

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА

Александров А.В., Шилова Л.Н., Емельянова О.И.,
Новикова О.В., Емельянов Н.Н.

НИИ клинической и экспериментальной ревматологии
РАМН, г. Волгоград, Россия

Введение. Данные литературы об изменении активности различных ферментов при взаимодействии со специфическими антителами противоречивы. Учитывая характерные иммунологические нарушения при аутоиммунных заболеваниях, можно предположить, что изменение энзиматической активности ряда ферментов пуринового метаболизма (ПМ) может быть связано с гиперпродукцией аутоантител (Ат) к ним.

Материалы и методы. Источником специфических иммуноглобулинов служили сыворотки больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой с заранее определенными высокими титрами Ат (экстинкция $> 0,16$ Ед) к аденозиндезаминазе (АДА), 5'-нуклеотидазе (5'-НТ), пуриннуклеозидфосфорилазе (ПНФ) и гуаниндезаминазе (ГДА). «Чистые» Ат к ферментам получали с помощью иммуносорбента, представляющего собой двойные полиакриламидные гранулы с магнитным материалом и иммобилизованным в них соответствующим энзимом в качестве антигенной матрицы [Гонтарь И.П., 2002], с которым была проведена инкубация (1 час, 37 °С) сывороток больных на магнитной мешалке, а затем диссоциация комплекса антигенантитело с помощью 0,1 М глицин-HCl буфера, pH = 2,5. После соответствующего диализа против забуференного физиологического раствора и последующего концентрирования через полупроницаемую мембрану системы «Sartorius» (Великобритания) до первоначального объема сыворотки, Ат к АДА, 5'-НТ, ПНФ и ГДА использовались в эксперименте по изучению их взаимодействия с соответствующим ферментом: была проведена инкубация антигенного иммуносорбента и растворимой формы энзима с полученными Ат (1 час, 37 °С на магнитной мешалке; затем определена ферментативная активность. В качестве контроля применяли растворы АДА, 5'-НТ, ПНФ и ГДА в физиологическом растворе (n = 30, для каждого фермента) и сыворотки практически здоровых людей (n = 30).

Результаты. После взаимодействия каждого фермента с соответствующими «чистыми» Ат были выявлены изменения активности АДА, 5'-НТ, ПНФ и ГДА различной степени выраженности, причем данные изменения существенно различались при использовании растворимой и иммобилизованной форм ферментов. Так, например, активность

растворимой формы 5'-НТ после взаимодействия со специфическими («чистыми») Ат снизилась менее чем на 40%; различия с контрольной группой (физиологический раствор) и донорами достоверны ($p = 0,008$ и $p = 0,046$ соответственно). Уменьшение активности иммобилизованной формы 5'-НТ по сравнению с исходными значениями произошло почти в 2 раза; выявлены статистически достоверные различия с физиологическим раствором ($p = 0,0007$) и донорами ($p = 0,0077$). Сходная картина наблюдалась и при изучении влияния специфических Ат на активность растворимой и иммобилизованной форм АДА и ПНФ (достоверные различия с физиологическим раствором, $p = 0,002$, $p = 0,007$; и донорами, $p = 0,003$, $p = 0,045$ соответственно). Активность иммобилизованной ГДА практически полностью ингибировалась специфическими Ат ($p < 0,0001$), в отличие от растворимой формы фермента, при использовании которой хотя и наблюдалось снижение активности, но не столь существенное ($p < 0,0012$).

Антиферментные Ат, как правило, специфичны не по отношению к активному центру энзима, а по отношению к белку в целом. Если антигенные детерминанты фермента расположены вне его активного центра, то последний и в фермент-антиферментном комплексе может оставаться доступным для субстрата (АДА, 5'-НТ и ПНФ). В случае, когда участки фермента, от которых зависят его антигенные свойства, частично захватывают и область активного центра (ГДА), антифермент может выступать в качестве ингибитора, конкурирующего с субстратом.

Заключение. Включение энзима в пространственную решетку полиакриламидного геля (иммобилизованная форма) придает ферменту-антигену новые свойства и может приводить к возникновению незначительных конформационных изменений, сохраняющих активность фермента, но в то же время способствующих, например, экспрессии гидрофобных участков молекулы энзима, содержащих «скрытые эпитопы».

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СБОРУ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАРАМЕТРОВ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ СИНДРОМЕ «СУХОГО ГЛАЗА» (ССГ)

Белямова А.Ф., Бржеский В.В., Калинина Н.М.¹,
Аникеева Н.В.¹, Чененова Л.В.¹

Санкт-Петербургская государственная педиатрическая академия, Санкт-Петербург, Россия

¹Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. До сих пор нет достоверных данных о том, является ли повышенный уровень локальных цитокинов

причиной ССГ или наоборот наличие ССГ приводит к увеличению их числа.

