биотрансплантата для замещения дефектов костной ткани и показана эффективность его применения на экспериментальной модели *in vivo*. Разработанный биотрансплантатна основе Коллапана, остеогенно-дифференцированных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека и растворимых факторов тромбоцитов может использоваться для усиления регенеративных процессов и восстановления костной ткани в зоне дефекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития / Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.Ю. Кочиш и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.– 2007.– Т. 2, № 4.– С. 18-30.
2. Растворимые факторы тромбоцитов и регенеративная медицина / М.П. Потапнев, А.А. Арабей, Г.Г. Кондратенко и др. // Здравоохранение.– 2014.– № 9.– С. 32-40.
3. Влияние релизата (releasate) тромбоцитов на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека / С.М. Космачева, Н.Н. Данилкович, А.В. Щепень и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине.– 2013.– № 4.– С. 210-216.

BIOGRAFT DEVELOPMENT FOR SUBSTITUTION OF BONE TISSUE DEFECT

Danilkovich N.N.[1], Kosmacheva S.M.[1], Derkachev V.S.[2], Potapnev M.P.[1,2]

[1]The Republic research and production center for transfusiology and medical biotechnologies;
[2]Belorussian State Medical University, Minsk, The Republic of Belarus

We studied the effect of soluble preparations of platelet-derived growth factors on proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells *in vitro*. Design of biograft for defect bone tissue replacement and the efficiency of its application *in vivo* models was developed.

Keywords: biotransplant, mesenchymal stem cells, platelet-derived growth factors.

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ И РЕПАРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА БИОРЕЗОРБИРУЕМОГО КОЛЛАГЕНОВОГО ГЕЛЯ

Калмыкова Н. В., Демьяненко И. А., Сафоян А. А., Нестеренко В. Г., Суслов А. П.

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Исследовали местное раздражающее действие и репаративные свойства биорезорбируемого медицинского изделия гель «Коллост» с концентрацией коллагена 7 % в моделях подкожной имплантации у мышей и заживления полнослойной кожной раны у крыс соответственно. Показано, что гель не оказывает раздражающего действия при подкожном введении, а также обладает репаративными свойствами, выражающимися в значительном ускорении эпителизации полнослойных кожных ран.

Ключевые слова: коллаген, биосовместимость, заживление ран.

Коллаген является преобладающим в количественном отношении белком в организме млекопитающих. Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, доступности, способности к биоразложению и слабой антигенности данный белок широко используется для изготовления различных биодеградирующих медицинских изделий и препаратов (Chattopadhyay S., Raines R. T., 2014). Значительный научный и практический интерес прикован к исследованиям и разработке изделий на основе нативного коллагенового матрикса, получаемого путем децеллюляризации различных тканей. Во многих исследования показана способность децеллюляризованного матрикса, полученного по различным технологиям из различных источников, способствовать хемотаксису, миграции и дифференцировки клеток, а также ремоделированию собственных тканей организма (Crapo P. M. et al., 2011). В настоящее время на отечественном рынке представлена серия биорезорбируемых медицинских изделий «Коллост», структурной основой которых служит коллагеновая матрица, полученная путем децеллюляризации и последующей очистки сетчатого слоя дермы крупного рогатого скота на основе технологии, описанной в патенте РФ № 2353397.

Целью настоящей работы явилось исследование местного раздражающего действия и репаративных свойств медицинского изделия гель «Коллост» с концентрацией коллагена 7 % (ООО «Биофармахолдинг», Россия) в моделях подкожной имплантации у мышей и заживления полнослойной кожной раны у крыс соответственно.

Для анализа раздражающего действия мышам проводили подкожные инъекции геля в количестве 250 мкл в область спины. Животным контрольной группы вводили аналогичный объем 10 % раствора глюкозы, являющегося жидким компонентом медицинского изделия. На 1-е и 5-е сутки после инъекций мышей выводили из эксперимента и иссекали кожные лоскуты из области введения образцов, а также регионарные лимфатические узлы, которые подвергали гистологическому исследованию. Качественно оценивали наличие патологических изменений в области введения геля и в регионарных лимфатических узлах. Полуколичественно анализировали наличие в зоне инъекций различных клеточных форм лейкоцитарного инфильтрата, отека, некрозов, прорастание в имплантат соединительных тканей. Используя полуколичественную систему оценки по ГОСТ ISO 10993-6-2011, оценивали степень раздражающего действия медицинского изделия.

Для исследования репаративных свойств крысам под наркозом хирургически наносили

полнослойные кожные раны в межлопаточной области спины диаметром 20 мм. Сразу после нанесения раны заполняли гелем и накрывали фиксирующей повязкой (Hydrofilm, Германия). В качестве контрольных использовали две группы животных. В первой раны заживали под струпом, во второй – под фиксирующей повязкой без нанесения геля. Через 7 и 14 сутки после операции крыс выводили из эксперимента и иссекали кожный лоскут, содержащий раневой дефект. Полученные ткани подвергали гистологическому исследованию. На препаратах морфометрически оценивали степень эпителизации раневой поверхности, количество грануляционной и фиброзной тканей, нейтрофильную инфильтрацию и объемную плотность сосудов.

Результаты исследования в модели подкожной имплантации показали, что введение геля вызывает развитие в окружающей соединительной ткани слабо выраженного отека, практически полностью спадающего к 5-м суткам эксперимента, а также лейкоцитарной инфильтрации зоны введения. Как на 1-е, так и на 5-е сутки преобладающей клеточной формой в инфильтрате являлись моноциты/макрофаги. Было выявлено, что лейкоциты активно внедряются в толщу имплантированного геля, что свидетельствует о способности изделия выступать в качестве эффективного субстрата для миграции клеток. Других значительных патологических изменений в области инъекций геля, в частности некрозов, кровоизлияний, фиброза, выявлено не было. Выраженность альтернативно-воспалительных изменений в тканях при инъекции геля существенно не превышало величину неспецифической тканевой реакции, вызываемой введением контрольного образца. Согласно полуколичественной системе оценки раздражающего действия по ГОСТ ISO 10993-6-2011 7 % гель «Коллост» не оказывал раздражающего действия на окружающие ткани. Также введение геля не вызывало развития лимфаденита и других патологических изменений регионарных лимфатических узлов и не сопровождалось миграцией крупных фрагментов имплантата по лимфатической системе.

Исследование репаративных свойств медицинского изделия в модели заживления полнослойной кожной раны у крыс показало, что во всех экспериментальных группах животных в области раневого дефекта на 7-е сутки формировалась грануляционная ткань, к 14-м суткам перестраивающаяся в фиброзную. Морфометрический анализ вывил, что применение 7 % геля «Коллост» вызывало статистически значимое усиление эпителизации ран на 7-е сутки по сравнению с заживлением под струпом, а на 14-е по сравнению с обеими контрольными группами. При этом на 14-е сутки средняя величина данного показателя опытной группы превышала таковую при заживлении под струпом на 50 %, а под повязкой – на 24 %. Полученные данные свидетельствуют о значительном ускорении процесса регенерации поврежденной ткани под воздействием геля. Также морфометрическое исследование выявило на 14 сутки статистически значимое снижение объемной плотности сосудов в опытной группе по сравнению с группой заживления под струпом. В то же время обе контрольные группы достоверно не различались по данному показателю. Полученные данные свидетельствуют о синергетическом эффекте геля и фиксирующей повязки на процесс ускорения формирования рубца.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о высокой биосовместимости и безопасности, а также о наличии выраженных репаративных свойств у биорезорбируемого медицинского изделия 7 % гель «Коллост».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crapo P. M., Gilber T. W., Badylak S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P. M. Crapo, T. W. Gilbert, S. F. Badylak // Biomaterials.– 2011.– V. 32, № 12.– P. 3233-3243.
2. Chattopadhyay S., Raines R. T. Collagen-based biomaterials for wound healing / S. Chattopadhyay, R. T. Raines // Biopolymers.– 2014.– V.101, № 8.– P. 821-833.

BIOCOMPATIBILITY AND REPARATIVE PROPERTIES OF BIORESORBABLE COLLAGEN GEL

Kalmykova N. V., Demyanenko I. A., Safoyan A. A., Nesterenko V. G., Suslov A. P.

N. F. Gamaleya Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

The local irritant effect and reparative properties of bioresorbable medical gel «Collost» with collagen concentration of 7 % were studied in the models of subcutaneous implantation in mice and healing of full-thickness dermal wounds in rats. It was shown that the gel does not cause irritation when administered subcutaneously and also has reparative properties, manifested in a significant acceleration of wound epithelization.

Keywords: collagen, biocompatibility, wound healing.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС ИЗ КОСТИ ЧЕЛОВЕКА КАК ОСНОВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ

Кирилова И. А.[1], Николаев С. В.[4,5], Подорожная В. Т.[1], Шаркеев Ю. П.[2,3], Уваркин П. В.[2], Ратушняк А. С.[5], Чебодаева В. В.[3]

[1]ФГБУ «ННИИТО им.Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск; [2]ИФПМ СО РАН, Томск; [3]НИ ТПУ, Томск; [4]ИЦИГ СО РАН, Новосибирск; [5]КТИ ВТ СО РАН, Новосибирск, Россия

Приведены результаты исследования физико-механических свойств деминерализованного костного матрикса губчатой и компактной кости человека. Показано, что деминерализованная губчатая кость обладает наилучшими характеристиками поровой системы для заселения матриксов клетками. Модуль упругости изменялся от 50 до 250 МПа, а предел прочности – от 1,1 до 5,5 МПа.

Ключевые слова: матрикс, деминерализованная кость, структура, свойства.

Актуальность. Дефекты костных тканей представляют актуальную медицинскую проблему во всем мире. Ключевой стратегией устранения костных дефектов является использование скаффолдов заселенных стволовыми клетками. В настоящее время идет разработка и тестирование материалов, которые бы могли заполнить дефекты костной ткани, образовавшиеся в результате патологического процесса. В России активно идут разработки тканеинженерных костных графтов на основе фосфатов кальция заселенных аутогенными мезенхимальными мультипоентными стромальными клетками, выделенными из жировой ткани, биополимеров и соединений фосфата кальция [1-5]. Однако остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства этих материалов недостаточны для замещения дефектов объемом более 1 см^3 [1-5]. Это связано с несколькими факторами. Костная и хрящевая ткань несут механическую нагрузку и обладают сбалансированными упруго-прочностными характеристиками. Показано, что при излишней жесткости имплантата из твердых материалов, таких как метало-керамика, может травмироваться ткань, его окружающая. Такие конструкции должны обладать следующими свойствами: сохранение физических и анатомических особенностей донорской кости, высокой прочностью, быстрой фиксацией в зоне имплантации

и регенераторным потенциалом, а этим требованиям может удовлетворять только жесткая/упругая матрица, содержащая костные клетки реципиента, способные делиться, дифференцироваться и синтезировать межклеточный матрикс, поддерживающий жизнеспособность клеток [3-5].

Настоящее исследование посвящено изучению влияния физико-химических свойств деминерализованного костного матрикса на клетки остеогенного и хондрогенного рядов для управления процессами их пролиферации, дифференцировки и таксиса при заселении матриксов в задачах регенеративной медицины

Заявленное исследование мотивировано нашим пониманием процесса заселения матриц клетками при биоинженерии имплантатов. Именно, заселение есть результат миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. Миграция зависит от подвижности клеток, свойств матрицы, ее механики, геометрии, химического состава поверхностей, и т.д. Пролиферация и дифференцировка зависят от концентрации питательных и регуляторных компонентов среды, а распределение уровня концентраций компонентов среды определяется диффузией молекул и потреблением их клетками.

Мы предполагаем, что этих целей можно достигнуть, научившись управлять функционированием клеток, используя знания о регуляции экспрессии генов.

