ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА

Александров А.В., Шилова Л.Н., Алехина И.Ю., Александрова Н.В., Емельянов Н.Н., Бенедицкая Е.В., Емельянова О.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии», Волгоград, Россия

Введение. Изучение воспалительных ревматических заболеваний (РЗ) привело к раскрытию важной роли ферментов антиоксидантной системы (АОС) и пуринового метаболизма (ПМ) в патогенезе системной красной волчанки (СКВ) и ревматоидного артрита (РА). Образование аутоантител (Ат) к аутоантигенным структурам, в том числе и ферментам, в результате свободнорадикальных реакций может являться одной из возможных причин развития функциональной недостаточности энзимов при данных патологиях. Расширение спектра Ат при РЗ возможно при переводе растворимых ферментов в нерастворимую форму с сохранением их биологических свойств.

Цель и задачи. Изучение влияния метода эмульсионной полимеризации на растворимые биополимеры (ферменты АОС и ПМ) для использования их в качестве антигенной матрицы при создании антигенных наносистем (АНС).

Материалы и методы. В качестве антигенов использовали коммерческие препараты (Sigma, США) основных ферментов АОС и ПМ: супероксиддисмутаза (СОД, Cat. № S 9636), глутатионредуктаза (ГР, Cat. № G 3664), каталаза (Кат, Cat. № C 3556), ксантиноксидаза (КО, Cat. № X 2252), а также аденозиндезаминаза (АДА, Cat. № A 5043), 5'-нуклеотидаза (5-НТ, Cat. № N 5880), пуриннуклеозидфосфорилаза (ПНФ, Cat. № N 3514), гуаниндезаминаза (ГДА, Cat. № G 5752). АНС с иммобилизированным в их структуру антигеном (ферментом) получали методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота (Гонтарь И.П. и соавт., 2002 г.).

Результаты. Получены АНС, представляющие собой двойные полиакриламидные гранулы правильной сферической формы с размером частиц от 10 до 100 мкм и средним диаметром гранул 55±6,8 мкм (при соотношении полимерный носитель: железо 2:1, в пересчете на сухую массу). Процедура иммобилизации ферментов не вызывала изменения их биологических свойств (различия во всех случаях недостоверны, $p < 0,05$) (см. табл.).

Следует отметить, что включение фермента в пространственную решетку полиакриламидного геля, составляющего основу АНС, (иммобилизированная форма) придает антигену (ферменту) новые свойства, благодаря которым он приобретает определенные преимущества перед растворимой формой. Такой метод приводит к возникновению незначительных конформационных изменений, сохраняющих активность фермента, но, в то же время, способствующих, например, экспрессии гидрофобных участков молекулы энзима, содержащих «скрытые эпитопы». Данное обстоятельство способно оказать существенное влияние на повышение чувствительности иммуноферментного метода при определении антител к ферментам в сыворотке крови больных РЗ. Кроме того, полученные нерастворимые формы антигенов (энзимов) возможно адаптировать для определения антител к растворимым энзимам с помощью метода непрямой иммунофлюоресции с использованием коммерческих люминесцирующих сывороток.

Заключение. Перевод растворимых биополимеров (энзимов АОС и ПМ) в нерастворимую форму методом эмульсионной полимеризации позволяет сохранить их биологические свойства и делает АНС универсальными для использования в различных иммунологических методах диагностики РЗ.

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ (К ТЕЗИСАМ АЛЕКСАНДРОВА А.В. И ДР.)

Фермент	Ферментативная активность	
	Иммобилизированная форма	Растворимая форма
СОД, Ед	37,64±0,12	38,06±0,72
ГР, Ед	120,1±0,83	122,4±0,79
КАТ, мКАТ/л	25,15±3,97	24,42±4,06
КО, мкмоль/л/мин	4,06±2,65	3,92±2,74
АДА, Ед/мл	58,19±5,22	59,47±4,91
5'-НТ, ЕД/л	38,69±4,12	41,85±5,44
ПНФ, мкмоль/л/мин	20,99±2,82	22,14±2,71
ГДА, МЕ/л	27,55±3,67	28,17±3,46

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Вавилов Н.В.[1], Шилов Ю.И.[1, 2]

[1] ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, Пермь, Россия
[2] ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Введение. Одна из важнейших функций клеток системы мононуклеарных фагоцитов – удаление биологического «мусора», в частности окисленных белков (Garibaldi S. et al., 2017). Окислительная модификация белков (ОМБ) – одно из основных последствий протекания свободно-радикального окисления в живых системах, опосредованное воздействием активных форм кислорода и реактивных форм азота. ОМБ могут не только активировать процессы воспаления при атеросклерозе и хронических заболеваниях почек, но и регулировать дифференцировку макрофагов (Garibaldi S. et al., 2017). Для изучения этих механизмов нами модифицирован один из распространенных методов для определения ОМБ (Reznick A.Z., Packer L., 1994), который был адаптирован для современных планшетных спектрофотометров.

Цель. Усовершенствование метода оценки окислительной модификации белков и его адаптация для планшетных спектрофотометров.

Материалы и методы. Исследовали сыворотку периферической крови 10 практически здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 19 до 23 лет. Сущность модификации метода заключалась в пропорциональном уменьшении объемов реагентов, замене некоторых реактивов на сходные по физико-химическим свойствам. Так, этилацетат как растворитель гидрофобных соединений заменён на ацетон, 6М раствор гуанидина гидрохлорида как растворитель денатурированного белка – на 8М раствор мочевины. Концентрация соляной кислоты для растворения 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) снижена с 2,5М на 1М раствор, так как ДНФГ хорошо растворяется в 1М растворе соляной кислоты. Не проводили второе отмывание осадка 10% раствором ТХУ, так как уже после первого осаждения 20% раствором ТХУ осадок приобретает нужную консистенцию. Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного спектрофотометра (PowerWave BioTEK Instruments, Inc., USA) с кварцевым 96-луночным планшетом (black quartz microplate with 96 wells, Hellma, USA). В две микропробирки типа Эппендорф вносили по 200 мкл сыворотки крови. Далее в пробирку с опытной пробой добавляли 400 мкл 0,1М раствора ДНФГ, а в контрольную – 400 мкл растворителя ДНФГ (1М раствор HCl). Пробирки оставляли на 1 ч при комнатной температуре в темноте. Затем в каждую пробирку добавляли 600 мкл 20% раствора ТХУ (m/V). Пробы инкубировали в течение 10 мин на льду и центрифугировали в течение 10 мин для осаждения белковых преципитатов. Супернатант удаляли. Пробы трижды промывали 400 мкл раствора этанол/ацетон (1:1) (V/V) для удаления не связавшегося ДНФГ и примеси липидов. Осадок высушивали в течение 12-18 ч. Далее осадок растворяли в 400 мкл 8М раствора мочевины. Образовавшиеся 2,4–динитрофенилгидразоны (ДНФ) регистрировали при следующих длинах волн: при 370 нм – нейтральные кетон-ДНФ (кДНФн), при 430 нм – основные кетон-ДНФ (кДНФо) и при 530 нм – нейтральные альдегид-ДНФ (аДНФн). Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мг общего белка сыворотки, который определяли микробиуретовым методом. Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и t-критерия Стьюдента для парных данных.