Цель: разработать методики сбора материала для исследования цитокинов слезной жидкости и цитологических препаратов конъюнктивы при ССГ.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением находились 25 пациентов (50 глаз) с клиническими проявлениями ССГ ассоциированным с хроническим аллергическим конъюнктивитом (основная группа). Группу сравнения составили 25 пациентов (50 глаз) с хроническим аллергическим конъюнктивитом без признаков ССГ. Пациенты основной группы и группы сравнения были обследованы до и после стандартного в обеих группах лечения (инстилляцией задитена + видисика по 1 капле 2 раза в день в течение 4 недель). Контрольную группу (6 человек — 12 глаз) составили пациенты без проявлений ССГ и хронического аллергического конъюнктивита. Средний возраст пациентов в обследуемых группах составил 29 лет.

Все описанные в литературе способы сбора слезной жидкости позволяют получать для исследований лишь влагу, образованную рефлекторной секрецией слезных желез. Стимуляция такой слезопродукции осуществляется механическим или химическим раздражением рецепторных окончаний тройничного нерва в слизистой оболочке глаза или носа (вдыхание исследуемым паров нашатырного спирта). Однако учитывая сложности сбора слезной жидкости у пациентов с ССГ и малое количество получаемого материала, вышеперечисленные методики не удовлетворяли поставленным задачам. Нами был предложен метод взятия «смывов» с бульбарной конъюнктивы.

После местной анестезии Sol. Inocaini 0,4% в конъюнктивальную полость из одноразового инсулинового шприца постепенно инстиллировали 1,0 мл 0,9% раствора NaCl и сразу же стерильной пипеткой смывную жидкость переносили в стерильный эпендорф. В результате проведенных манипуляций в эпендорфе оказывалось 0,5 мл смывной жидкости, в которой методом ИФА оценивали содержание цитокинов. Также нами были исследованы цитологические препараты с бульбарной конъюнктивы. Стерильным одноразовым зондом (для каждого глаза использовался свой зонд) собирали материал с конъюнктивы глазного яблока в 2-3 мм от лимба в меридиане 12 часов и наносили на предметное стекло.

Результаты. В смывной жидкости пациентов основной группы отмечалось увеличение показателей IL-4, IgE до лечения в 2 раза по сравнению с контрольной группой, а после проведенного лечения количество IL-4, IgE опускалось до нормы. Количество IL-4, IgE в группе сравнения до лечения превышало в 3 и 2 раза соответственно показатели контрольной группы и также снижалось до нормы после лечения.

Отмечалась прямая зависимость повышения исследуемых показателей в слезе от выраженности клинической картины аллергического процесса в глазах.

В цитологических препаратах исследуемых групп эозинофилы не были выявлены, среди эпителиальных клеток обнаружены единичные нейтрофилы.

Заключение. Таким образом, апробированные нами методики позволяют обеспечить сбор материала у пациентов с ССГ и оценить параметры местного иммунитета.

ВЫЯВЛЕНИЕ ИНФОРМАТИВНОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ И ДИАГНОСТИКЕ ХОБЛ

Богданова Е.О., Галкина О.В., Долинина Л.Ю., Трофимов В.И., Зуева Е.Е.

СПбГМУ им. ак. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. На сегодняшний день одной из приоритетных задач здравоохранения является решение проблемы хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Это в первую очередь связано с широким распространением заболевания среди трудоспособного населения, постоянным прогрессированием заболевания, частым сочетанием ХОБЛ с другими заболеваниями легких, что приводит к утяжелению течения болезни. В связи с этим актуальным является ранняя диагностика и оценка эффективности проводимой терапии при ХОБЛ.

Известно, что единицей воспаления при ХОБЛ являются мелкие бронхи, бронхиолы и ацинусы, где в результате воспаления слизистой и подслизистой окружения развивается гипертрофия гладких мышц этих структур, утолщение стенок бронхиол и вовлечение в процесс воспаления микроокружения бронхиол. Эти изменения провоцируют привлечение к месту первичного повреждения фагоцитарно-активных клеток, являющихся основными источниками медиаторов воспаления, среди которых особое место занимает цитокиновая сеть. Следует отметить, что при ХОБЛ регистрируется гиперцитокинемия за счет провоспалительных цитокинов.

Цель. Целью данной работы является выявление наиболее информативного материала для исследования местного уровня цитокинов у пациентов с ХОБЛ. Для этого планируется измерить концентрацию провоспалительных цитокинов (IL-8, TNF α , IFN γ) в сравниваемых материалах — периферической крови, мокроте, смывах из бронхов, бронхоальвеолярном лаваже.