На настоящий момент нас интересовали следующие контуры регуляции экспрессии генов:

1. Регуляция морфогенами (регуляторными молекулами, находящимися в среде)
2. Регуляция электрическими потенциалами и микротоками
3. Регуляция механическими напряжениями и деформациями

Материалы и методы. Материалом исследования служили образцы срединных распилов из головок бедренных костей в количестве шести штук, резецированных в ходе первичного эндопротезирования тазобедренного сустава у пациентов с коксартрозом. На первом этапе происходил радиальный распил ГБК с шагом 0,4-0,5 см. Из срединного фрагмента выпиливался образец размерами 1,0×3,0см. Весь костный материал доноров подвергался промывке в очищенной проточной водой, обезжириванию спирт-эфиром и деминерализации 0,6 раствором соляной кислоты. Микротвердость измерялась на микротвердомере марки Duramin 5 при нагрузке на индентор 245 мН. При измерении нанотвердости проводилась регистрация модуля Юнга. Исследования на трёхточечный изгиб проводили на универсальной испытательной машине Instron 3369 по ГОСТ 14019-80. Морфологию костного материала исследовали на металлографическом инвертированном микроскопе «Альтами МЕТ 1МТ» (Россия, Санкт-Петербург). Общая пористость рассчитывалась как

$$П = \frac{\sum l}{\sum L_1} 100\% \quad , \qquad (1)$$

где L_1 – общая длина секущих и l – длина секущих, попадающих на поры в условных единицах измерительного прибора. Для определения элементного состава костного материала использовали последовательный волнодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр Lab Center XRF-1800 (Япония).

Результаты. Макроскопически образы губчатой и компактной деминерализованной кости одного типа-размера 1,0×3,0 см, отличаются структурой поверхности. Морфология образцов компактной кости представлена редко расположенными Гаверсовыми каналами, размером 20 мкм, расстояние между Гаверсовыми каналами варьирует от 100 до 150 мкм, Пористость компактной костной ткани близка к нулю.

Структура губчатой деминерализованной кости имеет пористость 50 % и выше со средним диаметром пор наиболее приемлемым для заселения матриц клетками. Полученные результаты указывают на то, что для заселения матриц остеобластами, которые имеют значительный размер в дифференцированном виде до 30,0 μm, предпочтительнее использовать образцы с размером пор от 250 μm и более. Изучение микрофотографий показало, что в губчатой кости органический матрикс имеет поры размерами до 0,5 миллиметра, и бедно представлены поры, размерами от десятка до ста микрометров.

Для моделирования транспорта морфогенов и питательных компонентов с целью управления их пространственным распределением необходимо определять для конкретного образца коэффициенты диффузии. Для этого были отработаны методики измерения восстановления флуоресценции после фотоотбели-

вания для оптически прозрачных сред и метод магнитно-резонансной томографии распределения парамагнитных частиц, который можно использовать для оптически непрозрачных сред. Для модели простой диффузии был разработан алгоритм решения обратной задачи для оценки коэффициента диффузии по серии изображений распределения диффундирующего вещества в образце. В пилотных экспериментах были предварительно определены коэффициенты диффузии для нескольких матриксов. Для измерения пьезоэлектрических свойств нами был сделан макет экспериментальной установки и осуществлена запись пьезоэлектрических потенциалов с образца компактной деминерализованной кости. Форма и амплитуда пьезоэлектрических потенциалов зависят от микроструктуры и влажности образца.

Выводы. Механические и электрические свойства образцов кости связаны и зависят от типа костной ткани: компактная, губчатая. Предел прочности и модуль упругости образцов из деминерализованных головок бедренной кости изменяются в широких пределах. Модуль упругости находится в пределах 50-250 МПа, а предел прочности – 1,1-5,5 МПа. Пористость деминерализованной губчатой аллокости значительно превышает величину пористости компактной аллокости и составляет 50 %. Деминерализованная губчатая кость обладает наилучшими характеристиками пористости для заселения матриксов клетками. Кость обладает пьезоэлектрическими свойствами, а форма и амплитуда пьезоэлектрических потенциалов зависят от микроструктуры костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований, проект № 15-29-04875.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кирпичев, И.В., Маслов, Л.Б., Коровин, Д.И. Актуальные междисциплинарные проблемы применения современных пористых имплантатов для замещения костных дефектов / И.В. Кирпичев, Л.Б. Маслов, Д.И. Коровин // Современные проблемы науки и образования.– 2016.– № 1.
2. Kirilova, I.A. Sharkeev, Yu. P., Podorozhnaya, V.T. Structural and functional studies of bioobjects prepared from femoral heads / I.A. Kirilova, Yu. P. Sharkeev, V.T. Podorozhnaya // Citation: AIP Conference Proceedings.– 2015.– V.1688.– P. 030005.
3. Некоторые физико-химические и биологические характеристики образцов скелета аквакультур склерактиниевых кораллов, предназначенных для реконструкции инженерии костной ткани / А.А. Попов, Н.С. Сергеева, Т.А. Бритаев и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2015.– Т. 159, № 4.– С. 490-494.
4. Остеоинтеграция в реконструктивной хирургии: современное состояние и перспективы развития направления (обзор литературы) / М.А. Шевцов, О.В. Галибин, Н.М. Юдинцева и др. // Травматология и ортопедия России.– 2012.– № 4 (66).– С. 126-134.
5. Создание тканеинженерного эквивалента костной ткани и перспективы его использования в травматологии и ортопедии / П.М. Ларионов, М.А. Садовой, А.Г. Самохин и др. // Хирургия позвоночника.– 2014.– № 3.– С. 77-85.

EXTRACELLULAR MATRIX FROM THE BONE TISSUE-ENGINEERING

Kirilova I.A.[1], Nikolaev S.V.[4,5], Podorozhnaya V.T.[1], Sharkeev Yu.P.[2,3], Uvarkin P.V.[2], Ratushnyak A.S.[5], Chebodaeva V.V.[3]

[1]Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk; [2]Institute of Strength Physics and Materials Science, Tomsk; [3]National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk; [4]Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk; [5]Design Technological Institute of Digital Techniques, Novosibirsk, Russia

The article describes the results of a study of physicomechanical properties of a demineralized bone matrix of human cancellous and compact bones. A demineralized cancellous bone was shown to have the best characteristics of a porous system for colonization of matrices by cells. The elasticity modulus ranged from 50 to 250 MPa, and the tensile strength varied from 1.1 to 5.5 MPa.

Keywords: matrix, the demineralized bone, structure, properties.

ОПТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ БИОТЕХНОЛОГИИ СКАФФОЛДА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТИ НА ОСНОВЕ ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Ларионов П. М.[1,3], Маслов Н. А.[2,3], Папаева Е. О.[2,3], Терещенко В. П.[1], Хлесткин В. К.[3], Богачев С. С.[3], Проскурина А. С.[3], Титов А. Т.[3], Филипенко М. Л.[3], Павлов В. В.[1], Кудров Г. А.[1], Оришич А. М.[2]

[1]ФГБУ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. им. Я. Л. Цивьяна МЗ РФ; [2]ФГБУН Институт теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН; [3]ФГАОУВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Одной из нерешенных проблем травматологии и ортопедии, является восстановление критических дефектов кости. Предполагаем, что внедрение неинвазивного контроля этапов биотехнологии клеточно-опосредованного костного скаффолда на основе лазерно-индуцированной спектроскопии (ЛИФ) может стать позитивным моментом освоения этой технологии. На модели скаффолда – поликапролактон 10 % wt, 5 % wt желатин А, с диаметром волокон 877,1±169,1, выполненного методом электроспиннинга, заселенного клетками линии ВНК IR 182±38 клеток/мм^2, показана принципиальная возможность дифференциации между заселенным и незаселенным клетками скаффолдом. Для диапазона возбуждения 230-290 нм в спектрах флуоресценции заселенного клетками скаффолда присутствует пик на 305 нм, который может быть использован для дифференциации образцов. Наиболее подходящей для дифференцировки может считаться длина волны 250 нм, которой свойственна высокая интенсивность сигнала.

Ключевые слова: скаффолд, лазерно-индуцированная флуоресценция.

Актуальность. В настоящее время, одной из главных нерешенных проблем травматологии и ортопедии, является восстановление критических дефектов кости. Действующим стандартом лечения таких дефектов являются медицинские технологии, использующие собственную кость пациента. Применение различных костнопластических материалов аллогенного и ксеногенного происхождения, имеет ряд ограничений хирургического, биологического и этического плана [1].

Альтернативным подходом, является в создание тканеинженерного эквивалента кости с использованием клеток пациента. Концептуально, базовые элементы тканеинженерных эквивалентов известны: биосовместимость и остеоиндуктивность материалов, возможность надежной фиксации, введение в конструкцию биомиметических элементов, наноструктуирование, нетоксичность, заданная по времени биорезорбция, использование ростовых факторов и прогрессивных культуральных техник [2].

Мы предположили, что создание метода неинвазивного контроля состояния скаффолда, после его заселения целевыми клетками во многом может определить дальнейшую судьбу клеточно-опосредованных скаффолд технологий. В качестве «кандидата», был предложен метод лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии (ЛИФ). Ранее, с помощью данного метода в серии работ была доказана возможность определять степень минерализации клапанов сердца и сосудов, оценивать жизнеспособность миокарда, а так же контролировать этапы биотехнологии децеллюляризации клапанных графтов сердца [3, 4, 5].

Цель: рассмотреть возможность создания оптической диагностики состояния клеточного скаффолда для замещения костного де-

фекта на этапах его биотехнологии с использованием метода лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии.

Материалы и методы. Формирование полотна скаффолда выполнялось на установке электроспиннига NF-103 (MECCO, Япония)*, использовали следующие материалы: поликапролактон (80кДа, Sigma-Aldrich), желатин (type A, Sigma-Aldrich), растворители 1,1,1,3,3,3-гексафторпропанол (Sigma-Aldrich), ацетон (Реахим, ХЧ), ледяную уксусную кислоту (Реахим, ХЧ). Характеристики полученного полотна: состав – поликапролактон 10 % wt, 5 % wt желатин А, средний диаметр волокон 877,1±169,1, угол смачивания 45,3(°). Выполняли стерилизацию. Полотно помещали на дно 6-луночных планшетов (TPP, Швейцария), добавляли по 1,5 мл среды DMEM (Gibco, США) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой (HyClone, США) и смесью антибиотиков пенициллин (100 ед./мл) / стрептомицин (100 мкг/мл). В лунки с исследуемым полотном добавили по 100 тыс. клеток BHK IR. Проводили 18-часовой тест на адгезию и цитотоксичность с ММТ. Плотность заселения полотна клетками составляла в среднем 182±38 клеток/мм^2, МТТ тест показал не более 1,1 % клеток с токсическим повреждением. Затем образцы заселенные клетками BHK IR изучали методом ЛИФ. Для исследования лазерно-индуцированной флуоресценции использовали спектроскопический измерительный стенд, в составе: импульсно-периодический лазер “Vibrant HE 355 II + UV” (Opotek, USA) с оптопараметрическим преобразователем (optical parametric oscillator – OPO), позволяющим получать перестраиваемое лазерное излучение в диапазоне 210-355 нм с энергией в импульсе до 3 мДж. Для регистрации флуоресценции использовался спектрометр на основе спектрографа с дифракционной решеткой “Action SP2300” (Princeton Instruments, USA) и охлаждаемой ПЗС матрицей с открытыми электродами “Pixis 256” (Princeton Instruments, USA). Входная щель спектрометра находилась в фокусе зеркала, таким образом, измеряли сигнал, усреднённый по поверхности образца. Варьируя длину волны лазерного излучения в диапазоне от 210 до 340 нм, получали различные спектры флуоресценции. Подобные двумерные массивы данных называются матрицами возбуждения-эмиссии. (*) – оборудование предоставлено ИМТЦ, Новосибирск.

Результаты и обсуждение. Получены матрицы возбуждения-эмиссии полотна, суспензии клеток BHK IR, клеточной среды ДМЕМ и полотна, заселенного клетками. Перед анализом полотно с клетками отмывали в физиологическом растворе. Матрица полотна скаффолда имеет сложную форму и множество максимумов флуоресценции, спектры зависят от длины волны возбуждения. В связи с этим определить основное количество флуоресцирующий компонент в нем невозможно. Спектры флуоресценции суспензии клеток и клеточной среды так же зависят от длины волны возбуждения, а максимум флуоресценции в области 330 нм связан с высокой концентрацией флуорофора – триптофана. При этом, возможно, матрица возбуждения-эмиссии суспензии клеток во многом определяется наличием питательной среды: спектры флуоресценции практически совпадают, хотя спектры возбуждения отличаются в коротковолновой области достаточно сильно. Спектр флуоресценции полотна скаффолда, заселенного клетками, имеет выраженный максимум в области 305 нм, а так же плечо от 400 до 580 нм. Для поиска диагностических критериев можно сравнивать полученные матрицы, как по особенностям возбуждения, так и флуоресценции. Наиболее удобно при этом сравнивать формы непосредственно спектров флуоресценции, полученные с использованием некоторой оптимальной длины волны возбуждения. Для этого для каждой длины волны возбуждения в диапазоне от 210 до 340 нм было проведено сравнение нормированных на максимум спектров флуоресценции полотна скаффолда, суспензии клеток BHK IR и полотна, заселенного клетками. При длинах волн возбуждения в диапазоне от 230 до 290 нм спектры флуоресценции полотна, заселенного клетками, имеют явно выраженный максимум в области 305 нм по сравнению со спектрами незаселенного полотна и суспензии клеток. Кроме того, спектр заселенного полотна имеет повышенную интенсивность флуоресценции в диапазоне 400-580 нм на тех же длинах волн возбуждения. Сравнение на длине волны возбуждения 250 нм, отражает повышение интенсивности флуоресценции заселенного клетками полотна в области 400-580 нм также хорошо видно для длин волн возбуждения 300-340 нм.