Результаты. В ходе исследований установлено, что уровень кДНФн сыворотки крови здоровых доноров составляет 1,24±0,15 нмоль/мг белка, что соответствует результатам, полученным как в классическом варианте реакции, так и данным литературы. Уровень кДНФо составляет 0,74±0,11 нмоль/мг белка, а аДНФн – 0,37±0,07 нмоль/мг белка. Таким образом, суммарная концентрация окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров составляет 2,35±0,11 нмоль/мг белка. Выявлено, что на долю аДНФн приходится 16%, на долю кДНФо – 31,5%, на долю кДНФн – 52,5% окисленных белков. Соотношение окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров аДНФн:кДНФо:кДНФн составляет 1:2:3,3.

Заключение. Таким образом, результаты, полученные с помощью предложенной в настоящей работе модификации метода, соответствуют классическому варианту метода.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ

Жоголев К.Д., Журкин М.А., Рубова С.Р., Жоголев С.Д., Харитонов М.А., Сбойчаков В.Б., Клецко Л.И., Андреев В.А., Азаров И.И., Аминев Р.М., Котов С.С., Горенчук А.Н., Жоголев Д.К., Удальцов О.Е.

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

Цель. Определить частоту встречаемости агентов различной природы при внебольничных пневмониях у военнослужащих иммунологическими и молекулярно-генетическими методами.

Материалы и методы. Помимо классического бактериологического метода, с помощью которого в мокроте определяются агенты только бактериальной природы, применяли метод иммуноферментного анализа, позволяющий определять концентрацию антител к респираторным вирусам (аденовирусам, РС-вирусам, вирусам гриппа А и В) и атипичным возбудителям (микоплазмам, хламидиям, легионеллам) в сыворотке крови, а также применяли иммунохроматографические экспресс-тесты для выявления вирусных агентов из мокроты и молекулярно-генетический метод – полимеразную цепную реакцию (ПЦР), позволяющую выявлять в плазме крови и мокроте фрагменты ДНК/РНК (антигены) как классических, так и атипичных возбудителей и агентов вирусной природы. Обследовано 150 больных внебольничной пневмонией военнослужащих по призыву в возрасте 18-22 года.

Результаты. По обобщенным данным из возбудителей бактериальной природы преобладали пневмококки, обнаруженные у 24,1% больных пневмонией. Гемофильная палочка выявлена у 8,3 %, золотистый стафиллококк – у 6,5%, клебсиелла – у 3,7% больных. Из атипичных возбудителей часто выявлялись микоплазмы – в 21,3% случаев и в 2 раза реже – хламидии – в 10,2% случаев. Также были выявлены возбудители нозокомиальной инфекции:

синегнойная палочка – в 7,4%, ацинетобактер – в 5,6% случаев. Из агентов вирусной природы преобладали аденовирусы, определяемые у 51,9 % больных. РС-вирусы были обнаружены в 34,3%, вирус гриппа А – в 16,7%, вирус гриппа В – в 2,8% случаев. Подавляющее большинство пневмоний (75 %) имели вирусно-бактериальную этиологию.

Заключение. Применение метода иммуноферментного анализа, иммунохроматографических экспресс-тестов и ПЦР-диагностики наряду с классическим бактериологическим методом позволяет значительно увеличить полноту выявляемости возбудителей пневмоний, определять помимо классических агентов бактериальной природы атипичные возбудители и вирусы. С помощью этих методик установлено преимущественно вирусно-бактериальная природа внебольничных пневмоний у военнослужащих, что необходимо учитывать как при лечении, назначая в этих случаях наряду с антибиотиками противовирусные средства, так и при медикаментозной профилактике (вместе с пневмококковой вакциной следует применять противогриппозную вакцину, противовирусные и иммунотропные средства).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАЛЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО МЕТОДА SmartFlare

Капитанова К.С.[1, 2], Закиров Р.Ш.[3], Топтыгина А.П.[1, 2]

[1] ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Министерства образования и науки РФ, Москва, Россия
[3] ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Субпопуляция $CD3^+CD4^+$, называемая Т-хелперы (Th), опосредует иммунный ответ, участвуя и регулируя все реакции адаптивного и почти все реакции врожденного иммунитета. К настоящему моменту охарактеризованы следующие субпопуляции Т-хелперов: Th1, Th2, Th17, фолликулярные Т хелперы (Tfh) и регуляторные Т-клетки (Treg). Существует несколько способов идентификации этих субпопуляций, но наиболее эффективным критерием считается маркирование их по наличию главных транскрипционных факторов, мастер-регуляторов дифференцировки соответствующих субпопуляций: T-bet для Th1, GATA-3 для Th2, Bcl-6 для Tfh, RORC2 для Th17 и FoxP3 для Treg. Методические особенности метода SmartFlare позволяют осуществлять работу с живыми клетками, отслеживая динамику синтеза мРНК соответствующего транскрипционного фактора по накоплению флуоресцентной метки в каждой клетке индивидуально, а также использовать эти клетки в последующих экспериментах.

Цель. Совершенствование методов идентификации субпопуляций Т-хелперов на основе технологии SmartFlare для изучения механизмов формирования иммунного ответа у человека.

На лимфоцитах периферической крови (ЛПК), выделенных с помощью градиентного центрифугирования от 10 детей (5 мальчиков и 5 девочек) в возрасте от 4 до 10 лет с диагнозом атопический дерматит, лабораторно подтвержденном наличием высокого уровня IgE и специфических антител к пищевым и бытовым аллергенам (основная группа), и 10 здоровых детей того же возраста (контрольная группа) на проточном цитофлуориметре CantooII (BD Biosciences. США) определяли субпопуляции $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов в комбинациях: Th2-$CD4^+CD294^+$, Th17-$CD4^+CD45R0^+CD161^+$, Treg-$CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$, Tfh-$CD4^+CXCR5^+$, выражая в процентах от гейта $CD3^+CD4^+$. Одновременно на этом же цитофлуориметре с помощью зондов SmartFlare определяли количество клеток, экспрессирующих мРНК для GATA-3(Th2), Bcl-6 (Tfh), RORC2 (Th17) и FoxP3 (Treg), для чего ЛПК культивировали при 37 °С во влажной атмосфере и 5% CO_2 в 96-луночных панелях в среде RPMI-1640 с глютамином и добавлением гентамицина и 10% FCS в присутствии и без 5 мкг/мл ФГА. Время инкубации варьировало от 16 до 40 часов. В лунки добавляли разведения Scramble-отрицательный контроль или Uptake-положительный контроль, меченые флуорохромами Cy3 или Cy5 или один из целевых зондов GATA-3, FoxP3, RORC2, BCL-6, постановку осуществляли в триплетах.