Материал и методы. В ходе исследования рассматриваются 4 материала — периферическая кровь, мокрота, смывы из бронхов, бронхо-альвеолярный лаваж 20 пациентов с ХОБЛ (10 женщин, 10 мужчин) в стадии обострения. Определение концентрации цитокинов проводится иммуноферментным методом с использованием наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург).

Результаты. Предварительная оценка уровня TNF α в не выявила четкой корреляции между повышением концентрации данного цитокина и материалом исследования. Во всех пробах смывов из бронхов концентрация TNF α была очень низкой и не превышала 5 пг/мл, что связано с сильным разведением данного материала в процессе получения. Отработана методика подготовки мокроты для проведения иммунологического исследования, однако в связи с высоким содержанием мукозных компонентов мокрота часто непригодна для иммунологических исследований.

Выводы:

1. Смывы из бронхов не подходят для исследования, так как в процессе получения материал подвергается сильному разведению.

2. Работа с мокротой часто осложнена в связи с ее физико-химическими свойствами.

3. Таким образом, БАЖ и периферическая кровь наиболее удобны для определения местного уровня цитокинов у пациентов с ХОБЛ.

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ HLA-B27 МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ, СВЯЗЬ С НЕКОТОРЫМИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ

Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Васякина Л.И., Чиненова Л.В., Калашникова А.А., Пономаренко В.М.

ФГУЗ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Важным свидетельством роли антигенов системы HLA в иммунобиологии послужило обнаружение их положительной ассоциации с различными заболеваниями. Определение антигена HLA B27 значимо в дифференциальной диагностике аутоиммунных заболеваний, клиника которых включает суставной синдром. Установлена высокая степень ассоциации с антигеном HLA B27 при серонегативных спондилоартропатиях, особенно при анкилозирующем спондилоартрите, синдроме Рейтера и реактивных артритах.

Методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител HLA B27-FITC/HLA B7-PE (Beckman-Coulter) фенотипирование антигена HLA B27 проведено у 248 пациентов с суставным синдромом. Окрашку проводили в цельной крови с последующим использованием реагента Optilyse C для лизиса эритроцитов и однократной отмывкой PBS. Анализ пробы и негативного контроля по изотипу проводили на приборе Cytomics FC500 корпорации «Beckman Coulter». Одновременно у части пациентов методом ИФА определяли спонтанную и индуцированную продукцию $INF\gamma$ («Цитокин») и его содержание в сыворотке, а также антинуклеарные и антифосфолипидные антитела («Orgentec»). В сыворотке крови пациентов было проведено определение циркулирующих иммунных комплексов в полиэтиленгликоле.

Антиген HLA B27 выявлен у 21% обследованных пациентов. В 14,5% случаев результат фенотипирования был сомнительным, пациентам было рекомендовано проведение генотипирования. В группах обследованных с наличием и отсутствием антигена HLA B27 согласно критерию Вилкоксона—Манна—Уитни не было выявлено достоверной разницы уровня аутоантител и ЦИК. У HLA B27⁺ пациентов спонтанная продукция интерферона γ была значимо выше — $125,8 \pm 42,3$ пг/мл по сравнению со второй группой — $65,2 \pm 22,5$ пг/мл. Данные подтверждают участие интерферона γ в аутопрезентации, что приводит к поддержанию воспалительного процесса в суставах. HLA B27⁺ пациенты относятся к группе риска возникновения реактивных артритов и нуждаются в санации очагов хронической инфекции, особенно вирусной этиологии. Этим пациентам не рекомендована терапия стимуляторами продукции интерферонов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИРЕОГЛОБУЛИНА В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ С СИСТЕМОЙ УСИЛЕННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЕРОКСИДАЗЫ СОИ

Вдовенко М.М.¹, Зубков А.В.², Кузнецова Г.И.², Сахаров И.Ю.¹, Кузьмина Н.С.²

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова РАМН, Москва, Россия

Тиреоглобулин (ТГ) является маркером высококодифференцированного рака щитовидной железы (ВДРЩЖ). Ранее нами был разработан иммуноферментный метод определения ТГ при сочетанном использовании моно- и поликлональных антител к ТГ: чувствительность теста составляла 1,5 нг/мл, диапазон определяемых концентраций 3–300 нг/мл; формирующийся комплекс Ag–Ат выявляли с помощью конъюгата аффинноочищенных поликлональных антител к ТГ, меченных пероксидазой из корня хрена (ПХ).

Целью данной работы являлось создание высокочувствительного иммуноферментного метода контроля уровня ТГ с хемилюминесцентной системой детекции. В качестве ферментного маркера использовали пероксидазу сои (ПС), которая относится к группе анионных пероксидаз. По сравнению с пероксидазой хрена фермент обладает большей каталитической активностью и позволяет получать на протяжении длительного отрезка времени стабильный хемилюминесцентный сигнал.