Выводы. Используя данные о спектрах флуоресценции образцов для различных длин волн возбуждения, можно дифференцировать по-

лотно скаффолда незаселенного и заселенного клетками BHK IR. Прежде всего, для диапазона возбуждения 230-290 нм в спектрах флуоресценции заселенного клетками полотна присутствует пик на 305 нм, который может быть использован для дифференциации образцов. Также заметно повышение интенсивности флуоресценции заселенного полотна в области 400-580 нм при возбуждении 230-340 нм. Наиболее подходящей для дифференцировки может считаться длина волны 250 нм, которой свойственны высокая интенсивность сигнала, а также наиболее заметные различия между разными типами образцов.

Благодарность: При поддержке РФФИ, Грант 15-29-04849.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кирилова И.А., Садовой М.А., Подорожная В.Т. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства / И. А. Кирилова, М. А. Садовой, В. Т. Подорожная // Хирургия позвоночника.– 2012.– № 3.– С. 72-83.
2. Создание тканеинженерного эквивалента костной ткани и перспективы его использования в травматологии и ортопедии / П. М. Ларионов, М. А. Садовой, А. Г. Самохин и др. // Хирургия позвоночника.– 2014.– № 3.– С. 77-85.
3. Influence of mineral components on laser-induced fluorescence spectra of calcified human heart-valve tissues / P. M. Larionov, V. S. Shchukin, A. N. Malov et al. // Applied Optics.– 2000.– Т. 39, № 22.– P. 4031-4036.
4. Изменение спектра лазерно-индуцированной флуоресценции ткани миокарда по мере снижения ее жизнеспособности / П. М. Ларионов, А. Н. Малов, М. М. Мандрик и др. // Журнал прикладной спектроскопии.– 2003.– Т. 70, № 1.– С. 38-42.
5. Морфологическая оценка цитоархитектоники аортального графта на этапах биотехнологии с анализом изменений спектров лазерно-индуцированной флюоресценции / Д. В. Субботин, П. М. Ларионов, Д. С. Сергеевичев и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине.– 2009.– № 4.– С. 191-196.

OPTICAL CONTROL FOR BIOTECHNOLOGY SCAFFOLD OF BONE REGENERATION BASED ON LASER-INDUCED FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

Larionov P. M.[1,3], Maslov N. A.[2,3], Papaeva E. O.[2,3], Tereshchenko V. P.[1], Khlestkin V. K.[3], Bogachev S. S.[3], Proskurina A. S.[3], Titov A. T.[3], Filipenko M. L.[3], Pavlov V. V.[1], Kudrov G. A.[1], Orishich A. M.[2]

[1]Federal State Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics; [2]Khristianovich Institute of Theoretical and Applied Mechanics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; [3]National Research Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

One of the main unsolved problems in traumatology and orthopedics is reconstruction of critical-sized segmental bone defects. We believe that implementation of noninvasive monitoring of the bioengineering stages for cell-mediated bone scaffold by laser-induced fluorescence (LIF) can become a positive aspect in mastering this technique. An electrospun scaffold model (parameters: 10 % wt polycaprolactone; 5 % wt type A gelatin; mean fiber diameter 877.1±169.1; and contact angle 45.3°) seeded with BHK IR cell line (182±38 cells/mm2) was used to show the principal possibility of differentiating between the scaffold seeded and unseeded with cells. First of all, the fluorescence spectra of the cell-seeded scaffold contain a peak at 305nm for the excitation range of 230-290nm, which can be used to differentiate between the samples. An increase in fluorescence intensity of the cell-seeded scaffold in the range of 400-580nm upon excitation at 230-340nm is also noticeable. The wavelength of 250nm is characterized by high signal intensity and is most suitable for differentiation between the samples.

Keywords: scaffold, laser-induced fluorescence.

Раздел 14
КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЕМБРАНЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ ФЕРТИЛЬНЫХ МУЖЧИН ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Плосконос М. В.[1,2]

[1]ГБОУ ВПО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России; [2]Каспийский институт морского и речного транспорта — филиал ФГБОУ ВО ВГУВТ, Астрахань, Россия

Целью работы являлось изучение биохимических изменений в мембране сперматозоидов, связанных с динамикой экспрессии фосфатидилсерина (ФС) в ответ на криоконсервацию. Экспрессию ФС на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны сперматозоидов 18 фертильных мужчин выявляли при помощи конъюгированного с флуорохромом белка аннексина-V в комбинации с йодидом пропидия (PI) до криоконсервации (контроль) и после (опыт). Выявлено, что после криоконсервации большая часть живых здоровых сперматозоидов погибает в результате некроза, не экспрессируя ФС, а живые, экспрессирующие ФС клетки (ранний апоптоз), погибают, приобретая двойное окрашивание (поздний апоптоз). Выявление экспрессии ФС может использоваться как маркёр для изучения влияния криоконсервации на жизнеспособность сперматозоидов при прогнозировании результатов криоконсервирования спермы.

Ключевые слова: сперматозоиды, криоконсервация, фосфатидилсерин, апоптоз.

Криоконсервация спермы часто используется с целью её хранения для дальнейшего искусственного оплодотворения или перед проведением химио- и лучевой терапии, а также других видов лечения, связанных с изменением сперматогенеза. В течение замораживания/оттаивания сперматозоиды подвергаются огромному стрессу, в результате чего может происходить изменение морфологии, уменьшение подвижности и жизнеспособности половых клеток и уменьшение способности к оплодотворению [1].

Стресс, вызванный криоконсервацией, может привести к нарушению свойств клеточной мембраны сперматозоида, выражающемуся в биохимических изменениях в мембране, в частности, в изменениях в динамике липидов. Следовательно, состояние клеточной мембраны играет ключевую роль для выживания сперматозоида после криоконсервации.

Поэтому важной проблемой в современной репродуктологии, связанной с необходимостью длительного хранения полноценной спермы для использования её в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), таких как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) или интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), является восстановление и определение жизнеспособности и функциональных характеристик сперматозоидов после размораживания спермы.

Одним из необходимых условий жизнедеятельности всех клеток, в том числе и половых, является поддержание асимметрии липидов клеточной мембраны: присутствие фосфатидилхолина и сфингомиелина в наружном слое мембраны, а фосфатидилсерина (ФС) – исключительно во внутреннем слое.

Одним из самых ранних биохимических изменений, происходящих в мембране клетки, подвергшейся гибели путём апоптоза, является нарушение асимметрии липидов мембраны и экспрессия ФС на её внешнюю сторону, детектировать которую возможно при помощи конъюгированного с флуорохромом белка аннексина-V (AnV-FITC), специфически связывающегося с ФС («аннексиновый» метод) [2].

Изменение в клеточной мембране в ходе апоптоза так же включает повышение её проницаемости для йодида пропидия (PI). Однако в динамике развития апоптоза потеря мембранной асимметрии соответствует начальным этапам апоптоза (ранний апоптоз) и предшествует потере проницаемости мембраны для PI. На этой стадии апоптотические клетки связывают AnV, но, как и живые клетки, непроницаемы для PI ((AnV^+/PI^-)-сперматозоиды) [3, 4].

Данные литературы, в основном зарубежной, о влиянии криоконсервации на экспрессию ФС, как раннего маркёра апоптоза, очень неоднозначны, что диктует необходимость расширения работы в этом направлении. Отечественных работ, посвящённых изучению данного вопроса, в доступной литературе не встречалось. Поэтому представляло интерес оценить биохимические изменения в мембране сперматозоидов, связанные с динамикой экспрессии ФС в ответ на криоконсервацию.

Образцы эякулятов 18 фертильных мужчин (измерение показателей стандартной спермограммы проводили в соответствии с рекомендациями и нормативами ВОЗ) [5] после полного разжижения делили на две части: одна часть (контроль, до замораживания) исследовалась на морфологические, функциональные критерии качества и на экспрессию ФС. Производился подсчёт количества (AnV^-/PI^-)-, (AnV^+/PI^-)-, (AnV^+/PI^+)- и (AnV^-/PI^+)-сперматозоидов методом флюоресцентной микроскопии. Вторая часть эякулята подвергалась замораживанию и после оттаивания (опыт) были исследованы критерии качества эякулята и экспрессия ФС.

Замораживание/размораживание проводили по стандартной схеме. Образцы эякулятов хранились в жидком азоте при температуре –196 °С в течение 48-72 ч. В качестве криоконсервантов применяли стерильную среду для замораживания (Sperm Freeze, Belgium), которую используют в практике ВРТ. Определение жизнеспособности, подвижности сперматозоидов и выявление маркёра апоптоза ФС осуществляли сразу после размораживания.

Было выявлено, что в сравнении со свежевыделенными сперматозоидами мужчин с нормальной фертильностью, после криоконсервации сперматозоидов происходило не только достоверное уменьшение подвижности и жизнеспособности половых клеток ($p<0,001$), но и изменение структурно-биохимического состояния мембран клеток, связанное с экспрессией ФС на внешнюю сторону мембраны спермия. Это выражалось в количественном содержании сперматозоидов, связывающих аннексин-V.

Так, после оттаивания спермы наблюдалось достоверное ($p<0,001$) уменьшение процентного содержания и живых неокрашенных (AnV^-/PI^-)-сперматозоидов и живых окрашенных, экспрессирующих ФС (AnV^+/PI^-)-клеток. Выявлено, что большая часть живых неокрашенных (AnV^-/PI^-)-сперматозоидов после криоконсервации погибает в результате некроза, о чём свидетельствует увеличение доли (AnV^-/PI^+)-клеток, хотя небольшая доля (AnV^-/PI^-)-сперматозоидов становится всё же аннексин-V-положительными (AnV^+PI^-)-клетками.

В то же время живые, экспрессирующие ФС (AnV^+/PI^-) – сперматозоиды (ранний апоптоз), погибли в процессе замораживания/оттаивания и приобрели двойное окрашивание, став (AnV^+/PI^+)-клетками (поздний апоптоз). Что касается количественного соотношения, то переход количества живых (AnV^-/PI^-)-клеток в ранние апоптотические (AnV^+/PI^-)-клетки, меньше, чем переход последних в поздние апоптотические (AnV^+/P^{I+})-клетки.

Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют о том, что выявление экспрессии ФС при помощи окрашивания клеток аннексином-V в комбинации с PI, может использоваться как новый маркёр для изучения влияния криоконсервации на жизнеспособность сперматозоидов и дать дополнительную информацию для прогнозирования результатов криоконсервирования спермы с целью дальнейшего использования в программах ВРТ не только свежих сперматозоидов, но и после криоконсервации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation / E. T. Donnelly, E. K. Steele, N. McClure et al. // Hum. Reprod.– 2001.– V. 16.– P. 1191-1199.
2. Плосконос М. В. Мембранная экстернализация фосфатидилсерина сперматозоидов фертильных и субфертильных мужчин. В сборнике: Перспективы развития науки и образования. Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 29 ноября 2013 г. В 7 частях. ООО «АР-Консалт». Москва, 2013.– С. 73-75.

3. Плосконос М. В. Методы определения апоптоза сперматозоидов (Обзор литературы) / М. В. Плосконос // Клин. лаб. диаг.– 2013.– № 4.– С. 3-8.
4. Плосконос М. В. Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека / М. В. Плосконос // Клин. лаб. диаг.– 2014.– Т. 59.– № 11.– С. 22-25.
5. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – 5th ed. – WHO (Geneva), 2010. – V. 270.