Показано, что технология SmartFlare позволяет выявлять мРНК транскрипционных регуляторов основных субпопуляций $CD4^+$ в живых лимфоцитах. Флуорохром Cy5 лучше детектируется на проточных цитометрах на канале FL4-APC, тогда как Cy3 – на канале FL2-PE, но сигнал слабее, чем у Cy5. Оптимальное время инкубации для лимфоцитов – 24 часа. При оценке субпопуляций $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов по поверхностным маркерам у детей с атопическим дерматитом выявлено значимое снижение уровня Treg и Th17 и повышение уровня Th2 лимфоцитов ($p < 0,05$), а уровень Tfh не отличался от группы здорового контроля. При оценке субпопуляций по уровню мРНК методом SmartFlare обнаружено значимое снижение процента лимфоцитов, экспрессирующих мРНК GATA3, FoxP3 и Bcl6 ($p < 0,05$), а уровень экспрессии мРНК RORC2 не отличался от здоровой группы.

Таким образом, удалось показать, что метод SmartFlare пригоден для выявления мРНК транскрипционных факторов основных субпопуляций $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов и позволяет более детально исследовать иммунопатогенез заболеваний.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ IgG К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

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, Россия
[2] ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Вопросы диагностики клещевого энцефалита (КЭ) актуальны на сегодняшний день в связи с расширением ареала вируса КЭ и ухудшением эпидемиологической обстановки за счет неуклонного роста заболеваемости среди не привитого и не получавшего экстренной профилакти-

ки при укусах клеща городского населения. Определение содержания антител IgG к вирусу КЭ с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) широко практикуется в настоящее время не только для диагностики инфекции и оценки эффективности проведенной профилактической вакцинации, но и скрининга субстанции для получения препаратов иммуноглобулинов человека против КЭ и контроля их специфической активности. Известно, что именно антитела IgG, вырабатываемые организмом человека в ответ на гликопротеин gE вируса КЭ, обладают протективным эффектом в борьбе с инфекцией и определение их содержания имеет наибольшую диагностическую ценность. В результате анализа коммерческих тест-систем для ИФА, разрешенных к применению в практике здравоохранения РФ, установлено, что при их изготовлении в качестве модельных антигенов используют как вирусные частицы, полученные культуральным методом, так и выделенный gE или его рекомбинантные фрагменты, при этом отечественные производители конструируют тест-системы на основе дальневосточных тест-штаммов вируса КЭ («Софьин» и «205»), а зарубежные – западных («Neudoerfl» и «K-23»). Существенно отличаются и предлагаемые способы интерпретации результатов с использованием диагностических наборов разных производителей.

Цель. Проведение сравнительного анализа результатов количественного определения содержания антител IgG к вирус КЭ в образцах сыворотки и препаратов иммуноглобулина человека, полученных с использованием нескольких тест-систем для ИФА.

Материалы и методы. Объектами исследования служили образцы сыворотки крови здоровых доноров и серии препаратов иммуноглобулинов человека против КЭ (ФГУП НПО «Микроген», ГБУЗ «Челябинская ОСПК»). В работе использовали наборы реагентов «ВектоВКЭ-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), «ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-G» (НПО «Диагностические системы», Россия), NovaLISA TBE/FSME IgG (NovaTec Immundiagnostica, Германия). Обработку результатов исследования проводили в программах «ПАРАЛАЙН» (ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения РФ), Statistica ver. 12 (StatSoft, Inc.) при доверительной вероятности 95%.

Результаты и обсуждение. Согласно инструкциям по применению содержание IgG к вирусу КЭ выражают в Е/мл («ВектоВКЭ-IgG»), титрах («ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-G») и NTU/ml (NovaLISA TBE/FSME IgG), что не позволяет сопоставить результаты определения. Поэтому для получения адекватных данных для проведения сравнительного анализа количественное определение IgG к вирусу КЭ в исследуемых пробах осуществляли методом сравнения с референсным образцом (РО). В качестве РО использовали экспериментальный образец иммуноглобулина человека с активностью антител к вирусу КЭ 1:80 в реакции торможения гемагглютинации, выделенный из плазмы крови доноров, иммунизированных вакциной КЭ (ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Россия). Для реализации метода на иммунологическом планшете готовили серии разведений РО и исследуемых проб. Данные регистрации оптической плотности для каждого образца обрабатывали в сравнении с результатами для РО. Такой подход позволил рассчитать эквивалент единиц измерения содержания антител IgG к вирусу КЭ, выраженный в коэффициентах активности (K_a), благодаря чему стало возможным сопоставить результаты ИФА, полученных с использованием наборов реагентов разных производителей. Значения K_a для образцов сыворотки варьировали от 0,4 до 1,2, для препаратов – от 1,2 до 1,7. Сравнение K_a для одного образца на разных тест-системах не выявило значимых различий ($p_{min} = 0, 641 > 0,05$).

Заключение. Результаты исследования позволяют сделать вывод, что для получения статистически достоверных статистически результатов количественного определения содержания антител IgG к вирусу КЭ методом ИФА с использованием диагностических наборов разных производителей необходимо обязательно использовать референсный образец.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ БОЛЬНЫХ АКАНТОЛИТИЧЕСКОЙ ПУЗЫРЧАТКОЙ

Кубанов А.А., Абрамова Т.В.

ФГБОУ ДПО ««Российская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Акантолитическая пузырчатка – тяжелый аутоиммунный буллезный дерматоз, характеризующийся поражением кожи и/или слизистых оболочек. Ведущая роль в патогенезе пузырчатки отводится аутоиммунным реакциям, приводящим к акантолизу. При первичном обращении за медицинской помощью больных диагноз пузырчатки устанавливается лишь в 9-30% случаев. Частота диагностических ошибок особенно высока при изолированном поражении слизистой оболочки рта или ограниченных высыпаниях на коже. К тому же, существующие методы диагностики пузырчатки имеют свои преимущества и недостатки, но ни один из них в отдельности не обладает 100% чувствительностью и специфичностью, а низкоспецифичные методы сопровождаются большим числом ложноположительных результатов

Цель. Изучить диагностическую значимость клинических и лабораторных методов исследования при обследовании больных акантолитической пузырчаткой.