Проведенные эксперименты показали, что замена ПХ на ПС в качестве ферментного маркера в ИФА увеличивала линейный диапазон определяемых концентраций до 500 нг/мл, но не позволяла повысить чувствительность анализа. Это было, возможно, обусловлено низкими величинами интенсивности сигнала хемилюминесценции, продуцируемого в присутствии ПС, по сравнению с ПХ, 6000 ± 2000 у.е. и 35000 ± 5000 у.е. соответственно. Применение усилителей ПХ (4-йод-фенол, 4-гидроксикоричная кислота) практически не влияло на хемилюминесцентный сигнал, индуцируемый ПС. В этой связи был предпринят поиск усилителей для ПС, которые могли бы увеличить интенсивность хемилюминесцентного сигнала, сохранив его стабильным во времени. В результате впервые предложена система усиления хемилюминесцентного сигнала, продуцируемого ПС. Система усилителей (натриевая соль 3-(10'-фенотиазинил)-пропан-1-сульфоната и 4-морфолинопиридина) позволила увеличить величину хемилюминесцентного сигнала до 650 000 у.е. при сохранении его стабильности во времени. При этом чувствительность определения концентрации ТГ составляла $0,4 \pm 0,1$ нг/мл, линейность наблюдалась в диапазоне до 500 нг/мл.

Вариабельность результатов определения уровня ТГ в сыворотке крови людей ($n = 14$) разработанным методом и контрольным (система IMMULITE 2000) была незначительной: коэффициент корреляции равнялся 0,98. В образцах сыворотки с низкой концентрацией (0,2–1 нг/мл) ТГ определялся только при использовании метода с системой усиленной хемилюминесценции. Таким образом, предложенная система усиления хемилюминесценции может быть использована для повышения чувствительности иммунохимических методов анализа.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЕЙ СПОНТАННОЙ И МИТОГЕН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ EX VIVO

Дружинина Ю.Г., Рыжикова С.Л., Рябичева Т.Г., Вараксин Н.А.

ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Интерес к системе цитокинов постоянно растет, о чем свидетельствуют множество оригинальных и обзорных работ, ежегодно публикуемых в научной литературе. Постоянно расширяются и совершенствуются представления о структуре и организации цитокиновой сети, об особенностях ее функционирования в норме и патологии. В последнее время в результате стандартизации методов количественного определения цитокинов сформировались физиологические нормы содержания основных цитокинов в сыворотке и плазме крови. Однако уровни концентраций цитокинов в сыворотке или плазме крови отражают текущее состояние иммунной системы, тогда как в ситуациях, сопряженных с дефицитом или дисбалансом регуляторных факторов, необходимо оценить способность клеток крови к секреции цитокинов. При этом спонтанная продукция цитокинов свидетельствует о том, насколько клетки крови уже активированы *in vivo*, митоген-индуцированная — позволяет оценить потенциальную способность к секреции цитокинов. И хотя по мнению большинства исследователей, эти методы должны занять центральное место в современной иммунодиагностике, в настоящее время ввиду существенных различий результатов разных лабораторий очень трудно, а иногда и невозможно, корректно оценить нарушение цитокинового профиля в конкретном клиническом случае. В настоящее время широкое распространение получил метод оценки способности клеток крови к секреции цитокинов *ex vivo*.

Цель работы: оценить продукцию цитокинов клетками цельной периферической крови (*ex vivo*) условно здоровых добровольцев и определить нормативные диа-

пазоны для спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов с использованием набора «Цитокин — стимул — БЕСТ».

Для исследования использовали цельную кровь 30 условно здоровых добровольцев от 25 до 50 лет. Концентрации цитокинов в полученных супернатантах после культивирования клеток крови с митогеном и в его отсутствии определены с использованием соответствующих наборов реагентов для ИФА производства ЗАО «Вектор-Бест». Воспроизводимость методики оценивали следующим образом: кровь одного пациента вносилась в 10 разных флаконов, и для каждого пациента определялся коэффициент вариации полученных значений внутри выборки.

Результаты приведены в таблице. Как видно из таблицы, полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными, полученными в культуре мононуклеарных клеток. Воспроизводимость методики составила от 6 до 30 %.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ БЕЛКА ТАММА-ХОРСФOLЛА

Крутецкая И.Ю., Климович А.В., Климович В.Б.

ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, Россия

Белок Тамма-Хорсфолла (БТХ), называемый также уромодулином, является специфическим почечным антигеном. Он экспрессируется на мембранах эпителиальных клеток, выстилающих толстый восходящий участок петли Генле. В результате протеолиза БТХ переходит в растворимую форму и экскретируется в количестве 50–200 мг в сутки, представляя собой преобладающую белковую фракцию нормальной мочи. Мыши с выключенным геном БТХ склонны к бактериальной инфекции мочевых путей. Мутации гена БТХ связаны с различными хроническими формами нефритов. Взаимодействие БТХ с пилями

ТАБЛИЦА. УРОВНИ СПОНТАННОЙ И МИТОГЕН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРОВ «ЦИТОКИН – СТИМУЛ – БЕСТ» (К ТЕЗИСАМ ДРУЖИНИНОЙ Ю.Г. И ДР.)

Цитокины	Спонтанная продукция		Митоген-индуцированная продукция	
	Медиана, пг/мл	Диапазон, пг/мл	Медиана, пг/мл	Диапазон, пг/мл
IFN α	0,9	0-16,5	0,5	0-4,5
IL-4	0,1	0-0,1	1,7	0-24
IFN γ	0	0-16	820	128-5340
IL-1 β	33	5-250	1100	308-10350
IL-1RA	825	167-3620	2230	425-16670
IL-18	2,5	0-45	66	42-150
IL-6	215	7-910	19700	4350-59650
TNF α	25	2-90	4150	1280-13280
IL-8	1820	350-8650	36980	9850-75930
IL-10	21	5-50	120	6-650
IL-2	2	0-27	40	8-210
IL-17	2,5	0-45	25	8-205

1 типа *E. coli* позволяет отнести его к секреторным ингибиторам бактериальной адгезии, защищающим мочевой тракт от восходящей инфекции. БТХ обнаружен в составе гиалинового и других матриксов, а также почечных камней. Значительное снижение уровня БТХ в моче при мочекаменной болезни используется как диагностический маркер. Установлена ингибиторная роль БТХ при образовании кристаллов из Са-оксалатов. БТХ при определенных условиях проявляет выраженные аутоантигенные свойства. Значительное повышение уровня аутоантител против БТХ в крови выявлено при инфекциях и других повреждениях почки. Отложения комплексов БТХ с аутоАТ против БТХ в ткани почки приводят к повреждающему действию. Установлено, что БТХ активирует миелоидные дендритные клетки и индуцирует их созревание. Эти данные позволяют предположить комбинированную защитную и иммунорегуляторную роль БТХ *in vivo*, что требует более глубоких исследований.

Моноклональные антитела (МКАТ) являются универсальным инструментом для проведения исследований биологической роли БТХ, разработки тест-систем для определения уровня БТХ в моче, решения других задач, связанных с клинической практикой. Целью данного исследования было получение МКАТ против БТХ.

Препарат БТХ получали из пуловой мочи от 8 здоровых доноров. Очистку проводили преципитацией 0,58M NaCl по методу Тамма–Хорсфолла. Чистоту препарата контролировали с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Подобран буфер для длительного хранения (в течение 6 месяцев) очищенного препарата БТХ при 4 °C. Для иммунизации использовали мышей-гибридов F1 линий Balb/c и SJL/J. В результате гибридизации было получено 8 стабильных клонов гибридом, синтезирующих МКАТ к БТХ. Изучение иммунохимических свойств полученных МКАТ проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Для тестирования способности МКАТ связываться с нативным АГ были приготовлены конъюгаты БТХ с пероксидазой хрена и биотином. Все полученные МКАТ взаимодействовали как с адсорбированным на твердой фазе, так и с нативным БТХ. 5 МКАТ взаимодействовали эффективнее с нативным антигеном, 2 МКАТ равноэффективно связывали нативный и адсорбированный АГ и 1 МКАТ предпочтительнее связывалось с адсорбированным на твердой фазе БТХ. После адсорбции на твердой фазе специфичность и способность связывать БТХ сохраняли все 8 антител. Наибольшей активностью в этом тесте обладали 2 из 8 исследуемых МКАТ, что позволяет на их основе конструировать тест-системы для выявления и определения концентрации этого белка.

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ КРОВИ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ НАПРЯЖЕННОСТИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА

Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г., Рукавишников М.Ю., Варакин Н.А.

ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Для исследования клеточного иммунитета в лабораториях используют кожные тесты, реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), а также иммуноферментный

анализ в тесте ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot assay), позволяющий полуколичественно определить число антиген-специфичных Т-клеток. Однако применение РБТЛ и кожных тестов ограничивается либо большим количеством неспецифических реакций, либо низкой сходимостью результатов, полученных разными группами исследователей, и длительностью анализа, а ELISPOT мало доступен из-за высокой стоимости анализа и сложности интерпретации результатов.

Цель настоящей работы: исследование возможности оценки напряженности клеточного иммунитета условно здоровых доноров по продукции цитокинов клетками цельной крови в ответ на стимуляцию HBsAg.