BIOCHEMICAL CHANGES IN THE SPERM MEMBRANE OF FERTILE MALE AFTER CRYOPRESERVATION

Ploskonos M. V.[1,2]

[1]Astrakhan State Medical University Health Ministry of Russian Federation;
[2]Volga State University of Water Transport Caspian Institute of Sea and River Transport, Astrakhan, Russia

The aim of the work was to study the biochemical changes in the membrane of the sperm associated with the expression of the dynamics of phosphatidylserine (PS) in response to cryopreservation. Expression of PS on the outer side of the cytoplasmic membrane of sperm 18 fertile men were detected using Annexin-V conjugated to the protein in combination with fluorochrome propidium iodide (PI) prior to cryopreservation (control) and after (experience). It was revealed that after cryopreservation big part of living a healthy sperm is killed as a result of necrosis, not expressing PS and lively, expressing cells PS (early apoptosis), die, getting double staining (late apoptosis). Identification PS expression can be used as a marker to study the effects of cryopreservation on sperm viability in predicting the results of sperm cryopreservation.

Keywords: spermatozoa, cryopreservation, phosphatidylserine, apoptosis.

Раздел 15
НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СОЗДАНИИ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОСТЕЗАМЕЩАЮЩЕГО МАТЕРИАЛА «РЕКОСТ»

Новиков А. Е., Новиков А. В.

ФГБУ «Приволжский Федеральный Медицинский Исследовательский Центр» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

В статье представлены этапы создания и испытаний нового костнозамещающего препарата. Целью работы было создание нового пластического материала для замещения костных дефектов, обладающего биосовместимостью, остеокондукцией, остеоинтеграцией и возможностью моделирования. Сформулированы требования к разрабатываемому медицинскому изделию. Были проведены доклинические и клинические испытания, результатом которых стала регистрация материала. Исследования показали, что костезамещающий материал «Рекост» обладает хорошей биосовместимостью, остеокондукцией и остеоинтеграцией. Предварительные клинические результаты его применения подтверждают его безопасность. Представлены результаты клинического применения материала у 98 пациентов с дефектами костной ткани, в т.ч. после сегментарных резекций длинных трубчатых костей.

Ключевые слова: костнозамещающий, сегментарная резекция, костный дефект.

Целью нашей работы было создание нового пластического материала для замещения костных дефектов, обладающего биосовместимостью, остеокондукцией, остеоинтеграцией и возможностью моделирования. Прототипом послужил американский костнозамещающий материал «Криптонит» [1]. Были сформулированы определенные требования к вновь разрабатываемому материалу, который должен обеспечить:

1. Возможность замещения крупных костных дефектов с их моделированием;
2. Прочностные характеристики близкие к нативной кости;
3. Безопасность работы для хирурга;
4. Оптимальное соотношение цены и качества.

В результате совместной работы с предприятием «АйконЛаб» (г. Нижний Новгород) был создан костнозамещающий материал «Рекост» – частично биодеградируемый и биосовместимый полимер полиуретанового ряда, полученный из полиоксипропиленгликоля со средней молекулярной массой 1000, 4,4-диизоцианатодифенилметана и глицерина [2]. Технические преимущества вновь созданного материала заключались в возможности моделирования сложных поверхностей за счет его пластичности и склеивания костных фрагментов за счет высоких адгезивных свойств материала к металлу и костной ткани.

Материалы и методы. Исследования цитотоксичности нового материала были проведены в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-2009. Установлено, что образцы материала «Рекост» не нарушают процессы адгезии, не влияют на процессы пролиферации и на синтез фибронектина клетками соединительной ткани в культуре. Результаты экспериментов на половозрелых беспородных белых крысах и кроликах показали отсутствие подострой и субхронической токсичности, раздражающего и сенсибилизирующего действия материала, его генотоксичности и канцерогенности, подтвердили его высокие остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства.

После получения разрешения Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения (№ 18/2013 от 18.06.2013) были начаты клинические испытания разработанного материала. В группу исследования вошли лица обоего пола в возрасте от 18 до 60 лет с наличием костного дефекта после удаления доброкаче-

ственного образования, диагноз которого был подтвержден гистологически. Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинской Декларации 1964 года, в новой редакции, принятой в Сеуле в 2008 году.

Клинические испытания завершились регистрацией полимерного костнозамещающего материала (Удостоверение № РЗН 2014/1646 от 03.07.2014).

В ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России прооперировано 98 пациентов с замещением дефектов разработанным материалом «Рекост».

Подавляющее большинство составляли пациенты с доброкачественными опухолевыми поражениями костей – 65 человек. У 39-ти диагностирована энхондрома, у 19-ти гигантоклеточная опухоль (доброкачественная ОБК). У прочих были выявлены ксантома, неостеогенная фиброма и костные кисты. После верификации диагноза выполнялись внутрикостные резекции, обработка полости и её пластика материалом «Рекост». В ряде случаев, при значительных объёмах дефекта, материал применялся в композиции с костной «аллостружкой». При необходимости выполнялся «шунтирующий» профилактический остеосинтез. Пациенты жалоб не предъявляли, побочных реакций не выявлено.

Злокачественные поражения костей были у 33-х пациентов. В 9-ти случаях выявлена хондросаркома, в 6-ти – остеогенная саркома. Прочие были представлены метастатическими поражениями рака молочной железы, лёгких, почек и матки. После верификации диагноза, в согласовании с коллегами онкологического диспансера, выполнялись сегментарные резекции поражённых костей. Радикальность резекции подтверждалась интраоперационным экспресс-исследованием материала с торцов опила. Дефекты замещались индивидуальными трубчатыми имплантатами «Рекост-М», изготовленные методом непрямой 3D-печати, которые фиксировались с помощью стандартных интрамедуллярных стержней и двухкомпонентного клея-цемента «Рекост» [3].

Результаты. Результаты прослежены у 46 пациентов в сроки от 6 до 12 месяцев. Пациенты жалоб не предъявляли, побочных реакций не выявлено. Все, перенёсшие вмешательства по поводу доброкачественных новообразований, вернулись к привычному образу жизни и труду в сроки, не превышающие 2 месяца.

Больные, коим выполнялись сегментарные резекции по поводу злокачественных поражений, вернулись к трудовой деятельности в единичных случаях. Однако, опороспособность нижних конечностей была восстановлена. Лишь в половине случаев была необходимость в дополнительной опоре. Качество жизни пациентов с метастатическими поражениями опорно-двигательного аппарата страдало минимально. То же можно сказать и о пациентах, перенесших радикальные операции на верхних конечностях. Остаточная функция – 75-85 % (по классификации Эннекинга).

Осложнения были у двух пациентов: позднее нагноение после внутрикостной резекции кисты пяточной кости и чрезвертельный перелом после удаления хондромы означенной области. Первое мы связываем с нарушением хирургической техники и принципов послеоперационного ведения пациента, а не с использованием материала. Второе же с избыточной массой тела пациентки, фактом травмы – падения и отказом от профилактического «шунтирующего» остеосинтеза [4].

Заключение. Таким образом, полученный из полиоксипропиленгликоля, костезамещающий материал «Рекост» обладает хорошей биосовместимостью, остеокондукцией и остеоинтеграцией. Предварительные клинические результаты его применения подтверждают его безопасность. Материал может применяться и уже применяется для замещения как незначительных костных дефектов, например при внутрикостных резекциях, так и обширных сегментарных дефектах, заменяя дорогостоящие онкологические протезы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The expansive properties of Kryptonite relating to cranioplasty / G. D. Doumit, E. Meisler, J. Sidaoui et al. // J. Craniofac Surg.– 2014.– V.25(3). P. 880-883.
2. Костно-замещающий материал / Ю. Н. Колмогоров, И. В. Успенский, А. Ю. Слиняков, А. Е. Новиков.– Патент на изобретение RUS 2518753 C 1 от 10.06.2014.
3. Костнопластические остеоиндуктивные материалы в травматологии и ортопедии / М. В. Лекишвили, Е. Д. Склянчук, В. С. Акатов и др. // Журнал клинической и экспериментальной ортопедии им. Г. А. Илизарова.– 2015.– № 4.– С. 61-67.
4. Терсков А. Ю., Иванов В. В., Николаенко А. Н. Остеосинтез в хирургическом лечении больных с опухолями костей / А. Ю. Терсков, В. В. Иванов, А. Н. Николаенко // Онкохирургия.– 2013.– V.5. № 3.– С. 22-25.

THE RESULTS OF APPLICATIONS OF BONE REPLACING MATERIAL "RECOST"

Novikov A. E., Novikov A. V.

"Privolzhsky Federal Medicine Research Centre" Ministry of Health of Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia

The stages of the development and testing of the new bone replacing material are presented in the article. The aim of the research is the development of the new plastic material having such properties as biocompatibility, osteoconduction, osteointerity and ability to remodeling for replacing the bone defects. The demands to the medicine product have been formulated. Pre-clinical and clinical testing was performed and the result is the official registration of the material. "Recost" is proved to have adequate biocompatibility, osteoconduction, osteointerity. The preliminary clinical results of its application confirm its safety. The results of clinical application of the material in 98 patients with the bone tissue defects including those after segmental resections of long tubular bones are presented in the article.

Keywords: bone replacing, segmental resection, bone defect.

НОВЫЙ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Щербаков Д. А.[1], Шангина О. Р.[2], Хасанов Р. А.[2]

[1]Кафедра ЛОР-болезней ГБОУ ВПО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, Тюмень; [2]Тканевой банк ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии», Уфа, Россия

В статье представлено описание процесса изготовления новых диспергированных хрящевых биоматериалов, изготовленных в тканевом банке ФГБУ Всероссийский центр глазной и пластической хирургии МЗ РФ. Проанализированы результаты экспериментально-морфологических и клинических исследований технологии синус-лифтинга с применением диспергированного хрящевого аллотрансплантата. Показано соответствие исходов заместительной регенерации в случае подсадки различных по гистогенетическому происхождению биоматериалов. В случае применения нового остеопластического материала наблюдается более выраженный прирост костной ткани за счет меньшей потери объема биоматериала.

Ключевые слова: хрящевой аллотрансплантат, остеопластический биоматериал, синус-лифтинг.

Введение. Разработка новых видов остеопластических материалов является одной из актуальных проблем клинической медицины. Необходимость восполнения дефицита костной ткани постоянно возникает при выполнении различных вариантов имплантации [1, 2].

Материалы и методы. В тканевом банке ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» (г. Уфа) разработана технология изготовления нового остеопластического материала [2]. Для изготовления указанного биоматериала донорский хрящ первоначально подвергается многоступенчатой физико-химической обработке по технологии ALLOPLANT®, которая позволяет достигнуть мембранолиза и экстракции наиболее иммуногенных компонентов ткани, с сохранением коллагенового каркаса и биологически активных компонентов аморфного матрикса. Запатентованный ALLOPLANT®-процесс является научным методом консервации и стерилизации различных кадаверных соединительных тканей для хирургического использования (Пат. № 2189257, Россия). Принципиальной

особенностью биоматериалов, приготовленных по данной технологии, является низкая антигенность, выраженная стимуляция регенерации, обеспечивающая селективный рост тканей реципиента с постепенным замещением трансплантата и предотвращение рубцевания в зоне трансплантации.

Далее обработанный хрящ подвергается измельчению. Известно, что биологические ткани чувствительны к механическим и температурным воздействиям. Нами предложена щадящая технология высушивания, измельчения и фракционирования хряща. Высушивание производится методом лиофилизации на вакуумной сублимационной установке, позволяющей сохранить термолабильные компоненты ткани (белки, гликозаминогликаны). Использование высокоскоростных мельниц и применение принудительного охлаждения (жидкий азот, углекислота) позволяет максимально сохранить фиброархитектонику и специфическую биологическую активность хряща. Измельченный материал помещается в установку для рассева с целью получения фракций с заданным размером частиц (50-100 мкм).

Полученный таким образом диспергированный хрящ обладает высокой биологической активностью за счет большой удельной поверхности, создающей более благоприятные условия для экстракции веществ из матрикса биоматериала в зоне введения.

