

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОБРАЗОВАНИЯ КАПИЛЛЯРОПОДОБНЫХ СТРУКТУР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ EA.HY926

Амчиславский Е.И., Соколов Д.И.¹,
Сельков С.А.¹, Фрейдлин И.С.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН,
Санкт-Петербург, Россия;

¹ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта,
Санкт-Петербург, Россия

Ангиогенез или процесс образования микрососудов *de novo* в постнатальном периоде чрезвычайно актуален для многих патологических состояний, таких как опухолевый процесс, псориаз, заболевания, связанные с наличием хронического воспалительного процесса (например, ревматоидный артрит). Кроме того, данное явление имеет место и при ряде физиологических состояний, характеризующихся циклическим обновлением ткани, например овуляторный цикл, рост волосающего фолликула, а также при формировании грануляционной ткани при раневом процессе. Образование нового микрососудистого русла – это сложный, стадийный процесс, состоящий из нескольких сменяющих друг друга этапов. Эти этапы включают в себя: активацию эндотелия различными цитокинами и ростовыми факторами; дезорганизацию базальной мембраны с помощью матрикс металлпротеиназ, выделяемых активированным эндотелием и сопутствующими клетками (макрофагами, фибробластами, опухолевыми клетками); формированием просвета для миграции эндотелиальных клеток (ЭК), из как предсуществующих капилляров, так и рекрутируемых из костного мозга ангиобластов; миграцию ЭК в направлении градиента ростовых факторов; пролиферацию; и дифференцировку ЭК, которая заключается в формировании межклеточных контактов, просвета вновь образующегося капилляра и синтеза новой базальной мембраны. Для исследований в области ангиогенеза на сегодняшний день существуют различные подходы. В зависимости от целей и задач эксперимента можно использовать *in vivo* системы, моделирующие весь ангиогенный каскад, так и *in vitro* системы с использованием культур ЭК, в которых можно воспроизводить отдельные этапы процесса ангиогенеза. В частности, существуют модели, основанные на уникальной способности ЭК формировать капилляроподобные структуры на различных видах внеклеточного матрикса, таких как коллаген I типа, ламинин, витронектин, фибронектин и т.д. Одним из наиболее востребованных методов является метод с использованием препарата Матригель, продукта опухолевой линии клеток Engelberth-Holm-Swarm, который представляет собой композит из различных видов белков внеклеточного матрикса, таких как ламинин, коллаген IV типа, энтактин и гепарансульфат протеогликан, а также содержит (в зависимости от степени очистки) некоторые проангиогенные

ростовые факторы (bFGF, EGF, IGF-1, PDGF, NGF, TGF β). Однако данный метод имеет определенное ограничение для широкого применения, связанное с высокой стоимостью реактива. С целью минимизации затрат нами предпринималась попытка разводить Матригель культуральной средой, но при этом снижалась плотность образующегося геля и клетки неравномерно распределялись в его толще, что приводило к невозможности количественной оценки результатов. Нами предлагается модификация данного метода, которая позволяет снизить расход Матригеля в 4 раза и делает удобной возможность количественного учета результатов. Сущность модификации заключается в использовании коллагеновой подложки (400 мкл разведенного раствора коллагена I типа, полученного из сухожилийных тяжей хвостов лабораторных крыс), на которую наносят 100 мкл неразведенного Матригеля. ЭК человека линии EA.HY926 вносили после формирования геля и через 24 часа, проводили количественный учет результатов. За вышеуказанное время клетки на границе раздела двух видов матрикса формировали сеть из капилляроподобных структур. Документацию результатов проводили с помощью фотографирования цифровым фотоаппаратом Nikon Coolpix 4500 (Nikon, Япония) с окулярным адаптером к инвертированному микроскопу Биолам-П1 (ЛОМО, Санкт-Петербург) и последующим анализом полученных фотографий с использованием программы "Морфология" (Видеотест, Санкт-Петербург). При анализе полученных изображений мы учитывали общую длину капиллярной сети, которую выражали в пикселах. В среднем, при увеличении Ч120 она составляла 11715,19 пикселов. При этом клеточный тяж между двумя клеточными агрегатами расценивался как капилляроподобная структура. Данный метод может быть использован в дальнейшем как самостоятельно, так и наряду с другими методами для оценки проангиогенного и антиангиогенного действия различных биологически активных веществ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 03-04-48118.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРТИЗОЛА ПРИ РАКЕ ЛЕГКИХ

Баишева С.А., Баймахашева А.Н., Хан О.Г.