Материалы и методы. Обследовано 48 условно здоровых добровольцев в возрасте 20-60 лет, в том числе 30 невакцинированных HBsAg лиц с отсутствием серологических маркеров гепатита В – 1-я группа; 15 вакцинированных HBsAg людей с наличием антител к HBsAg и отсутствием антител к HBeAg белку – 2-я группа; 3 человека, переболевших гепатитом В, – 3-я группа. Для проведения исследований 1 мл отобранной утром, натощак, периферической крови вносили во флакон, содержащий 4 мл стерильной поддерживающей среды DMEM (Biolot) с гепарином (2,5 ЕД/мл), гентамицином (100 мкг/мл) и L-глутамином (0,6 мг/мл). Полученный раствор делили на порции: 2 мл использовали для определения спонтанной продукции цитокинов крови, 1 мл + фитогемагглютинин (ФГА, Sigma) до конечной концентрации 10 мкг/мл – для митоген-индуцированной продукции цитокинов, 1 мл + плазменный HBsAg до конечной концентрации 0,5-5,0 мкг/мл – для антигениндуцированной продукции цитокинов. Образцы инкубировали при 37 °C в течение суток, клетки крови осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость разливали по аликвотам и замораживали до проведения анализа. Концентрацию цитокинов, анти-HBsAg и анти-HBeAg определяли с помощью соответствующих наборов для иммуноферментного анализа производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Стимуляция клеток крови обследованных доноров очищенным плазменным HBsAg вызывала наработку IL-18, IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ , IL-1 β и IL-1RA, в то же время продукции IL-4, IL-2 и IFN α не было отмечено. Для количественной оценки напряженности клеточного иммунитета нами был применен индекс I^{шт} (отношение антиген-стимулированной к митоген-стимулированной продукции цитокина). Показано, что значения цитокинового индекса для вакцинированных и невакцинированных добровольцев достоверно отличаются для IFN γ , IL-6, IL-1 β , TNF α , IL-1RA. Наиболее достоверные отличия и наибольший размах средних значений I^{шт} между добровольцами выявлен для индекса интерферона-гамма (I_{IFN γ}). Не обнаружено прямой корреляции между уровнем антител к HBsAg и I_{IFN γ} (и абсолютными значениями IFN). Выявленная нами корреляция между значениями индекса I_{IFN γ} и индексами других цитокинов (I_{IL-6}, I_{TNF α} , I_{IL-1 β} , I_{IL-1RA}) позволяет предположить, что при контакте с HBsAg у лиц с высоким I_{IFN γ} будут активированы и продукция антител (IL-6 и IL-1 β), и эффекторных клеток (TNF α и IL-1 β).

Таким образом, в настоящей работе предложен метод количественной оценки напряженности специфического клеточного иммунитета на примере вируса гепатита В; впервые применен цитокиновый индекс I^{шт} – отношение

HBsAg-стимулированной к ФГА-стимулированной продукции цитокина, который позволил исключить митогенную составляющую в цитокиновом ответе на антиген и учесть особенности иммунной системы каждого индивидуума; показано, что для вакцинированных HBsAg добровольцев значения цитокинового индекса для IFN γ , IL-6, IL-1 β , TNF α и IL-1RA достоверно отличаются от невакцинированных. Максимальные различия и достоверность между группами определяются для I_{IFN γ} . Предложенная методика позволяет достаточно быстро и эффективно оценить напряженность клеточного иммунитета и, вероятно, может быть использована в широких популяционных исследованиях.

ПРОДУКЦИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ (IG) КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ В-КЛЕТОЧНЫМИ ЛИНИЯМИ ЧЕЛОВЕКА

Самойлович М.П., Губарева Е.А., Вартанян Н.Л., Пиневиц А.А., Мамай И.Н., Климович В.В.

ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, Россия

Культивируемые В-клеточные линии служат модельными объектами в исследованиях проблем иммунологии, генетики и вирусологии. Клетки этих линий различаются стадией дифференцировки, спектром поверхностных маркеров и секретируемых молекул. Сведения о продукции ими молекул Ig были получены в разные годы с использованием методов недостаточной специфичности и чувствительности и потому требуют уточнения или пересмотра. Задача работы состояла в исследовании синтеза Ig клетками линий RPMI-1788, Namalva, NC37, CCRF-SB и IM-9.

Линии были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 2-10% сыворотки эмбрионов коров.