Следующим этапом на базе отдела морфологии Всероссийского центра глазной и пластической хирургии выполнены доклинические исследования нового остеопластического материала на 28 кроликах породы Шиншилла. Авторы работы руководствовались «Европейской конвенцией относительно защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальными и другими научными целями» (Страсбург, 1986). Моделировалась операция синус-лифтинга, сформированное между альвеолярным отростком верхней челюсти и слизистой оболочкой верхнечелюстной пазухи пространство заполнялось диспергированным костным аллотрансплантатом (в первой опытной серии) и диспергированным хрящевым аллотрансплантатом (во второй опытной серии). В контрольной серии, полученное пространство заполнялось кровяным сгустком за счет локального капиллярного кровотечения. Затем производилось ушивание слизистой преддверья рта. На 45-е, 90-е и 180-е сутки эксперимента выполнялся забор материала. Проводилась морфометрия и статистическая обработка Statistica 13.0. Применялся параметрический метод (*t*-критерий Стьюдента для независимых групп). Для оценки качества полученного регенерата использовался показатель объема губчатой кости, представляющий собой отношение площади костной ткани к исследуемой площади гистологического препарата, выраженное в процентах [1].

Клиническое внедрение проводилось на базе клиники ООО «Эскулап – Новый век» г. Санкт-Петербург (главный врач, к.м.н. Штеренберг Д. Г.). 42 пациентам (средний возраст 37,7 лет) проводилась операция синуслифтинга с применением диспергированного хрящевого аллотрансплантата. Результаты оценивались через шесть месяцев и один год по данным конусно-лучевой компьютерной томографии.

Результаты и обсуждение. Доклинические испытания на животных показали, что в контрольной серии на 45-е сутки в области выполненной отслойки слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи наблюдалась пролиферация рыхлой неоформленной соединительной ткани. В финале репаративных процессов на 180-е сутки обнаруживается незначительная пролиферация ретикулофиброзной костной ткани.

В первой опытной серии на 45-е сутки в области синус-лифтинга костным материалом в инфильтрате обнаруживаются вторичные остеобласты и остеокласты. В отдаленные сроки эксперимента (180-е сутки) определяется ретикулофиброзная костная ткань. При этом объем полученного регенерата составляет лишь 67±9,2 % от изначального объема костного материала.

Во второй опытной серии на 45-е сутки среди клеток инфильтрата в области подсадки не определялись остеокласты. Костное ложе реагировало на трансплантат пролиферацией рыхлой неоформленной соединительной ткани. На 180-е сутки в области синус-лифтинга также определяется ретикулофиброзная костная ткань с высоким относительным объемом полученного регенерата (87±7,7 %, p=0,042).

У кролика в норме показатель объема губчатой кости варьирует от 46 до 66 %. В контрольной серии объем губчатой кости регенерата был равен 43,3±12,1 %, однако отсутствовало статически значимое увеличение высоты аль-

веолярного отростка (p=0,064), а в опытных сериях показатель объема губчатой кости составлял 47,7±12,7 % (p=0,055) со значительным приростом объема костной ткани при использовании нового остеопластического материала.

В клинической части исследования у всех 42 пациентов достигнута первичная фиксация имплантов, даже в случае одномоментной имплантации в сроки до трех с половиной лет. Плотность костного регенерата, полученного через полгода после синус-лифтинга с использованием нового остеопластического материала по данным конусно-лучевой компьютерной томографии, составила 505±84,3 HU (в норме в альвеолярном отростке верхней челюсти 396±102HU [1], p<0,05). Также была отмечена устойчивость измельченного хрящевого аллотрансплантата к гноеродной инфекции при его использовании во время хирургического закрытия ороантральных фистул [4].

Заключение. Использование нового остеопластического материала позволяет значительно увеличить объем костной ткани. Измельченный хрящевой аллотрансплантат при подсадке под мембрану Шнайдера с целью увеличение объема костной ткани альвеолярного отростка верхней челюсти замещается ретикулофиброзной костной тканью. При этом объем полученного регенерата статистически значимо больше (p=0,042) в сравнении с костным аналогом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jensen O. T. The Sinus Bone Graft / O. T. Jensen.– New York: Quintessence Pub Co, 2006.– 205 p.
2. Сельский Н. Е. Применение биоматериалов «Аллоплант» в челюстно-лицевой хирургии / Н. Е. Сельский.– Уфа: Здравоохранение Башкортостана, 2000.– 224 с.
3. Способ восполнения костных дефектов / Э. Р. Мулдашев, Р. Т. Нигматуллин, Д. А. Щербаков, О. Р. Шангина и др.– Патент на изобретение RUS 2511455 от 30.03.2012.
4. Щербаков Д. А., Мусина Л. М., Лукманов В. И. Закрытие ороантральной фистулы с использованием аллотрансплантатов / Д. А. Щербаков, Л. М. Мусина, В. И. Лукманов // Институт стоматологии.– 2012.– Т. 2, № 55.– С. 92-93.

NEW OSTEOPLASTIC MATERIAL

Shcherbakov D. A.[1], Shangina O. R.[2], Hasanov R. A.[2]

[1]Department of ENT-diseases of Tumen State medical university, Tumen;
[2]Russian eye and plastic surgery center, Ufa, Russia

The article describes the process of manufacturing new dispersed cartilaginous biomaterials produced in the tissue bank of the Russian eye and plastic surgery center. The results of experimental and clinical studies of the sinus lifting techniques with the use of crushed cartilage allograft. The correspondence substitution regeneration outcomes in the case of replanting different histogenetic origin biomaterials. In the case of new osteoplastic graft seen a more pronounced increase in bone loss due to the lower volume of biomaterial.

Keywords: sinus lift, cartilage allograft.

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ИННОВАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КОСТНОЙ ПЛАСТИКИ

Алейник Д. Я.[1], Федюшкин И. Л.[2], Чесноков С. А.[2], Юдин В. В.[2], Менсов С. Н.[2], Чарыкова И. Н.[1]

[1]ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России; [2]ФГБУН Институт металлоорганической химии им. Г. А. Разуваева РАН, Нижний Новгород, Россия

Разработаны оригинальные методы получения полимерных материалов, предназначенных для костной пластики. Методами полимеризации и фотополимеризации получены как монолитные биоразлагающиеся материалы из поли-L-лактида (плёнки и стержни), так и пористые, в том числе многослойные с использованием 3D-процесса, материалы с системой открытых взаимосвязанных пор. Подобраны и апробированы простые и доступные способы стерилизации и показано отсутствие цитотоксичности полученных образцов. Проведенная работа открывает перспективы для проведения доклинических исследований на животных.

Ключевые слова: биодеградируемые полимеры, пористые полимеры, костнопластические материалы, культура клеток.

Создание современных костнопластических материалов остается актуальной задачей. По некоторым данным потенциальная потребность отечественного здравоохранения в остеопластических материалах составляет более 160-220 тыс. единиц в год. Одно из современных направлений разработки биопластических материалов – получение полимерных биоактивных материалов, превосходящие металлы металлами и керамику такими качествами, как биодеградируемость, возможность синтеза пористых имплантатов с функционализированной поверхностью пор, доступность исходных компонентов, технологичность получения.

Основные требования к костопластическим материалам: прочность, пористость, моделируемость, резорбируемость, остеокондуктивность, остеоиндуктивность. И если проблема обеспечения прочностных характеристик, близких к свойствам костной ткани, в основном решена, то при получении материалов с заданной пористостью возникают значительные сложности. Необходим материал с системой открытых связанных пор размером 50-150 мкм. Соответственно, для создания пористого костного имплантата на основе аддитивных технологий (SLA, FDM, SLS) нужны устройства и материалы, обеспечивающие разрешение не менее 5-10 мкм, уникальные и дорогостоящие.

Цель работы – разработка новых методов получения биодеградируемого монолитного и пористого биопластических полимерных материалов, отработка методов их стерилизации и оценка цитотоксичности для подготовки материалов к последующим этапам доклинических исследований.

Материалы и методы исследований. Пористые материалы получали фотополимеризацией под действием видимого света композиций на основе промышленных диметакрилатов ТГМ-3 и ОКМ-2. Возникновение пор обеспечивалось за счёт введения в состав композиций порагентов, которые из готового пористого полимерного монолита удаляли вакуумированием. Синтез тёхмерного полимерного объекта с заданной геометрией проводили методом стереолитографии на лабораторной установке. Объект выращивался из монослоя композиции, сформированного на прозрачном к актиничному излучению дне реактора.

Полилактид (полимолочная кислота, PLA) получали полимеризацией с раскрытием цикла (ROMP) L-лактида (производитель компания PURAC) на магнийорганическом катали-

заторе в растворе. По завершении реакции (конверсия мономера > 95 %) полимер высаживали из реакционной смеси диэтиловым эфиром, фильтровали и сушили в вакууме при комнатной температуре. Полученный поли-L-лактид представляет собой белый аморфный порошок со среднечисловой молекулярной массой до 2×10^5. Образцы из полилактида для исследования цитотоксичности – тонкие пленки и стержни диаметром 4 мм – готовили термоформованием.

Одним из ключевых моментов подготовки материалов для клинической практики является возможность и выбор метода стерилизации. Поэтому использовали несколько вариантов стерилизации: паровую, плазменную и отмывание в физиологическом растворе с антибиотиками.

Исследование на цитотоксичность проводили на основе ГОСТ Р ИСО 10999.5-99. В качестве тестовых использовали культуры дермальных фибробластов человека. Применяли метод прямого контакта, так как материал предназначен для длительного контакта с кровью и тканями. Клетки засевали с концентрацией 20 тыс./см^2. Каждые 24 часа после начала взаимодействия с помощью световой и фазовоконтрастной микроскопии оценивали морфологические характеристики самих клеток и состояние монослоя. По окончании исследования определяли концентрацию и жизнеспособность клеток в опытных и контрольных сериях на счетчике Countes. Часть серий окрашивали Азур-Эозином по Романовскому.

Результаты и обсуждение. Первое требование к полимерному костнозамещающему материалу – отсутствие цитотоксичности. Для синтеза таких материалов наиболее предпочтительно использовать полимеры, которые либо биодеградируют до нетоксичных продуктов, либо являются инертными по отношению к живой ткани. В наших исследованиях мы использовали оба варианта. Известно, что диметакриловые мономеры образуют сшитые полимеры, не растворимые в органических растворителях и устойчивые к кислотам и щелочам. Данные мономеры использованы нами для фотолитического синтеза пористых полимерных монолитов. Отличительной особенностью предложенного подхода является то, что при фотополимеризации реализуются процессы самоформирования в полимере пористых структур заданного размера. Получены полимерные монолиты с размером пор до 100 мкм и пористостью 60-70 %. Персонифицированный костный имплантат имеет заданную геометрию и может быть синтезирован как многослойный объект методом стереолитографии. Соответственно, при изготовлении многослойного пористого объекта первой проблемой является обеспечение взаимосвязанности пор между всеми слоями. Нами реализован стереолиторгафический процесс аддитивного формирования трёхмерного пористого образца со слоями толщиной 0.5-3.0 мм. Получены многослойные полимерные образцы сложной геометрии с единой системой взаимосвязанных открытых пор.

Проведенное исследование первых опытных образцов материалов продемонстрировало выраженную цитотоксичность образцов из пористых материалов и отсутствие цитотоксичности у образцов из полилактида. В опытных сериях с образцами из пористых полимеров фиксировалась гибель клеток по всей поверхности культурального сосуда, клетки деформировались, отростки укорочены или отсутствовали, ядра пикнотичны, цитоплазма вакуолизирована. В опытных сериях с образцами из полилактида, как и в контрольных сериях, клетки имели фибробластоподобную форму, отростки выражены, ядра плотные, цитоплазма гомогенна, сформирован характерный монослой.

В результате изменена технология подготовки, как составных компонентов пористых материалов, так и готовых образцов. Все компоненты фотополимеризующихся композиций – мономеры, фотоинициаторы, порагенты – прошли дополнительную очистку, увеличено время удаления порагента из готового пористого материала, ввели дополнительно процедуру промывки материала в физиологическом растворе.

После изменения технологии в процессе наблюдения, как в опытных, так и контрольных сериях отмечено отсутствие цитотоксичности.

Заключение. Разработана технология получения биодеградируемого и пористого полимерных материалов с заданными свойствами, в том числе многослойных пористых образцов. Апробированы методы стерилизации и проведена проверка цитотоксичности образцов. Разработанные материалы подготовлены и перспективны для дальнейшего исследования.