Казахский НИИ онкологии и радиологии Минздрава РК, Алматы, Казахстан

Минимальные концентрации, обнаруживаемые в крови человека (до 190 нмоль/л) позволяют определять кортизол в прямом иммунохимическом преципитационном методе путем фотометрии, однако, при осаждении преципитата в присутствии ПЭГ-6000 осаждаются не только комплексы типа антиген/антитело, но и другие крупные молекулы и молекулярные комплексы, что создает высокий фотометрический неспецифический фон, что делает невозможным выделение из него микроколичеств специфического преципитата, содержащего кортизол. Однако

реакцию между сывороточным кортизолом и специфическими антителами, осаждение комплексов типа кортизол-антитело проводят в присутствии 0,033% раствора сернистой кадмия ($CdSO_4$) в течение 2 часов и образованную эмульсию преципитата спектрофотометрируют при длине волны 640 нм. Катионы кадмия (Cd^{++}) в растворах обладают повышенным сродством к сероводородным анионам (SH^-). Антитела типа IgG, из которых в основном сконструированы коммерческие диагностические антисыворотки, содержат в себе связывающие сероводородные мостики. При специфическом присоединении антитела к антигену, антитела деформируются, при этом сероводородные мостики разрываются и становятся доступными для химического реагирования. В присутствии свободных катионов кадмия последний связывает сероводородные окончания, и в результате перекрестного связывания нескольких отдельных иммунных комплексов образуют единый макромолекулярный комплекс, выпадающий из раствора в осадок. Поскольку разрыв и высвобождение сероводородных мостиков является уникальным событием, характерным только для белковых молекул антител при соединении их с антигеном, то образующийся в присутствии кадмия преципитат является высокоспецифичным и состоящим только из иммунных комплексов. Для выделения фотометрического показателя, характеризующего преципитат кортизол/антитело необходимо из фотометрического показателя ПО вычесть фотометрические показатели ПК1 и ПК2. Полученная разность будет количественной фотометрической характеристикой содержания кортизола в исследуемой сыворотке. Адекватность способа проверена на 120 больных немелкоклеточным раком легких при комплексном лечении при определении кортизола новым и РИА методами на одних и тех же образцах крови. Лабораторная идентификация уровня кортизола показала, что у больных раком легких достоверно повышено содержание в крови кортизола.

Полученные **результаты**, определенные двумя методами, практически совпадают, что подтверждает адекватность предложенного метода. Определение кортизола описанным методом исключает многоэтапность, сложность, необходимость в специальной дорогостоящей измерительной аппаратуре (гамма-счетчик), а также риск работы с радиоактивными материалами.

ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС – ВОЗМОЖНОСТЬ И НЕОБХОДИМОСТЬ СУЩЕСТВОВАНИЯ ПОНЯТИЯ

Бляхер М.С., Федорова И.М., Капустин И.В., Карпова Н.В.

ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, Москва, Россия

Системе цитокинов придается большое значение в течение ряда физиологических и патологических процессов, связанных с функционированием иммунной системы. Имеются обширные сведения об уровне того или иного цитокина в сыворотке крови или его продукции клетками при многих заболеваниях – обычно при тяжелых состояниях, сопровождающихся существенными изменениями (инфекции, септические состояния и др.).

Гораздо труднее исследовать цитокиновые сети при физиологическом функционировании иммунной системы, при изучении механизмов физиологической регуляции иммунного гомеостаза. Представляется, что основная сложность таких исследований связана с мимолетностью

появления цитокинов в крови, их близкодистантным действием на клетки-мишени и отсутствием нормативных показателей их наличия в биологических жидкостях или их продукции клетками.

Нам казалось целесообразным попытаться исследовать эти показатели по возможно большему спектру цитокинов у здоровых людей, исследуя у них одновременно максимальное количество показателей состояния иммунной системы и интерфероногенеза. Такие исследования были проведены с использованием прибора Bio-Plex (фирма Bio-Rad), позволяющего в малом объеме биологической жидкости определять более 20 цитокинов одновременно. Обследовано 35 здоровых детей, у которых проведено сопоставление содержания цитокинов в сыворотке крови, спонтанной и стимулированной их продукции с другими показателями состояния иммунной системы (численность субпопуляций лимфоцитов, фагоцитарная активность нейтрофилов, интерфероногенез, содержание классов и субклассов иммуноглобулинов в сыворотке крови и др.), что позволило сформулировать предварительные выводы о цитокиновом статусе здоровых людей.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ЛОШАДИНОМУ ИММУНОГЛОБУЛИНУ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ РЕАГЕНТ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ В ИФА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ, АНАТОКСИНОВ И СООТВЕТСТВУЮЩИХ АНТИТОКСИНОВ

Буркин М.А., Гальвидис И.А., Романов М.Г., Свиридов В.В.