Концентрации свободных каппа- и лямбда-цепей, а также целостных молекул IgM и IgG определяли в нативной культуральной жидкости и в лизатах клеток с помощью методов двухцентрового твердофазного ИФА на основе созданных в лаборатории моноклональных антител. Тест, разработанный для обнаружения J-цепи, включал предварительное восстановление исследуемого материала β -меркаптоэтанолом и алкилирование иодацетамидом. Чувствительность его составляла 500 пг антигена в мл, что позволило впервые определить соотношение J-цепи и молекул IgM в клеточных лизатах и культуральных жидкостях. Количество IgM и J-цепи выражали в весовых единицах и пересчитывали на 1000 культивируемых клеток. Поскольку молекулярные массы IgM и J-цепи составляют 970 КДа и 15 КДа соответственно, массовая доля J-цепи в пентамерах IgM близка к 2%. Оценивая соотношение концентраций J-цепи и IgM в образце, можно судить о наличии в нем пентамерных и гексамерных молекул IgM.

Впервые продукция Ig была обнаружена в клетках NC37 (IgM-каппа) и CCRF-SB (IgG1). Секретция свободных каппа- или лямбда-цепей не была выявлена ни в одной из исследованных культур. Наиболее сильным продуцен-

том IgM была линия RPMI-1788. Однако количественное соотношение J-цепи и IgM составляло 0,02%, что указывает на преимущественную продукцию молекул, не содержащих J-цепь, т.е. гексамеров. В то же время клетки линий NC37 и Namalva синтезировали на порядок меньше IgM, но соотношение концентраций J-цепи и IgM было близко к показателю, характерному для пентамерных молекул. Оценку однородности популяции клеток по содержанию цитоплазматического IgM проводили методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител, меченных флуоресцеином. Значительная гомогенность популяций была отмечена для клеток Namalva и NC37, тогда как клетки линии RPMI-1788 отличались высокой степенью гетерогенности.

Полученные результаты дополняют ранее опубликованные сведения количественными данными, характеризующими продукцию Ig В-клеточными линиями, что позволяет шире использовать эти объекты в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00513.

ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА TNF α НА УРОВЕНЬ ЕГО ПРОДУКЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ ЮГО-ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Сенникова Н.С., Пискунов А.А., Силков А.Н., Козлов В.А., Сенников С.В.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Фактор некроза опухолей альфа (TNF α) – полифункциональный цитокин, играющий важную роль в системных воспалительных процессах и относящийся к группе цитокинов, стимулирующих острофазовую реакцию. Ген TNF α содержит ряд одиночных нуклеотидных замен, которые могут влиять на продукцию TNF α . Целью нашего исследования было изучить влияние полиморфизма гена TNF α в позициях -1031T $\rightarrow$ C, -857C $\rightarrow$ T и -308G $\rightarrow$ A на уровень его продукции мононуклеарными клетками периферической крови здоровых доноров г. Новосибирска (Юго-Западная Сибирь). Детекцию полиморфных вариантов гена TNF α проводили используя ПДРФ анализ и аллельспецифическую ПЦР. Продукция TNF α определялась с помощью метода иммуноанализа на приборе ORIGIN ANALYZER (Igen Inc., USA). Для статистического анализа полученных данных использован непараметрический критерий Крускала–Уоллиса с использованием программы «Statistica 5.0». При анализе индексов стимуляции продукции TNF α мононуклеарными клетками митогеном КонА установлено, что доноры несущих разные аллельные варианты в точке -1031 статистически достоверно различаются по уровню стимуляции продукции цитокина. В частности гомозиготы -1031T/T демонстрируют наиболее высокие индексы стимуляции продукции TNF α в ответ на КонА по сравнению с гомозиготами -1031C/C и гетерозиготами -1031C/T. По другим SNP различий не было выявлено. Таким образом, аллельные варианты гена TNF α в позиции -1031 влияют на выраженность продукции TNF α мононуклеарными клетками периферической крови здоровых доноров в ответ на стимуляцию Кон А.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МАЛЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОЦВЕТНОГО ЦИТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Хайдуков С.В., Зурочка А.В.¹, Черешнев В.А.²

Учреждение Российской академии наук «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва, Россия

¹ ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия РОСЗДРАВА, г. Челябинск, Россия

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

В настоящее время определение субпопуляционного состава и фенотипа лимфоцитов является важным диагностическим признаком для выяснения нарушений связанных с функционированием иммунной системы. Однако информация, извлекаемая в результате определения только основных популяций лимфоцитов периферической крови, является недостаточной. Для целей диагностики более важным представляется информация о наличии малых субпопуляций лимфоцитов и активированных пулов клеток.

Результатом данной работы стала разработка алгоритмов цитометрических исследований и формирование комбинаций моноклональных антител, позволяющие оценить как все основные популяции лимфоцитов, так и их минорные субпопуляции, участвующие в развитии иммунного ответа. Были проанализированы В-клетки (B1, B2 и В-клетки памяти), Т-клетки (хелперы, цитотоксические, наивные, регуляторные, $\gamma\delta$ -Т-клетки, $\alpha\beta$ -Т-клетки и Т-NK-клетки) и NK-клетки (цитолитические и цитокин-продуцирующие).