Материалы и методы. В исследование включено 132 больных акантолитической пузырчаткой, у которых проведено клинико-лабораторное обследование: клиническое исследование с выявлением вялых пузырей и/или эрозий на коже и/или слизистых оболочках у 132 больных пузырчаткой; определение симптома Никольского у 132 больных пузырчаткой; выявление акантолитических клеток Тцанка в мазках-отпечатках со дна эрозий у 132 больных пузырчаткой при цитологическом исследовании; определение акантолиза в биоптатах кожи у 122 больных пузырчаткой при патоморфологическом исследовании; выявление фиксации иммуноглобулинов G в межклеточных промежутках эпидермиса у 111 больных пузырчаткой методом реакции иммунофрлюоресценции (РИФ) с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии; определение антител к десмоглеинам (Dsg) 1 и 3 типов в крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) 119 больных пузырчаткой. Контрольную группу составляли 100 здоровых лиц.

Сравнение результатов обследования больных пузырчаткой клиническими и лабораторными методами исследования проводили путем оценки диагностической эффективности лабораторных методов исследовании (ГОСТ Р 53022.3-2008).

Результаты. Высокая диагностическая значимость при обследовании больных акантолитической пузыр-

чаткой установлена для реакции иммунофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (диагностическая чувствительность = 97,3%; диагностическая чувствительность = 100,0%; диагностическая эффективность = 98,6%; предсказательная ценность положительных результатов = 100,0%; предсказательная ценность отрицательных результатов = 97,1%) Приемлемой эффективностью (диагностическая эффективность в диапазоне 80-90%) обладали: клинический метод – симптом Никольского и лабораторный – патоморфологический метод (81,9% и 86,9% соответственно). Низкая эффективность (показатель диагностической эффективности менее 79%) установлена у цитологического (76,9%), ИФА с определением антител к десмоглеинам 1 и 3 типов (75,7%) методов исследований. У метода визуального клинического обследования показатель был на уровне только 51,3%.

Заключение. Для дифференциальной диагностики акантолитической пузырчатки необходимо проведение клинических обследований, а также лабораторных методов исследований: цитологического, гистологического, иммуноферментного анализа. Рекомендуется исследование биоптатов кожи методом реакции иммунофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для установления фиксации специфических иммуноглобулинов в коже, что позволит повысить качество диагностики и назначать адекватную терапию больным пузырчаткой.

ИММУНОРЕГУЛЯЦИЯ ГАСТРИТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Матвеева Л.В., Мосина Л.М., Капкаева Р.Х.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

Введение. Воспалительный процесс в слизистой оболочке желудка (СОЖ) может становиться хроническим и приводить к атрофии, мета- и дисплазии желудочного эпителия в условиях иммунного дисбаланса.

Цель. Определить клеточно-цитокиновые изменения при обострении хронического гастрита.

Материалы и методы. Обследовали при информированном согласии 40 здоровых добровольцев – контрольная группа, 42 пациента с хроническим неатрофическим гастритом – 1-я группа, 40 больных очагово-атрофическим (I–II ст.) гастритом – 2-я, 40 больных распространенным атрофическим (III–IV ст.) гастритом – 3-я группа. Диагноз подтверждали при гистологическом исследовании гастробиоптатов. Забор крови для исследования проводили при первичном обращении до проведения лечения натощак из локтевой вены в объеме 3 мл в пробирку с ЭДТА, 3 мл – в сухую стерильную пробирку, сыворотку отделяли центрифугированием. Иммунофенотип лимфоцитов по CD-антигенам определяли иммунофлюоресцентным методом. Исследовали сывороточные уровни IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IFNγ иммуноферментным методом с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Результаты статистически обработали.

Результаты. Относительное количество $CD3^+$ лимфоцитов у больных 1-й группы при сравнении с данными здоровых лиц проявляло тенденцию к увеличению, 2-й и 3-й групп – повышалось. Абсолютные значения $CD3^+$ клеток у больных очагово-атрофическим гастритом были большими, чем при обострении неатрофического гастрита. Относительное количество $CD4^+$-лимфоцитов у больных превышало значения здоровых лиц, а при неатрофическом гастрите – и значения 3-й группы. У больных хроническим атрофическим гастритом количество $CD8^+$ лимфоцитов статистически значимо превышало значения контрольной и 1-й групп. Отношение $CD4^+/CD8^+$ в 1-й группе превышало значения контрольной и 3-й групп, соответствуя индивидуальным изменениям Т-лимфоцитов с хелперной и цитотоксической активностью. Численность $CD16^+$ клеток в крови больных превышала значения здоровых лиц и возрастала с увеличением стадии атрофии СОЖ. Относительное и абсолютное количество $CD19^+$ лимфоцитов во всех группах больных было меньше значений контрольной группы, что характерно для активного воспалительного процесса.

У больных сывороточный уровень IL-1β повышался относительно средних значений здоровых лиц: в 1-й группе – на 169,3%, во 2-й – на 136,5%. Уровень IL-2 превышал значения контрольной группы во всех группах больных, у пациентов с распространенным атрофическим гастритом был больше средних цифр больных неатрофическим гастритом на 169,9% и значений больных очагово-атрофическим гастритом на 117,2%. Количество IL-4 превышало средние значения контрольной группы в 1-й группе на 76,4%, во 2-й – на 119,2%, в 3-й – на 128,4%. Сывороточный уровень IL-6 у больных был выше средних значений здоровых лиц: в 1-й группе – на 64,5%, во 2-й – на 78,1%, в 3-й – на 35,7%. Количество IL-8 статистически значимо превышало средние значения контрольной группы в 1-й и 2-й группах. Сывороточный уровень IL-10 у больных достоверно не отличался от значений контрольной группы: в 1-й группе увеличивался на 17,3%, во 2-й – на 3,9%, в 3-й группе – на 25,1%. Количество IL-17 в сыворотке больных достоверно повышалось относительно средних значений контрольной группы во всех группах сравнения. Сывороточный уровень IL-18 у обследованных пациентов повышался относительно средних значений контрольной группы в 1-й группе на 23,2%, во 2-й и 3-й группах – на 40,5 и 58,9 % соответственно. Концентрация IFNγ в сыворотке крови больных превышала значения клинически здоровых лиц: в 1-й группе – на 256%, во 2-й – на 154,8%, в 3-й – на 222%.