DEVELOPMENT AND IN VITRO INVESTIGATION OF NEW BONE REPLACEMENT MATERIALS

Aleynik D. Ya.[1], Fedushkin I. L.[2], Chesnokov S. A.[2], Yudin V. V.[2], Mensov S. N.[2], Charykova I. N.[1]

[1]FBI «PFRMC» of the Ministry of Health of the Russian Federation; [2]G. A. Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, Russia

A new procedure for obtaining polymeric materials for bone plastic is presented. Biodegradable solid materials from poly -L- lactide (films and rods) and the porous multilayer materials including using 3D- process materials with a system of open interconnected pores were prepared by polymerization and photopolymerization methods. Simple and available methods of sterilization was selected and tested. The new materials are shown to be non-toxic to human dermal fibroblast cultures *in vitro*. The work opens prospects for the researching on animals.

Keywords: biodegradable polymer, porous polymeric materials, bone replacement materials, cell cultures.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПОЗИТА СВЕРХВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИЭТИЛЕНА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ХРЯЩЕВОГО БИОИМПЛАНТАТА

Киселевский М. В.[1], Анисимова Н. Ю.[1], Лебединская О. В.[2], Копылов А. Н.[1]

[1]ФГБУ «РОНЦ им Н. Н. Блохина» РАМН, Москва; [2]ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е. А. Вагнера» МЗ России, Пермь, Россия

Целью данной работы являлось исследование биологических и механических свойств материала, изготовленного из сверхвысокомолекулярного полиэтилена (СВМПЭ). Исследования механических свойств показали, что материал, приготовленный из СВМПЭ с использованием механической активации и с добавкой Al_2O_3, обладает самыми высокими механическими характеристиками, в частности, наибольшей стойкостью к истиранию по сравнению с образцами СВМПЭ без добавки Al_2O_3 и не подвергнутого механической активации. Через 60 суток после ортотопической трансплантации образцов из данного материала крысам было отмечено отсутствие каких-либо признаков воспаления, клеточной инфильтрации, разрушения образца и дальнейшего разрушения костно-хрящевого дефекта. Образец оставался на месте имплантации без смещений. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования СВМПЭ в качестве материала для создания имплантатов для замещения хрящевых дефектов.

*Ключевые слова: с*верхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ), хрящ, репарация, имплантат.

Проблема восстановления хрящевых тканей чрезвычайно актуальна, так как заболевания опорно-двигательного аппарата, связанные с патологией хряща, очень широко распространены и являются одной из главных причин снижения качества жизни [1, 2, 3]. Существующие на данный момент методики лечения не позволяют полноценно восстано-

вить повреждение хряща. В литературе нет достоверного подтверждения результатов предотвращения разрушения хрящевой ткани при использовании хондропротекторных препаратов, блокирующих апоптоз хондроцитов или обеспечивающих питание с помощью компонентов межклеточного вещества [4].

Более перспективными являются хирургические методы. Имеются многочисленные подтверждения удовлетворительных результатов применения хирургических методов лечения [1, 2, 5, 6]. Наиболее результативным из них служит использование скаффолдов для замещения участков повреждения хряща. С этой целью применяют ауто и алло трансплантаты, введение аутологичных хондроцитов и биоимпланты из синтетических материалов. По литературным данным, одним из перспективных является создание синтетических имплантатов на основе материалов из сверхвысокомолекулярного полиэтилена (СВМПЭ) [7].

Целью данной работы является исследование механических характеристик, биосовместимости и иммуногенных свойств имплантов синтетического происхождения на основе сверхвысокомолекулярного полиэтилена для замещения хрящевых дефектов.

Материалы и методы.

Получение экспериментальных образцов. В качестве полимерной матрицы был использован порошок СВМПЭ (производства ОАО «Казаньоргсинтез» (РФ) с молекулярной массой 2×10^6 г/моль). Наночастицы Al_2O_3 (производства ОАО «Сибирский химический комбинат, средний размер 20 нм) применялись как наполнитель, составляя 3 % массы. На данной основе были подготовлены 3 типа образцов: СВМПЭ, композит СВМПЭ/Al_2O_3 и композит СВМПЭ/Al_2O_3 после механической активации.

Смешивание СВМПЭ и нанопорошка Al_2O_3 без механической активации проводили в мельнице IKA M20 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Германия) в течение 5 мин со скоростью 20 000 об/мин. Механоактивация СВМПЭ и Al_2O_3 осуществлялась с помощью планетарной мельницы Fritsch Pulverisette 5 (Fritsch GmbH, Германия), оснащенной оборудованной агатовыми барабанами емкостью 500 мл. Термопрессование механоактивированной смеси проводили с помощью гидравлического пресса MEGA KSC-10A при нагрузке 70 МПа с выдержкой в течение 50 мин при 160°С и последующим охлаждением под давлением. Для исследований были изготовлены образцы различной формы: Из материала, который продемонстрировал лучшие механические и трибологические свойства, готовили образцы для испытаний *in vivo* (полусферы d – 1,8 мм).

Исследование механических и трибологических свойств образцов. Измерение модуля Юнга композита при сжатии проводили по ГОСТ 4651-82 на универсальной испытательной машине Zwick/Roell Z 020, используя образцы размером 24×12.5 мм (скорость сжатия 10 мм/мин). Трибологические испытания осуществляли в режиме, соответствующем стандартным параметрам трибологических испытаний хрящей суставов [15]: трение в дистиллированной воде по методу «пальчик-диск» на установке CETR-UMT-3 (Bruker AXS, Швейцария).

Исследование цитотоксических свойств образцов и индуцированного гемолиза in vitro. Образцы коинкубировали с клетками, выделенными из костного мозга собаки в течение 2 сут. и проведили исследование цитотоксичности в МТТ-тесте. Для изучения уровня индуцированного гемолиза образцы инкубировали в течение 24 часов с взвесью эритроцитов, полученной из крови здоровых доноров, центрифугировали и замеряли оптическую плотность супернатанта при λ 540 нм.

Исследование биосовместимости образцов при ортотопической трансплантации. Манипуляции с лабораторными животными проводились в соответствии с международными требованиями. В опыте использованы самцы крыс линии Wistar массой 200-400 г (n=5). После наркотизации диэтиловым эфиром с помощью бора диаметром 1,8 мм в суставной поверхности большеберцовой кости крыс формировали дефект полусферической формы, в который помещали исследуемый образец.

Гистологические исследования. Извлечённые через 60 суток образцы с окружающими тканями изучали макроскопически, после чего подвергали стандартной гистологической обработке. Серийные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и фотографировали с использованием системы Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jenna, Германия).

Результаты исследования. В результате механических испытаний на сжатие трёх цилиндрических образцов: СВМПЭ, композита СВМПЭ/Al_2O_3 и композита СВМПЭ/Al_2O_3 после механоактивации выявлено, что наи-

большее значение модуля Юнга при сжатии демонстрирует композит СВМПЭ/Al_2O_3 после механоактивации. Установлено, что значение отношения модуля упругости СВМПЭ, наполненного оксидом алюминия после механоактивации, к модулю упругости костной ткани ближе к оптимальному, чем у металлических и керамических материалов, часто используемых в эндопротезировании. Результаты трибологических испытаний показали, что после одного часа трения величина износа (Z) составила 0.13 для образца СВМПЭ, 0.23 – для композита СВМПЭ/Al_2O_3 и 0.05 мм – для композита СВМПЭ/Al_2O_3 после механоактивации.

Таким образом, введение наночастиц Al_2O_3 в матрицу СВМПЭ путем смешивания в отсутствие механоактивации приводит к снижению износостойкости. Износ увеличивается в 1.8 раз по сравнению с ненаполненным СВМПЭ после 1 часа трения. В то же время, введение наночастиц Al_2O_3 в матрицу СВМПЭ при механоактивации ведет к увеличению износостойкости. Износ снижается в 2.6 раз по сравнению с ненаполненным СВМПЭ. Этот факт очень важен для дальнейшего использования данного материала в операциях по замещению дефектов хрящевой ткани и при тотальном эндопротезировании суставов.

Исследование материалов на основе СВМПЭ на биосовместимость *in vitro* показало, что все три вида изучаемых образцов обладают наименьшей цитотоксической активностью (не более 20 %) и не индуцируют достоверного уровня гемолиза (не более 7 %).

В предыдущей работе исследовались также биологические свойства образцов СВМПЭ/Al_2O_3 после механоактивации при гетеротопной трансплантации мышам [8]. Установлено, что образцы материала, изъятые из подкожных карманов через 2 месяца, были покрыты соединительнотканной капсулой, плотно сращённой с окружающей соединительной тканью. При этом не отмечалось каких-либо признаков воспаления или разрушения имплантов.

При макроскопическом исследовании извлечённых у крыс большеберцовых костей с суставной поверхностью отмечено отсутствие реакции острого воспаления в области имплантата. На продольном срезе сустава заметна плотная интеграция имплантированного образца в эпифизарную часть большеберцовой кости. Коленный сустав сохранял функциональную активность и не подвергался дальнейшим разрушениям, размер дефекта не увеличивался.

Одной их самых важных задач при создании имплантатов является решение проблемы иммуногенности. Использование для создания имплантатов клеточных технологий, предполагающих заселение матрикса клетками реципиента, может способствовать сохранению и улучшению его механических, химических и биологических характеристик.

Гистологические исследования продемонстрировали, что образец сохранял свою структуру и расположение, не вызывая воспалительной реакции, не подвергался воздействию клеток, осуществляющих его резорбцию. Отмечалось в основном плотное прилегание образца к окружающим тканям. В соседних к дефекту участках сохранялся неизменённый суставной гиалиновый хрящ. В области дефекта наблюдались очень небольшие прослойки соединительной ткани с сосудами и многочисленными фибробластами. В них не обнаруживалось лейкоцитарной инфильтрации, что можно интерпретировать как отсутствие реакции острого отторжения. На границе дефекта с неизменёнными тканями выявлялись очаги хондрогенеза.

Таким образом, в данном исследовании было установлено, что исследуемые образцы, полученные на основе СВМПЭ с соответствующими добавками, являются биологически совместимыми с тканями организма мышей и перспективными для создания имплантов, но требуются дальнейшие исследования по выявлению их иммуногенных свойств.

Суммируя все полученные результаты, можно сделать вывод, что нанокомпозит СВМПЭ/Al_2O_3, полученный методом механоактивации и термопрессования, является перспективным материалом для эндопротезирования и его можно рекомендовать для дальнейших исследований в качестве основы имплантатов с целью замещения дефектов хряща, в частности, в области суставных поверхностей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bobic V., Noble J. Articular cartilage – to repair or not to repair / V. Bobic, J. Noble // British Editorial Society of Bone and Joint Surgery J Bone Joint Surg [Br].– 2000.– V. 82.– P. 165-166.
2. Perera J., Gikas P., Bentley G. The present state of treatments for articular cartilage defects in the knee

/ J. Perera, P. Gikas, G. Bentley // Coll Surg. Engl.– 2012.– V. 94.– P. 381-387.
3. Curl W., Krome J., Gordon E. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies / W. Curl, J. Krome, E. Gordon // Arthroscopy.– 1997.– V. 13 – P. 456-460.
4. Mastbergen S. C., Saris D. B., Lafeber F. P. Functional articular cartilage repair: here, near, or is the best approach not yet clear? / S. C. Mastbergen, D. B. Saris, F. P. Lafeber // Nat. rev. Rheumatol.– 2013 – V. 9 – P. 277-290.
5. Redman S., Oldfield S., Archer C. Current strategies for articular cartilage repair / S. Redman, S. Oldfield, C. Archer // Eur. Cell Mater.– 2005.– V. 9 – P. 23-32.
6. Repair of defects in articular joints / A. Lynn, R. Brooks, W. Bonfield et al. // J Bone Joint Surg Br.– 2004.– V. 86 – P. 1093-1099.
7. Kurz S. M. UHMWPE biomaterials handbook / S. M. Kurz.– 2009.
8. Исследование биосовместимости и иммуногенности синтетических имплантатов / А. Н. Копылов, О. В. Лебединская, Н. Ю. Анисимова и др. // Российский иммунологический журнал.– 2013.– Т. 7.– № 2-3.– С. 304-305.