Проведенные исследования субпопуляционного состава клеток периферической крови условно здоровых доноров в различных регионах России позволили определить интервалы распределения содержания как основных, так и малых субпопуляций клеток иммунной системы человека. Сравнение полученных результатов с литературными данными, опубликованными в зарубежной литературе, свидетельствуют о близости референтных интервалов распределения основных субпопуляций клеток иммунной системы условно здоровых доноров вне зависимости от места проживания.

Поскольку данное исследование проводили с использованием периферической крови условно здоровых доноров, результаты ее могут лечь в основу нормативных показателей субпопуляционного состава клеток иммунной системы.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЛИМФОЦИТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОПТАТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Харламова А.Н., Петракова О.В., Гурманчук И.Е.

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

В функционировании иммунной системы кожи большое значение имеют популяции резидентных клеток, которые обеспечивают организацию и реализацию местного иммунного ответа, а так же вовлечены в формирование

ряда патологических состояний. Одной из групп таких клеток, является популяция резидентных лимфоцитов, несущих на своей поверхности в основном $\gamma\delta$ -Т-клеточный рецептор. Изучение фенотипических и функциональных особенностей лимфоцитов кожи позволит более детально узнать о роли данной популяции лимфоцитов в механизмах функционирования лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей в норме и при различных патологических состояниях.

Целью данной работы явилось получение лимфоцитов из биоптатов кожи человека, а также отработка методов изучения их функциональных и фенотипических особенностей.

Материалом для исследования послужили полученные с помощью дерматомы участки аутодермотрансплантата весом около 1 г и толщиной приблизительно 1 мм. Метод комбинирования ферментативной диссоциации (коллагеназа, гиалуронидаза, ДНКаза I) и хелатирующих агентов. На заключительном этапе полученную суспензию клеток центрифугировали на градиенте Ficoll-Paque, клетки отмывали, оценивали их количество, состав и жизнеспособность. Из суспензии готовили мазки и проводили их окраску по Романовскому–Гимзе. Функциональные характеристики клеток оценивали по пролиферативной активности в МТТ тесте и по способности клеток к синтезу цитокинов иммуноферментным методом, ELISPOT, а для оценки накопления мРНК цитокинов применяли ПЦР реального времени с обратной транскрипцией. В качестве стимулятора пролиферативной активности в МТТ тесте использовали фитогемагглютинин (ФГА). Оценку фенотипических характеристик лимфоцитов, выделенных из биоптатов кожи человека, проводили методом проточной цитофлуорометрии. Использовали моноклональные антитела к CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45⁺, меченные флюорохромами.

Жизнеспособность клеток после выделения во всех случаях составила около 99%. Морфологически полученные клетки были весьма неоднородны. Поскольку достоверно определить принадлежность выделенных клеток к популяции лимфоцитов морфологически оказалось невозможным, нами было проведено исследование экспрессии на выделенных клетках основных поверхностных маркеров лимфоцитов. Анализ показал, что среди выделенных из биоптатов кожи клеток только около 5% были лимфоцитами (CD45⁺), из них 90% приходилось на долю CD3⁺ лимфоцитов. Среди последних клетки с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD8⁻ составили около 1%, а с фенотипом CD3⁺CD4⁻CD8⁺ – 38%. Оставшиеся клетки приходились на долю дважды негативных лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) и составляли около 61%.

Для оценки пролиферативной активности лимфоцитов кожи нами были определены условия культивирования клеток в МТТ-тесте: концентрация митогенов и сроки культивирования. Показано, что для исследования функциональной активности клеток в концентрации 10⁴ кл/мл оптимальное количество дней культивирования составляет – 7-10, в концентрации 10⁵ кл/мл – 5. Отработан метод оценки пролиферативной активности лимфоцитов с МТТ. Показано, что наименьшее количество клеток, которое можно использовать для оценки их пролиферации в МТТ-тесте составляет 10⁴ клеток/мл.

В связи с ограниченным количеством лимфоцитов, получаемых из кожи (10^5 клеток/1 грамм) исследование синтеза цитокинов лимфоцитами с использованием иммуноферментного анализа затруднено. Для оценки синтеза цитокинов следует использовать метод Elispot, а для оценки экспрессии цитокинов клетками — метод ПЦР с обратной транскрипцией.

Таким образом, несмотря на ограниченное количество выделяемых клеток (10^5 клеток на 1 г биоптата

кожи), в ходе исследования были определены методические возможности для исследования их функциональных и фенотипических характеристик. Дальнейшее изучение функциональных и других параметров популяции резидентных лимфоцитов кожи позволит раскрыть новые механизмы функционирования лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей в норме и при различных патологических состояниях.