Заключение. При обострении неатрофического гастрита повышение количества $CD4^+$ и $CD16^+$ клеток, уровня IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, IFNγ сочеталось с уменьшением численности $CD8^+$ и $CD19^+$ лимфоцитов. У больных хроническим очагово-атрофическим и распространенным атрофическим гастритом в стадии обострения определялись увеличение количества $CD3^+$ лимфоцитов, $CD4^+$, $CD8^+$, и $CD16^+$ клеток, IL-2, IL-4, снижение содержания $CD19^+$ лимфоцитов. Количество IL-10 в фазе обострения воспалительного процесса минимально, нарастало при прогрессировании атрофии СОЖ и уменьшении степени воспаления, ограничивая действие провоспалительных цитокинов и, возможно, усиливая репарацию слизистой.

СПОСОБЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДКА

Матвеева Л.В., Мосина Л.М., Капкаева Р.Х.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

Введение. Несоблюдение режима и качества питания, частые стрессы, прием ряда лекарственных средств, вредные привычки способствуют развитию и хронизации заболеваний желудка, создают условия для онкотрансформации желудочного эпителия.

Цель. Разработать способы иммунодиагностики заболеваний желудка.

Материалы и методы. При получении информированного согласия обследовали 70 больных с обострением хронического гастрита в возрасте 21–75 лет, из них 10 пациентов с катаральным гастритом, 60 пациентов с атрофическим гастритом. Среди 42 больных язвенной болезнью желудка (ЯБЖ) наибольшее количество (26,2%) приходилось на возраст 50–54 года, легкое течение заболевания отмечалось у 12 пациентов, течение средней тяжести – у 20, тяжелое течение – у 10. Обследовали 40 больных раком желудка в возрасте от 35 до 79 лет, II стадия опухолевого процесса была определена у 11 (27,5%) пациентов, III – у 15 (37,5%), IV – у 14 (35%). Диагноз выставляли на основании клинических данных, результатов ЭГДС и гистологического исследования гастробиоптатов. 40 здоровых добровольцев составили контрольную группу.

Забор крови для исследования проводили при первичном обращении до проведения лечения в утренние часы натощак из локтевой вены в объеме 5 мл в сухую стерильную пробирку, сыворотку отделяли центрифугированием. Определение сывороточных концентраций фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), секреторного иммуноглобулина А (sIgA), раково-эмбрионального антигена (CEA), ракового антигена 72-4 (CA 72-4), пепсиногена (PG)-1, -2 проводили иммуноферментным методом с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Результаты. Определение сывороточных концентраций VEGF, sIgA, CEA, CA 72-4, PG-1, PG-2 у здоровых добровольцев позволило установить интервал нормы.

При оценке уровня VEGF у пациентов с хроническим гастритом отмечалось повышение его количества. Степень тяжести атрофии слизистой оболочки желудка (СОЖ) определяла увеличение концентрации VEGF в 2,75 раза по сравнению с контролем ($p < 0,001$), превышая в 75% случаев верхние границы нормальных значений (226 пг/мл), и в 1,75 раза ($p < 0,001$) превышая показатель в группе пациентов с неатрофическим гастритом. При поверхностном гастрите уровень VEGF лишь в 20% случаев превышал верхнюю границу нормальных значений (Матвеева Л.В., Мосина Л.М. Патент РФ №2474824; 17.11.2011).

Оценка уровня sIgA и PG-2 у большинства больных ЯБЖ выявила повышение их количества, зависящее от течения заболевания, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$), превышая верхние границы нормальных значений в 90,5 и 61,9 % случаев соответственно. Уровень CA 72-4 был выше верхней границы нормальных значений у всех больных с тяжелым течением, частыми обострениями ЯБЖ. При значении sIgA большем или равном 5,0 мг/л, PG-II больше 16,0 мкг/л, уровне CA 72-4 меньшем или равном 2,0 Ед/мл прогнозировали легкое течение ЯБЖ. При значении sIgA большем или равном 6,9 мг/л, PG-II большем или равном 17,5 мкг/л, уровне CA 72-4 меньшем или равном 6,9 Ед/мл прогнозировали течение ЯБЖ средней тяжести. При значении sIgA большем или равном 7,2 мг/л, PG-II большем или равном 18,0 мкг/л, уровне CA 72-4 большем или равном 7,0 Ед/мл прогнозировали тяжелое течение ЯБЖ и высокий риск малигнизации (Матвеева Л.В., 2016).

При оценке уровня VEGF и CEA у большинства больных раком желудка, отмечалось по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$) повышение их количества, зависящее от стадии опухолевого процесса, превышая верхние границы нормальных значений в 75 и 60 % случаев. Уровень PG-1 у большинства больных снижался, что указывало на атрофию СОЖ, у части больных с локализацией опухолевого процесса в антральном отделе желудка – повышался. Анализ результатов позволяет при соблюдении одного из условий: значения VEGF больше или равны 226-360 пг/мл, CEA больше или равны 2,8 нг/мл, PG-1 меньше 30 мкг/л; значения VEGF больше 360 пг/мл, CEA больше или равны 5,2 нг/мл, PG-1 меньше 49 мкг/л; значения VEGF больше 1000 пг/мл, CEA больше или равны 5,0 нг/мл, PG-1 больше или равны 105 мкг/л, устанавливать наличие онкотрансформации желудочного эпителия (Матвеева Л.В. и соавт. Патент РФ №2580309; 15.12.2014).

Заключение. На основании полученных данных разработаны способы диагностики атрофического гастрита, прогнозирования течения ЯБЖ, иммунодиагностики рака желудка. Использование данных способов повышает эффективность диагностики заболеваний желудка.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОЧАСТИЦ НА ПРИМЕРЕ NK-КЛЕТОК

Михайлова В.А., Белякова К.Л., Шевелева А.Р., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В настоящее время описан феномен образования клетками микрочастиц, представляющих собой сформированные из плазматической мембраны микровезикулы с диаметром от 100 до 1000 нм. Клетки могут образовывать микрочастицы как в интактном состоянии, так и в результате активации. Микрочастицы присутствуют в периферической крови у здоровых доноров, количество и состав мембранных рецепторов микрочастиц может изменяется при патологиях. В литературе обсуждается возможность передачи сигнала от клетки к клетке с помощью микрочастиц и реализация таким образом бесконтактного межклеточного взаимодействия. Одним из способов детекции микрочастиц клеточного происхождения является проточная цитофлюориметрия. Предприняты попытки детекции микрочастиц лейкоцитарного происхождения с помощью прибора FacsCanto II (BD, США). Однако чувствительность прибора позволяет детектировать частицы размером от 300 нм, что приводит к неполному учету содержания микрочастиц в образцах. Проточный цитофлюориметр Cytoflex (Beckman Coulter),

оснащенный тремя лазерами 488 нм, 638 нм, 405 нм и позволяющий детектировать боковое рассеяние от лазера 405 нм, дает возможность определять частицы размером от 200 нм. В настоящее время все больше внимания уделяется детекции и оценке динамики содержания микрочастиц лейкоцитарного происхождения. Одной из популяций лейкоцитов являются NK-клетки. В настоящее время нет прямых свидетельств о способности NK-клеток продуцировать микрочастицы. Поэтому **целью** настоящей работы была оценка содержания и фенотипа микрочастиц, образуемых NK-клетками.