STUDY OF THE BIOLOGICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF THE ULTRA-HIGH-MOLECULAR-WEIGHT-POLY-ETHYLENE COMPOSITE FOR EMPLOYMENT AS CARTILAGE BIOIMPLANT

Kiselevsky M. V.[1], Anisimova N. Yu.[1], Lebedinskaya O. V.[2], Kopylov A. N.[1]

[1]NN Blokhin Scientific Institute «Russian Cancer Research Center», Moscow, Russia;
[2]Perm State Medical University named after Acad. E.A. Wagner, Perm, Russia

Aim of this study is researching the biological and mechanical features of the material, made of ultra-high-molecular-weight-poly-ethylene(UHMWPE) Studing the mechanical features showed that the material prepared with addition of Al_2O_3 and with using mechanical activation has the highest mechanical features, wear resistance in particular, in comparison with UHMWPE samples without Al_2O_3 or prepared without mechanical activation. was chosen for. After 60 days orthotopical transplantation this material in rats we did not fined signs of inflammation, cellular infiltration, destruction of material or bone-cartilage defect. Sample was in position of implantation without any shifts. Acquired data shows the perspectiveness of UHMWPE as a material for creating bioimplants for cartilage defects replacement.

Keywords: ultra-high-molecular-weight-poly-ethylene (UHMWPE), cartilage, reparation, implant.

Авторский указатель

А

Абакушина Е. В. 152
Абрамова Т. Я. 93
Абрамовских О. С. 278, 376, 388
Авакимян В. А. 294
Авдеева Ж. И. 422, 424, 483
Авдонкина Н. А. 498
Авилова О. В. 234
Агафонова Е. В. 418
Агеева Е. С. 264, 267
Азнабаева Л. М. 365
Акатова А. А. 40
Акунеева А. В. 526
Албегова Д. З. 488
Албегова Ж. К. 488
Алеманова Г. Д. 244
Алешина Г. М. 60
Алешина Н. И. 143
Алпатова Н. А. 422
Альшевская А. А. 174
Амстиславская Т. Г. 136
Андреева С. А. 378
Андрющенко С. В. 357
Аникеева О. С. 93
Анисимова Т. М. 248
Антимирова Е. А. 374, 463
Антонов А. В. 27
Анциферова Ю. С. 145, 150
Арискина О. Б. 330, 457
Артамонов А. Ю. 134, 548
Асланян И. Э. 470
Астахова Т. М. 80
Атаев Г. Л. 116
Афонина Е. Ю. 459, 461
Ахматова Н. К. 485, 503, 505
Ахматова Э. А. 485, 503, 505

Б

Бабаян А. А. 230
Бабик Р. К. 392, 394
Бабик Т. М. 394
Бабушкина И. В. 166, 181
Баева Т. А. 139
Базикян Э. А. 324
Байдина Т. В. 271
Балдуева И. А. 498
Баранова Н. И. 143, 240, 351
Барков С. Ю. 183, 185
Барсукова Н. И. 208
Батенева А. В. 454, 467
Батрак Н. В. 219
Батурина И. Л. 278
Бахлыкова Е. А. 255, 258
Безрученко Н. В. 98
Белан Э. Б. 285, 390, 400
Белова С. В. 166, 181
Белозерцева Ю. В. 429
Беломестнова И. А. 174
Бердюгина О. В. 348, 528
Бердюгин К. А. 528
Берлов М. Н. 75
Билимова С. И. 127
Биляк А. С. 406
Бишева И. В. 496
Блинкова Н. Б. 543
Боев В. М. 40
Божок Г. А. 88
Бойко А. А. 545
Бондарев В. П. 341, 344, 422, 424, 483
Бондаренко Т. А. 357, 372
Борзова Н. Ю. 223
Борисевич И. В. 341, 344, 450
Бороздено Д. А. 490
Бочкова М. С. 104, 236
Бражников А. Ю. 536
Брындина И. Г. 22
Бубнова О. А. 98
Булавинцева Т. С. 543
Булдакова Ю. Р. 319
Бурмистрова А. Л. 25, 242
Бусырев Ю. Б. 176
Бухарина А. Ю. 70
Бухарин О. В. 357
Бухтояров О. В. 8, 534
Буцкина Е. А. 548
Быкова Л. П. 33
Бычкова Н. В. 297, 321

В

Валиева Ю. В. 120
Ванько Л. В. 228, 230
Василенко Е. А. 179
Василенко М. А. 308
Васильев Р. Г. 557
Вейко Н. Н. 107, 114
Велижинская Т. А. 418

Авторский указатель

Ветрова Е. Н. 380, 398
Винницкая И. В. 287
Виноградов С. Ю. 42
Вирясова Г. М. 67
Возгомент О. В. 40
Волкова М. В. 314
Волосникова Е. А. 467
Волошина А. А. 102
Воробьев С. В. 490
Воронина Е. Н. 205
Воронин Д. Н. 145, 148
Воронкова О. В. 50
Воронова В. Н. 198
Воронова С. Н. 196
Воропай А. А. 310
Ворошилова Т. М. 411
Восканян Л. Р. 472
Вторушина В. В. 228

Г

Гаврилова К. А. 520
Гаврилова Л. И. 127
Гаврилова Т. В. 56
Галкина Г. А. 310
Гамалей С. Г. 454, 467
Ганковская Л. В. 232
Геворкян О. В. 269
Гейн С. В. 54, 56
Гетте И. Ф. 65, 543
Гизингер О. А. 355, 426, 436
Гладкова Е. В. 166, 181
Глебездина Н. С. 82
Глумова В. А. 111
Глушков А. Н. 27
Глушков А.Н. 205
Годовалов А. П. 33, 212
Голенкина Е. А. 67
Головизнин М. В. 319
Головкин А. С. 189
Голубева Е. Л. 228
Гольцов С. В. 526, 531
Гончаров А. Г. 159
Гончаров Н. В. 531
Гордеева Л. А. 205
Горшкова Е. Н. 179
Гринчук Т. М. 548
Гриценко В. А. 429, 433
Громов М. И. 457
Гусакова А. М. 289, 292
Гусев Е. Ю. 536
Гусельников М. А. 98, 100

Д

Давыдова Н. И. 297
Даниелян Т. Ю. 212
Даниленко Е. Д. 454, 467
Данилец М. Г. 441
Данилова Е. И. 372
Данилова Е. Ю. 384
Данилова И. Г. 65, 543
Данилова Н. Р. 294
Данченко И. Ю. 271
Дёмина Д. В. 281
Деркач В. В. 510
Дианова Д. Г. 98
Дмитриева А. И. 317
Добродеева Л. К. 58, 72
Добрынина М. А. 429, 433
Долгих О. В. 98
Долгушин И. И. 387, 388
Дольникова О. А. 374, 463
Доценко А. М. 285
Дударева М. В. 414
Дударев И. В. 414
Дуденко Е. В. 416
Дукарт В. В. 429, 433
Дунец Н. А. 104, 555

Е

Евглевский А. А. 84
Евдокимов А. В. 91, 242
Егорова К. И. 459, 461
Емельянов И. В. 278
Ершова А. В. 348
Ершова Е. С. 107, 114
Ершов Ф. И. 378, 380
Ерыгина Е. Н. 304
Есимова И. Е. 402
Ефимов Г. А. 179
Ефремова А. В. 459, 461
Ефремов И. А. 210

Ж

Жаркова М. С. 548
Железнова А. Д. 360, 369
Желтова А. А. 285, 400, 553
Желтова В. И. 365
Жеребятьева О. О. 362, 365

Авторский указатель

Жидулева Е. В. 189
Жукова А. Е. 183
Журавлева М. О. 452
З
Задорина И. И. 33
Зайцева Н. В. 98, 100
Зайцев В. Г. 553
Закиров Р. Ш. 131
Заморина С. А. 104, 236, 328
Затолокин П. А. 308
Захарова Л. А. 196, 198
Захарова М. А. 520, 522
Захарова П. А. 157
Зеленова З. В. 273
Зиганшин О. Р. 426, 436
Золкорняев И. Г. 143
Зотова М. А. 278
Зотова Н. В. 536, 538
Зубова Т. Э. 536, 538
Зубов Д. А. 557
Зуева Е. Б. 429, 433
Зурочка А. В. 429, 433
Зурочка В. А. 429, 433
И
Иваненкова Н. В. 223
Иваненкова Н. И. 225
Иванова Е. В. 357, 372
Иванова И. Г. 70
Иванов В. Б. 341, 344
Игнатов М. В. 157
Игнатюк В. М. 198
Извольская М. С. 196, 198
Ираклионова Н. С. 390, 513
Иртюга О. Б. 189
Исаева Е. И. 378, 380, 398
К
Каббани С. М. 161
Кадыров А. С. 416
Казеннова Е. В. 46
Калашникова А. А. 297, 411
Каледин В. И. 481
Калинина Е. А. 230
Калинина Н. М. 297, 321
Каменева Л. В. 114
Каплина Э. Н. 77
Карпова Я. Д. 80, 88
Карпунина Н. С. 163
Карпунина Т. И. 176, 212
Карякина Е. В. 166
Керимова М. К. 10, 13
Кизявка М. И. 457
Киргизова С. Б. 362
Киреев Ф. Д. 170
Кириенкова Е. В. 308
Кирилина Е. А. 56
Кирсанов А. Н. 145
Кирсанов Д. Н. 148
Киселева Н. М. 490
Китаев М. И. 416
Кишкин А. М. 31
Клещенко Е. И. 339
Климова А. Р. 40, 44
Княжева М. А. 136
Ковалева С. В. 339
Ковалева С. В. 84, 470
Ковалев Д. А. 374, 463
Коваленко Е. И. 545
Коженкова С. В. 240
Козлов В. А. 93
Козлов И. Г. 152, 488
Коков Е. А. 201
Кокряков В. Н. 60, 75
Колесникова Е. В. 201, 294
Колесникова Н. В. 77, 201
Колобовникова Ю. В. 317
Кологривова И. В. 287, 306
Комлева М. О. 246
Комлева Н. В. 246
Кононова Т. Е. 157
Константинова О. Д. 362
Коркмазов М. Ю. 443
Кормилина Н. В. 111
Кормщикова Е. С. 475, 477
Корнилова О. Г. 447, 450
Королевская Л. Б. 404, 409
Костина Е. М. 253
Костинов М. П. 503, 505
Костоломова Е. Г. 526, 531
Костюк С. В. 107, 114
Кошельская О. А. 287, 306
Кравцова Е. И. 294
Кравченко Е. С. 306
Кравченко Л. В. 234
Красильникова А. К. 150

Авторский указатель

Краснопрошина Л. И. 496
Кречетова Л. В. 228, 230
Криволапова И. М. 312
Кривцов А. В. 98
Кривых М. А. 447, 450
Крошкина Н. В. 219
Круглов А. А. 179
Крукиер И. И. 234
Кудашева Э. Ю. 341, 344, 450, 475, 477
Кудрявцев И. В. 116, 189, 531
Кудряшова А. В. 217, 221
Кузнецова М. С. 168, 174
Кузьмичкина М. А. 292
Кукина П. И. 232
Куклина Е. М. 120, 271
Куликова Е. В. 168, 172
Кундер Е. В. 314
Курбатова О. В. 131
Куценко И. И. 294
Кушнир Е. А. 466
Кшнясева С. К. 362

Л

Лабис В. В. 324
Лабунец И. Ф. 557
Лагерева Ю. Г. 191
Ланин Д. В. 100
Лапштаева А. В. 210
Лахонина Н. С. 319
Лебедев Л. Р. 454, 467
Лебединская О. В. 485
Левагина Г. М. 467
Леванюк А. И. 35, 38
Левашова О. А. 143
Левкович А. Ю. 234
Левкович М. А. 234, 310
Ледерман М. М. 409
Леонова Т. С. 75
Летяева О. И. 374, 463
Лившиц Н. М. 367
Лигачёва А. А. 441
Лизогуб Н. В. 380
Литвинова Л. С. 104, 308, 555, 557
Лифанцева Н. В. 196
Ловать М. Л. 466
Логинова Н. П. 328
Логинова О. А. 63
Логинова Ю. В. 278
Ломтатидзе Л. В. 77, 339
Лопатина В. А. 120
Лопатникова Ю. А. 168, 170
Лукьянчикова Л. В. 283
Лушникова Е. Л. 481
Лысенко О. В. 283, 353
Люпина Ю. В. 80, 88
Ляпунов В. А. 123, 125
Ляшенко И. Э. 365