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва

Иммунотерапия при таких заболеваниях как дифтерия, столбняк, ботулизм, газовая гангрена, бешенство, сибирская язва, стафилококковой инфекция, клещевой энцефалит, а также при укусах различных видов змей и паукообразных основывается на использовании специфических лошадиных антисывороток. Такие препараты применяются также для контроля и оценки качества вакцинного материала, с диагностической целью или в качестве эталонного калибранта.

Однако использование лошадиных антител в ИФА предполагает их детекцию с помощью антивидового ферментного конъюгата. Коммерческие пероксидазные конъюгаты, а также синтезированные нами препараты на основе поликлональных антител кролика, осла и мыши к гамма-глобулину лошади (ГГЛ) оказались мало пригодны из-за помех, вызванных перекрестным взаимодействием с иммуноглобулинами других видов, в особенности мыши и человека.

Разрешить данную проблему удалось в результате получения моноклональных антител (МкАт) к ГГЛ, их аффинной очистки и приготовления конъюгата с пероксидазой хрена (АЛ-ПХ). Высокая активность и отсутствие взаимодействия с гамма-глобулинами мыши, кролика, морской свинки, человека, коровы, барана и сывороточным альбумином лошади определили пригодность полученного реагента для ИФА дифтерийного (ДТ/ДАТ), столбнячного (СТ/САТ), ботулинических (БАТ) токсинов/анатоксинов и протективному антигену (ПА) *B. anthracis* при использовании соответствующих антитоксинов. Полученные нами ранее МкАт к упомянутым антигенам определили спектр разработанных методов количественного определения этих токсинов в сэндвич-варианте ИФА. При спе-

цифической адсорбции антигенов на твердофазных МкАт их выявление с помощью лошадиных антисывороток и универсального АЛ-ПХ можно было осуществлять с чувствительностью: ДТ – 0,001 ЛФ/мл, ДАТ – 0,0003 ЛФ/мл, СТ – 20 LD₅₀/мл, САТ – 0,005 ЕС/мл, БАТ-А – 0,01 ЕС/мл, БАТ-В – 0,001 ЕС/мл, БАТ-Е – 0,0003 ЕС/мл и ПА – 1 нг/мл. Кроме того, описанный АЛ-ПХ позволяет проводить сравнение антитоксинов различного производства и контролировать его содержание в сыворотке больных, подвергнутых пассивной иммунотерапии.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Васюнина Н.Ю., Ростовская М.С., Коржикова С.В., Чупикова Н.И., Шарифуллина С.З., Тепляшин З.А., Хайдуков С.В., Тепляшин А.С., Савченкова И.П.

ООО «Институт Стволовой Клетки», Москва, Россия

Введение: пуповинная кровь является перспективным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Однако в одном образце собранной пуповинной крови количество ГСК не велико, что ограничивает их клиническое применение. В настоящий момент актуальны работы по подбору условий эффективной экспансии ГСК *in vitro*. Целью данной работы было сравнение уровня экспрессии поверхностных антигенов гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови в зависимости от различных условий их культивирования.

Материалы и методы. Для получения ядродержащих клеток пуповинную кровь центрифугировали в градиенте плотности Ficoll-Paque (1,077g/ml, Amersham). Мононуклеарные клетки пропускали через колонку с магнитными шариками с иммобилизованными антителами к CD34. Фракцию, обогащенную CD34⁺ клетками, культивировали в течение 10 суток. Культуральной средой была IMDM, дополненная FBS, 2-mercaptoethanol. Сравнивали два способа культивирования: 1) На фидерном слое представленном клетками с фенотипом, подобным ММСК, выделенных из костного мозга или фибробластами плаценты; 2) На пластике с добавлением или без добавления SCF и IL-3. По окончании культивирования анализировали экспрессию поверхностных антигенов CD34, CD38, CD11c на проточном цитофлуориметре (Epics Elite Coulter).

Результаты. Иммунофлуоресцентный анализ CD34⁺ обогащенной фракции клеток показал наличие CD34 – 89,8%, CD38 – 0,2% клеток. После культивирования происходит разделение клеточной популяции CD34⁺ на высоко и низко экспрессирующие CD34 клетки. Клетки, культивировавшиеся на фидерных слоях, образованных мультипотентными стромальными клетками длительной культуры костного мозга и фибробластами плаценты, экспрессировали CD34 – 72,5 и 65,4% соответственно, из которых CD34^{high} было 48,6 и 45,8% соответственно, а CD38 – 5,9% и 8,3% соответственно. Экспрессия поверхностных антигенов для клеток, культивировавшихся с добавлением факторов и без, составила CD34 37 и 43,2% соответственно, из которых CD34^{high} было 10,3 и 22,9% соответственно, а CD38 – 25,4 и 19%. Кроме того, в клеточных популяциях, культивируемых на пластике, появились субпопуляции клеток с высоким уровнем экспрессии

CD11c (17,8 и 21,5% для среды с факторами и без факторов), что соответствует более дифференцированному состоянию клеток миелоидного ряда.