Материалы и методы. В качестве клеток-источников микрочастиц были выбраны NK-клетки линии NK-92 (ATTC, США). Клетки линии NK-92, являются суспензионной культурой, и воспроизводят основные фенотипические и функциональные характеристики активированных NK-клеток. В качестве индуктора использовали IL-1β (100 нг\мл) (Sigma, USA).

Для оценки фенотипа NK-клеток линии NK-92 и образуемых ими микрочастиц клетки культивировали в 24-луночных планшетах при 37 °C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в течение 24 часов в присутствии индуктора и без него. Через сутки планшеты центрифугировали при 200 g и собирали надосадочную жидкость. Для выделения микрочастиц использовали модифицированный метод дифференциального центрифугирования M.P. Gelderman, J. Simak (2008). К осадку клеток в 24-луночные планшеты добавляли раствор CellWash (BD, США), ресуспендировали клетки и переносили их в пробирки для анализа на проточном цитофлюориметре. Все исследуемые пробы обрабатывали моноклональными антителами к CD11b в соответствии с указаниями производителя (BD, США). Экспрессию рецептора оценивали при помощи проточного цитофлюориметра Cytoflex (Beckman Coulter). Перед измерением проб, содержащих микрочастицы, для настройки прибора использовали калибровочные частицы размером 0,1 мкм; 0,2 мкм; 0,5 мкм; 1,0 мкм. Для работы с микрочастицами фильтровали все растворы через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм. Статистический анализ проводили в компьютерной программе Statistica 10, используя параметрический критерий Стьюдента.

Результаты. Установлено, что 99% NK-клеток экспрессировали на своей поверхности CD11b. Инкубация клеток в присутствии IL-1β не приводила к изменению экспрессии CD11b NK-клетками. Относительное количество микрочастиц, образованных NK-клетками линии NK-92, экспрессирующих CD11b, было заметно ниже по сравнению с клетками-источниками. Активация NK-клеток IL-1β не влияла на относительное количество микрочастиц, однако приводила к снижению интенсивности экспрессии на микрочастицах CD11b.

Заключение. NK-клетки линии NK-92 способны к образованию микрочастиц. В присутствии IL-1β микрочастицы NK-клеток включают в свой состав меньшее количество рецепторов CD11b, чем без индуктора, что может отражать снижение активационного сигнала, передаваемого NK-клетками, за счет микрочастиц.

СЕРОТИП-СПЕЦИФИЧНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРДНЫХ АНТИГЕНОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Нуриев Р.И.[1,2], Гальвидис И.А.[1], Буркин М.А.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Введение. В последние годы на территории России наблюдается изменение спектра циркулирующих серотипов *S. pneumonia*e, связанное с началом широкого применения противопневмококковых вакцин. В связи с ограниченностью числа серотипов, на профилактику которых направлены существующие вакцины, возникает необходимость в проведении постоянного мониторинга серотипового пейзажа *S. pneumonia*e для дальнейшей направленной разработки новых вакцинных препаратов. Одним из способов контроля эпидемиологической ситуации может служить иммунохимическое определение капсульных полисахаридных антигенов *S. pneumoniae* в биологических жидкостях, в частности, в моче, у лиц с активной пневмококковой инфекцией.

Цель и задачи. Разработать иммуноанализ, позволяющий проводить серотип-специфичное определение капсульных полисахаридных антигенов *S. pneumonia*e в биологических жидкостях.

Материалы и методы. В качестве модельных антигенов были взяты очищенные капсульные полисахариды *S. pneumoniae* серотипов 9N и 3 (Ястребова Н.Е.). Серотип 3 является одним из наиболее вирулентных, а 9N, несмотря на то, что циркулирует в популяции, не представлен в современных вакцинах. На основе данных полисахаридов приготовлены конъюгаты с овальбумином (OVA-Ps9N) и желатином (Gel-Ps3), которые использовались в качестве твердофазных антигенов в конкурентном ИФА. Поликлональные антитела к *S. pneumoniae* соответствующих серотипов были получены в результате многократной иммунизации кроликов.

Результаты. Полученные реагенты позволяли проводить определение Ps9N и Ps3 в буферном растворе до 2,5 и 6 нг/мл соответственно, а помехи со стороны мочи могли быть нивелированы при 5-кратном разведении образцов. Отсутствие перекрестной реактивности как с полисахаридными антигенами, так и с суспензиями микробных клеток *S. pneumoniae* серотипов 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18, 19F, 23F подтвердило абсолютную специфичность тестов. Методы также оказались пригодными для серотипирования штаммов *S. pneumoniae* (10^5-2×10^6 м.к./мл). Применение конъюгатов позволило в 30 раз, по сравнению с полисахаридами, снизить расход реагентов в анализе.

Заключение. Разработанный ИФА пригоден для серотип-специфичного определения полисахаридных антигенов в биологических жидкостях и выявления микробных клеток *S. pneumoniae*. Применение конъюгатов в качестве твердофазных антигенов позволило повысить чувствительность анализа, а также значительно снизить расход реагентов по сравнению с использованием препаратов очищенных полисахаридов. Данный метод, в отличие от микробиологических, может применяться и при антибиотикотерапии, что делает его удобным

инструментом для проведения эпидемиологических исследований. Аналогичный подход применим для идентификации большинства других циркулирующих серотипов *S. pneumoniae*.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА КОЛЬЦЕВОЙ КОВАЛЕНТНО-ЗАМКНУТОЙ ДНК ВГВ В ПУНКЦИОННЫХ БИОПТАТАХ ПЕЧЕНИ

Останкова Ю.В.[1], Семенов А.В.[1, 2], Тотолян Арег А.[1, 2]

[1] Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Гепатит В является одним из наиболее распространенных гепатотропных вирусов, передающихся при контакте с кровью или иными жидкостями организма инфицированного человека, поражающих печень и способных вызывать как острое, так и хроническое течение заболевания. Согласно ВОЗ количество инфицированных вирусом гепатита В в мире составляет почти 2 млрд человек, у более чем 240 миллионов из них развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ). Ранее была показана возможность существования ВГВ в виде кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккз ДНК) в гепатоцитах на различных клинических стадиях хронического вирусного гепатита В (ХВГВ) в течение длительного при отсутствии иных маркеров вирусного гепатита В (ВГВ) и сохранении возможности реактивации. По некоторым данным высокий уровень ккз ДНК в тканях печени являются фактором риска рецидива ВГВ, несмотря на профилактическую терапию. Современные противовирусные препараты способны подавлять репликацию ВГВ и способствовать снижению риска развития различных осложнений заболевания печени, ведутся активные поиски по разработке терапевтического курса, конечной целью которого будет полная элиминация ккз ДНК ВГВ для предотвращения возможной реактивации вируса. В связи с вышесказанным введение в практическую лабораторную диагностику метода выявления и количественной оценки ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени как способа идентификации заболевания и оценки репликации вируса имеет большое значение для обнаружения оккультного гепатит В и для определения стратегии лечения пациентов с ХВГВ.