М

Мазунина А. А. 100
Маковецкая А. К. 515
Максютов. А.З. 168
Максютов Р. А. 172
Малахова Ж. Л. 550
Малашичева А. Б. 189
Малащенко В. В. 159
Малая Н. С. 335
Малиновская Е. М. 114
Малышев М. Е. 330, 457
Малышкина А. И. 148, 150
Малышкин А. П. 367
Мальчиков И. А. 492
Мамаева Т. А. 396
Мамонова И. А. 166, 181
Мамылина Н. В. 20
Манашева Д. И. 267
Маркеева Д. А. 353, 376
Маркова В. А. 141, 376
Маркова Е. В. 93, 136, 281
Мартынов А. И. 273, 515
Мархайчук А. З. 159
Матияш А. М. 248
Матусевич С. Л. 255, 258
Махалова Г. О. 362
Махалов В. Ю. 365
Медведева М. В. 406, 445
Мезенцева Е. А. 278
Мелентьев В. С. 172
Мельникова В. И. 196
Меньшикова Е. А. 187
Меняйло М. Е. 159
Меркулов В. А. 344, 424, 483
Миронов А. Ю. 362, 365
Миронюк Н. И. 308
Мирославский О. В. 515
Митин А. А. 185

Авторский указатель

Митькин Н. А. 466
Михайлова Е. А. 362, 365
Михайлова Е. Н. 337
Михайлова И. В. 251
Михайловская М. В. 390
Мишарина Л. В. 223, 225
Мозговая Л. А. 33
Моисеева О. М. 189
Морозова О. В. 378, 380, 398
Морозова О. С. 161
Москвин С. В. 426
Москвичева М. Г. 520, 522
Мосягин В. Д. 344
Мохонов В. В. 179

Н

Нагорный С. Н. 148
Насрашвили Г. Г. 289
Наумова М. А. 396
Наумов С. А. 163
Небогатиков В. О. 139
Недоспасов С. А. 179
Некрасова И. В. 120, 271
Некрасова М. В. 29
Непомнящих В. М. 281
Неприна Г. С. 152
Нерсесян С. Л. 205
Нестеренко Д. Г. 557
Нестерова И. В. 84, 339, 470
Никитин А. В. 131
Никифорова Е. М. 513
Николаева М. А. 228, 230
Николин В. П. 481
Никонова Т. И. 278
Никоноров А. А. 262
Никушкина К. В. 278
Новикова Л. В. 210
Новикова С. Н. 557
Новиков Д. В. 179
Новицкий В. В. 50, 157, 317, 402

О

Обухова Л. Е. 208
Овсянникова Т. В. 438
Огуркова О. Н. 289, 292
Оленникова Р. В. 205
Олефир Ю. В. 341, 422, 424, 483
Орлова Е. Г. 63, 328
Орлова О. В. 330
Орлов Д. С. 548
Орнер И. Ю. 278
Осиков М. В. 31, 479
Осипова Г. Л. 380
Осипова И. В. 330, 457
Осипова М. В. 240
Осипов А. Ю. 102
Оскорбина О. С. 205
Оспельникова Т. П. 269, 378, 380
Островский С. И. 387
Отавина Е. А. 98, 100
Охременко О. С. 201

П

Павлова С. И. 488
Павлюкова Е. Н. 292
Павлюченко И. И. 201
Павшинцев В. В. 466
Пазина Т. Ю. 134, 548
Панина А. А. 285, 390, 400
Панова И. А. 86, 203, 217
Панфилова Т. В. 360, 369
Паньков А. С. 365
Парамонов И. В. 475, 477
Параскун А. А. 42
Патракеева В. П. 58, 72
Пашинская Л. Д. 75
Пашкина Е. А. 93
Пашнина И. А. 260, 312
Перминова И. В. 100
Перминова Л. А. 550
Перунова Н. Б. 357, 372
Петричук С. В. 131
Петрович Д. М. 314
Петров С. А. 18
Петухова А. А. 183
Пивнева Т. А. 557
Пивоварова Л. П. 330, 457
Пичугова С. В. 191
Плосконос М. В. 15
Полевщиков А. В. 116
Поленок Е. Г. 27
Полетика В. С. 157
Полякова В. С. 369
Попова Е. В. 262
Попова Н. А. 481
Попова Н. П. 262
Поповская Е. В. 29, 161

Авторский указатель

Пороховник Л. Н. 107
Потапов А. С. 131
Прокопьев Д. С. 374, 463
Пронина Н. А. 129, 154
Прохорова Е. Е. 116
Пурлик И. Л. 317
Пучиньян Д. М. 166, 181
Пушкарева Л. А. 246
Пьянкова З. А. 543

Р

Радаева О. А. 210
Раев М. Б. 104, 236, 501
Ремизова И. И. 123, 125, 127
Репина Е. А. 299, 301
Ровда Ю. И. 332
Роггенбук Д. 314
Родниченко А. Е. 557
Розов Ф. Н. 179
Рокотянская Е. А. 86, 203, 217
Ромакина Н. А. 166
Романова Н. В. 304
Романов В. А. 304
Росина Е. В. 475, 477
Рочев В. П. 100
Рощупкин А. Н. 44
Русинова Т. В. 77
Рыбачук О. А. 557
Рыбина И. В. 191
Рылов А. В. 475, 477
Рябова Л. В. 276

С

Савинова Т. Л. 191
Савицкая Н. О. 557
Савкин И. В. 109
Савочкина А. Ю. 387, 388
Садчикова А. И. 400
Садчикова Т. Л. 285, 400
Саедгалина О. Т. 479
Сайдакова Е. В. 404, 409
Салгина А. В. 372
Сальникова С. В. 498
Самарин Д. М. 8, 534
Самодова А. В. 58, 72
Самохина И. В. 131
Сапун О. И. 339
Саранчина Ю. В. 264, 267
Сарибегова В. А. 228
Сарычева Ю. А. 360, 369
Сафронов А. А. 248
Свиридова В. С. 129, 154
Свитич О. А. 232
Селедцова Н. В. 438
Селихова М. С. 390
Семочкин И. А. 503, 505
Сенников С. В. 168, 172
Сервули Е. А. 118
Сергеева В. А. 107, 114
Сергеева Е. В. 35, 38
Серебрякова В. А. 50
Серебрякова М. К. 116, 189, 531
Серебряная Н. Б. 46, 48
Серова Т. А. 496
Сетко Н. П. 44, 365
Сидорова О. И. 357
Сизенцов А. Н. 459, 461
Сизова И. Н. 332
Сизякина Л. П. 414
Силков А. Н. 172
Симонян Е. В. 479
Синельникова Н.А. 321
Скареднова Е. Ю. 127
Скуратовская Д. А. 308
Славянская Т. А. 498, 510
Смердова М. А. 396
Смерчинская Т. В. 339
Сметанина М. В. 111
Смирнова Е. В. 217
Смирнова М. Ю. 380
Смирных С. Е. 543
Смольникова В. Ю. 230
Смолягин А. И. 360, 369
Смык А. В. 281
Снимщикова А. Д. 335, 337
Снимщикова И. А. 335, 337
Солдатов А. А. 422, 424, 483
Соломатина Л. В. 538
Сорокина Е. В. 503, 505
Сотникова Н. Ю. 145, 223
Спирина Ю. С. 255
Ставинская О. А. 58, 72
Стальмаков А. Л. 520, 522
Старкова К. Г. 100
Сташкевич Д. С. 242
Степанова А. А. 88

Авторский указатель

Степанова Е. О. 228, 230
Степанова Т. Ю. 25
Столпникова В. Н. 503, 505
Стрелин С. А. 526
Стрельцова М. А. 545
Стукалов С. В. 107
Судьина Г. Ф. 67
Суменко В. В. 40, 44
Сумеркина В. А. 141
Сурков А. Н. 131
Сурсякова Н. В. 271
Суслова Т. Е. 287, 292, 306
Суховей Ю. Г. 526, 531
Сходова С. А. 496, 503, 505
Сыдыкова С. С. 416
Сысоева Г. М. 454
Сытова Л. А. 86, 203, 217

Т

Телешева Л. Ф. 141, 376
Тендрякова С. П. 102, 139
Терентьева С. Ю. 44
Терпиловский М. А. 531
Тетруашвили Н. К. 228
Тибирькова Е. В. 285
Тиллиб С. В. 179
Тимганова В. П. 104, 236
Тимофеева А. В. 25
Тимофеев В. Т. 319
Тиньков А. А. 262
Токмакова А. С. 116
Топтыгина А. П. 396
Торопова Л. Р. 387, 388
Третьякова И. Е. 264
Тройнич Я. Н. 503, 505
Трофимова Е. С. 441
Троянова Н. И. 118
Трулев А. С. 531
Тузанкина И. А. 492
Тулендинова А. И. 470
Турова А. В. 221
Тяпаева Я. В. 429

У

Умнякова Е. С. 75
Унгер И. Г. 526, 531
Уразова О. И. 50, 157, 317, 402
Уракова М. А. 22
Устинова Ю. В. 522
Устиченко В. Д. 88
Устьянцева Л. С. 125, 127
Учеваткина А. Е. 384

Ф

Фалалеева С. А. 172
Фаттахов Н. С. 308
Федин А. В. 351
Федорина А. С. 118
Федосеева В. Н. 515
Федоскова Т. Г. 273, 515
Федотова Л. П. 372
Феофанова Т. В. 273
Филатенкова Т. А. 95, 134
Филимонкова Н. Н. 255, 258
Филинюк О. В. 157, 402
Филипенко М. Л. 205
Филиппова Л. В. 384
Филиппова Ю. В. 360, 369
Филиппова Ю. Ю 25
Фишер И. В. 18
Фишер Т. А. 18
Фомина М. В. 362
Фомичева Е. Е. 95
Фошина Е. П. 496
Францева О. В. 355
Фрейдлин Е. В. 131
Фролова Е. В. 384
Фролова М. В. 215
Фролова М. Ю. 411
Фролов Б. А. 360, 369

Х

Хабирова Т. Г. 330, 457
Хазиахматова О. Г. 104, 555
Хайдуков С. В. 324
Халилов М. А. 335, 337
Хантакова Ю. Н. 168
Хасанова Р. Р. 402
Хлипунова Д. А. 86, 203
Хлусова М. Ю. 555
Хлусов И. А. 555
Хонина Т. В. 492
Храмцова Ю. С. 70
Храмцов П. В. 104, 236, 501
Хромова Е. А. 503, 505

Ц

Цигулева О. А. 208, 472
Цыпкина А. В. 488

Авторский указатель

Ч
Чайникова И. Н. 357, 360
Чаша Т. В. 221
Чекушкин А. В. 248
Челпаченко О. Е. 357, 372
Черешнева М. В. 56
Черешнев В. А. 56, 123, 236, 312, 404, 409
Чериков В. С. 42
Черток Н. В. 20
Четвернина Е. А. 387
Четвертных В. А. 328
Чистякова Г. Н. 123, 125, 127
Чудакова Ю. М. 107, 114
Чудилова Г. А. 77, 339
Чуева М. А. 513
Чумакова С. П. 50
Чурина Е. Г. 157
Чучалин А. Г. 380
Чучкова Н. Н. 111
Ш
Шабалдин А. В. 332
Шабанов Д. В. 515
Шабашова Н. В. 384
Шамова О. В. 134, 548
Шанин С. Н. 95
Шаравьева И. Л. 102
Шаркеев Ю. П. 555
Шарова В. С. 196
Шарова Н. П. 80, 88
Шаталина И. В. 205
Шашкова Е. Ю. 29
Шварев Д. С. 179
Швецова Е. 159
Шевченко М. А. 118
Шеметова М. А. 426, 436
Шерстобоев Е. Ю. 441
Шилов Д. Ю. 404
Шилов С. Ю. 183, 185
Шилов Ю. И. 183, 185
Шипулин В. М. 50
Ширшев С. В. 63, 328
Шишкова А. А. 189
Шишкова Ю. С 443
Шкурова Н. А. 351
Шмагель К. В. 404, 409
Шмагель Н. Г. 404, 409
Шмарина Г. В. 107
Шмаров В. А. 159
Шмулевич С. А. 332
Шохина М. Д. 335, 337
Штаборов В. А. 187
Штойко М. А. 42
Шунькин Е. О. 159
Шуплецова В. В. 555, 557
Щ
Щеголева Л. С. 161
Щетинин С. А. 443
Щипачева О. В. 492
Э
Энтони Д. Д. 409
Ю
Юрова К. А. 104, 555
Юхнев В. А. 134
Я
Якуцени П. П. 46, 48
Якушев А. М. 541
Якушева М. Ю. 541
Янкелевич И. А. 60
Янкович К. И. 317
Ярмамедов Д. М. 445