Цель. Разработать метод количественной оценки ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени.

Материалы и методы. Материалом служили остатки плазмы крови и биопсийного материала печени 128 пациентов, полученные в ходе выполнения плановых или рутинных исследований в медучреждениях.

Результаты. Для количественной оценки ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на базе методики, предложенной Pollicino T. с соавторами для выявления ккз ДНК ВГВ. Выделенную из образцов ДНК для удаления одноцепочечных НК и расщепления частично-кольцевой геномной ДНК ВГВ предварительно обрабатывали эндонуклеазой MungBean, после чего положительный сигнал регистрировался только от ккз ДНК ВГВ. В ходе работ использовали различные дополнительные компоненты для амплификации, введение в амплификационную смесь эмпирически подобранного количества DMSO и глицерина, способствующих увеличению эффективности ПЦР и препятствующих образованию вторичных структур за счет стабилизации Taq ДНК-полимеразы и влияния на температуру отжига праймеров, привело к стабильной регистрации сигнала. Для количественного анализа использовали зонды TaqMan. Уровень ккз ДНК ВГВ нормировали на количество ДНК референсного гена. В качестве референсных генов были опробованы β-глобин, β-актин и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH). Для количественной стандартизации амплификации с олигонуклеотидами для ВГВ использовали образцы ДНК ВГВ, предварительно охарактеризованные с помощью набора «АмплиСенс HBV – Монитор – FRT» для количественной амплификации. Для количественной стандартизации амплификации с праймерами генов β-глобина, β-актина и GAPDH использовали предварительно количественно охарактеризованные лейкоцитарные взвеси, полученные из образцов периферической крови. Для каждого образца реакцию проводили в трех повторностях, далее усредняли значение Ct для них. Анализ результатов проводился по методу относительного подсчета (метод дельта Ct) с нормализацией по эндогенному референс гену. Для оценки эффективности реакции для каждого гена делали серию разведений образца. Эффективность реакции автоматически рассчитывалась прибором. Специфичность и отсутствие побочных продуктов подтверждали прямым секвенированием фрагментов и анализом кривых плавления для данных ПЦР продуктов

Заключение. Разработанный метод обладает высокой специфичностью и позволяет проводить количественную оценку ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени.

НОВАЯ ПАНЕЛЬ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К IgA ЧЕЛОВЕКА

Порываева В.А., Агафонова О.А., Марченко А.К., Вторушина И.А., Кувшинова И.Н., Ткаченко Т.Н., Кротова В.А., Масяго Л.Н., Гладкова С.Е., Рукавишников М.Ю.

АО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Выявление специфических антител (АТ) класса IgA при некоторых инфекциях (хламидиоз, токсоплазмоз, кандидоз, уреаплазмоз, микоплазмоз и ряд других) играет важную роль в комплексной диагностике заболеваний, позволяя определять стадию болезни и эффективность лечения.

Целью нашей работы было получение новой панели моноклональных антител МоАТ к сывороточному IgA (IgAs) человека для выявления IgA-антител в непрямом иммуноферментном анализе (ИФА) в сыворотке крови людей.

Гибридомы получили слиянием спленоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных очищенным IgAs

(MP Biomedicals), с клетками мышиной миеломы NS1. Гибридомные антитела были исследованы на реактивность с IgM, с IgAs и IgA секреторным (IgAsecr), с изотипами IgG человека. Оказалось, что антитела 16-ти гибридом связывались с лёгкой k-цепью Ig (реакция с IgM, IgG1-k, IgG2-k, IgG3-k, с IgG4-k, с IgAs и IgAsecr), 7 гибридом – с лёгкой λ-цепью Ig (реакция с IgM, IgG1-λ, IgG2-λ, IgG3-λ, с IgG4-λ, с IgAs и IgAsecr). 29 гибридом синтезировали АТ, высокоспецифичные только к IgA. Все они давали высокие титры как с сывороточным, так и с секреторным IgA, т.е. связывались с тяжёлой α-цепью. Отношение обратных титров в реакции с IgAs и IgAsecr варьировало от 0,1 до 10.

С использованием конкурентного ИФА антитела к α-цепи были разбиты на 6 групп. Методом лимитирующих разведений мы отклонировали до однородности субклонов по свойствам синтезируемых АТ 11 гибридом, принадлежащих к разным группам конкуренции и имеющих высокие титры специфических антител. Для них получены асцитные препараты МоАТ, антитела очищены методом аффинной хроматографии на SpA-сефарозе и для них синтезированы пероксидазные конъюгаты.

8 МоАТ из нашей панели показали себя пригодными в диагностических наборах при выявлении IgA-антител при диагностике ряда заболеваний: хламидиоза, токсоплазмоза, уреаплазмоза, кандидоза, микоплазмоза, целиакии. Отобраны МоАТ для количественного определения сывороточного IgA.

ОСОБЕННОСТИ СПОНТАННОЙ И МИТОГЕН-СТИМУЛИРОВАННОЙ СЕКРЕЦИИ IgG4 У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Терехов И.В.

Медицинский институт Тульского государственного университета, Тула, Россия

Нарушение продукции отдельных подклассов иммуноглобулина IgG ассоциировано с различной патологией внутренних органов – т.н. IgG4-ассоциированные состояния. Патогенез данного состояния исследован недостаточно, как и недостаточно изучена регуляция продукции IgG4. С учетом целесообразности более глубокого изучения молекулярных механизмов регуляции секреции IgG4, целью настоящего исследования являлось изучение в условиях спонтанной активности, а также при воздействии комплексного митогена, взаимосвязи секреции IgG4 с продукцией мононуклеарными клетками (МНК) цельной крови практически здоровых лиц интерлейкинов (ИЛ) IL-1, IL-5, IL-10, IL-17A и содержанием в МНК факторов транскрипции AP-1, NF-κB, T-box, GATA-3, NF-IL6.

Материалы и методы. Материалом исследования служила венозная кровь практически здоровых лиц (n = 30) из числа доноров крови (средний возраст 22,5±2,5 года). В исследовании использованы наборы для культивирования и митогенной активации клеток цельной крови производства ЗАО «Вектор-Бест» (митоген в составе липополисахарида – ЛПС, конканавалина, фитогеммаглютинина). Выделение МНК и подготовка ядерно-цитоплазматических лизатов осуществляли в соответствии с рекомендациями производителей наборов реагентов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА), для чего использовали 1 мл клеточной суспензии, содержащей 5×10^6 МНК, жизнеспособность которых составляла более 90%. В соответствии с поставленной целью, в лизате МНК методом ИФА определяли содержание факторов транскрипции AP-1, NF-κB, T-box, GATA-3, NF-IL6, а также в супернатанте – концентрацию цитокинов: IL-1, IL-5, IL-10, IL-17A, а также IgG4. В процессе исследования рассчитывали среднее значение, 25 процентиль, медиану выборки и 75 процентиль. Статистическую значимость оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Содержание в клеточном супернатанте IgG4 составило 0,5 (0,16; 0,53; 0,82) мг/мл, концентрация IL-1 составила 15,4 (12,7; 16,1; 18,1) пг/мл, IL-5 – 2,5 (2,0; 2,5; 3,1) пг/мл, IL-10 – 14,3 (12,9; 13,4; 15,7) пг/мл, IL-17A – 2,6 (2,3; 2,6; 2,8) пг/мл. Уровень в МНК фактора транскрипции NF-IL6 составил 0,47 (0,15; 0,23; 0,79) нг/мл, GATA3 – 0,15 (0,08; 0,1; 0,23) нг/мл, T-box – 1,28 (1,2; 1,31; 1,37) нг/мл, AP-1 – 0,16 (0,14; 0,17; 0,17) нг/мл, NF-κB – 0,58 (0,48; 0,58; 0,68) нг/мл. Проведенный анализ показал, 24-ти часовая инкубация клеток крови с комплексным митогеном способствовала статистически значимому возрастанию продукции IgG4, в среднем, в 3,2 раза, IL-1 – в 3,6 раза, IL-5 – в 9,2 раза, IL-10 – в 4,8 раза, IL-17A – в 9,2 раза. При этом содержание фактора транскрипции NF-IL6 возросло в 12,0 раз, GATA3 – в 35,8 раза, T-box – в 7,2 раза, AP-1 – в 29,9 раза, NF-κB – в 10,6 раза. Таким образом, под влиянием комплексного митогена отмечается выраженная стимуляция продукции IL-17A и IL-5, что свидетельствует об активации Т-хелперов 2 типа и Т-хелперов-17. Проведенный анализ показал, что коэффициент линейной корреляции спонтанного уровня секреции IgG4 и IL-1 составил -0,69, IgG4 и IL-5 составил 0,73, IgG4 и IL-10 составил -0,74, IgG4 и IL-17A – 0,97, IgG4 и NF-IL-6 – 0,72, IgG4 и GATA3 – 0,74, IgG4 и T-box – -043, IgG4 и AP-1 – 0,53, IgG4 и NF-κB – -0,93. Результаты оценки корреляции соответствующих показателей в культурах, подвергнутых митогенной стимуляции, выявили снижение корреляции IgG4 и IL-1 до -0,59, IgG4 и IL-10 до -0,67, IgG4 и NF-κB до -0,2. Так же выявлено изменение знака и снижение силы корреляции IgG4 и IL-5 до -0,31, IgG4 и IL-17A до -0,85, IgG4 и NF-IL-6 до -0,51. На этом фоне отмечалось повышение силы взаимосвязи секреции IgG4 и уровня в МНК фактора GATA3 до 0,92, IgG4 и AP-1 до 0,58, IgG4 и T-box до -0,79.

Заключение. Спонтанная секреция IgG4 находится в тесной положительной зависимости от продукции IL-5 и сильной отрицательной – от IL-10. Результаты оценки стимулированной продукции IgG4 позволяют говорить о значительной роли в ее регуляции фактора транскрипции GATA3, способствующего усилению антителообразования, а так же фактора транскрипции T-box, способствующего угнетению секреции IgG4 совместно с NF-IL6. При этом дисрегуляция активности факторов транскрипции GATA3 и T-bet может являться одной из причин высокой продукции В-лимфоцитами и плазматическими клетками IgG4 и развития ассоциированных клинических состояний.

ДЕТЕКЦИЯ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ НОВЫМ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА

Ткаченко О.Ю.[1], Лапин С.В.[1], Шмонин А.А.[1], Соловьева Л.Н.[1], Бондарева Е.А.[1], Сельков С.А.[2], Чепанов С.В.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома (АФС) состоит в выявлении антифосфолипидных антител (АФА) методом иммуноферментного анализа (ИФА), а именно в детекции антикардиолипиновых (аКл) антител и антител к бета-2-гликопротеину (аβ2Гп). Использование классических ИФА тест-систем затруднено их недостаточной стандартизацией. Новым подходом к детекции антифосфолипидных антител является использование иммуноблоттинга, преимуществом которого является сорбция антигенов на гидрофобной PVDF-мембране и комплексный подход к диагностике АФС.

Материалы и методы. Нами была собрана коллекция образцов сывороток 45 пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 19 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и 44 пациентов с привычным невынашиванием беременности, а также 120 клинически здоровых доноров. В данных сыворотках были измерены аКл IgG, аКл IgM, аβ2ГП1 методом ИФА с помощью тест-систем фирм Euroimmun (ПР1) и Orgentec Diagnostica (ПР2) и аКл IgG, аКл IgM, аβ2ГП1, а также некритериальные АФА – методом иммуноблоттинга на тест-системе фирмы Medipan (ПР3).

Результаты. Классическим методом ИФА при использовании пограничного значения, заявленного производителями, АФА были выявлены у 57% пациентов, методом иммуноблоттинга – у 40%, при этом средние и высокие титры определялись у 14% пациентов при использовании ИФА тест-систем, и у 23% – при использовании нового метода иммуноблоттинга. В группе пациентов с привычным невынашиванием частота АФА значимо выше, чем в группах пациентов с некардиоэмболическими инсультами и рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей. Встречаемость критериальных АФА, измеренных методом иммуноблоттинга, для аβ2ГП составила 50%, для аКл – 20%. Среди минорных антител к наиболее значимыми оказались антитела к фосфатидилсерину, аннексину и фосфатидной кислоте (встречаемость составила 20%).

Выводы. Использование классического подхода к диагностике АФС сопряжено с рядом серьезных проблем (большое количество низкоположительных результатов). Новый метод иммуноблоттинга обладает более высокой чувствительностью при средних и высоких титрах АФА. Использование нового принципа определения АФА позволяет увеличить количество подтвержденного АФС.