Заключение. Наши результаты показали, что наличие фидерного слоя при культивировании ГСК пуповинной крови позволяет поддерживать клетки положительные по CD34, в том числе CD34^{high}. При этом наблюдали незначительное количество CD38⁺ и отсутствие CD11c^{high}.

НОВЫЕ ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgM И IgG АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КОРИ

Ведунова С.Л., Эбралидзе Л.К., Лавров В.Ф.

ГУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва

Для совершенствования системы эпидемиологического надзора за корью и в соответствии с резолюцией ВОЗ о глобальной ликвидации кори актуальной является разработка и выпуск иммуноферментных тест-систем (ИФТС) для ранней диагностики кори (IgM) и оценки напряженности специфического иммунитета к вирусу кори (IgG). В условиях низкой заболеваемости корью существенно возрастает значимость расшифровки каждого случая у всех подозрительных на эту инфекцию лиц.

Целью работы было конструирование отечественных препаратов для ранней лабораторной диагностики кори - выявления противокоревых IgM антител, а также создание ИФТС, предназначенной для определения в крови вакцинированных против кори и переболевших корью лиц IgG антител - маркеров напряженности противокорьевого иммунитета.

Материалы и методы. Использовали вирус кори, штамм Ленинград-16 (Л-16), полученный в 1960 г. в ЛНИИ ЭМ им. Пастера. В исследования были включены: 69 сывороток, полученных от больных корью на различных этапах заболевания; 8 сывороток от больных с экзантемными заболеваниями неинфекционного генеза; 12 сывороток от детей, серонегативных по отношению к вирусу кори, в возрасте от 6 до 12 месяцев; 290 сывороток от практически здоровых лиц в возрасте от 6 до 32 лет, вакцинированных против кори либо переболевших корью ранее; 36 сывороток беременных женщин, полученных в первом триместре беременности; 31 сыворотка от больных ревматоидными и аутоиммунными заболеваниями. Параллельно сыворотки тестировали на тест-системах для выявления антикоревых IgM антител фирмы Human (ФРГ) в непрямом методе ИФА и ВСМ (США) в «ловушечном» методе ИФА.

Основные результаты. Получен, накоплен, сконцентрирован и очищен вирус кори, а также выбраны оптимальные образцы вирусных антигенов для их последующего использования в качестве твердофазного иммуносорбента. Из сывороток больных корью с помощью ИФА были отобраны восемь сывороток, содержащие IgM антитела и десять сывороток, содержащие только IgG антитела к вирусу кори. Данная панель сывороток использовалась в качестве референс-препарата. В результате испытаний полистироловых планшетов с различной сорбционной емкостью отечественного и зарубежного производства (Greiner – mittel и hoch, NUNC - medisorp, polysorp, multisorp, ВНИИ Медполимер) отобран оптимальный образец, наиболее полно отвечающий соответствующим задачам - планшеты производства ВНИИ Медполимер или фирмы Greiner (mittel). В ИФТС использовали пероксидазные

конъюгаты, предназначенные для выявления противокоревых IgM и IgG антител человека. На каждом этапе работы оптимальные условия определяли с помощью «шахматных» титрований всех компонентов, применяемых в ИФА. С использованием контрольных, заведомо положительных (высоко- и низкоактивных) сывороток, а также отрицательных сывороток была отработана система учета и интерпретации результатов. Обе ИФТС прошли авторские испытания на различных контингентах обследуемых: больных корью, а также контрольной группы лиц (более 300 сывороток). При сравнении с зарубежными аналогами - ИФТС HUMAN и BCM (США) обе новые тест-системы показали высокую чувствительность, специфичность и воспроизводимость.

Заключение. Сконструированы две новые ИФТС: первая - тест-система для ранней диагностики кори, выявления противокоревых IgM антител, вторая - для выявления IgG антител к вирусу кори, при проведении сероэпидемиологических исследований, для определения напряженности иммунитета по отношению к вирусу кори, эффективности вакцинации, отборе серонегативных лиц (при ревакцинации) и для диагностики кори (при наличии парных сывороток). Препараты планируется выпускать в виде наборов, включающих все необходимые компоненты для постановки реакции. Таким образом, в результате лабораторных испытаний показано, что новые диагностические препараты являются весьма эффективными тест-системами для лабораторной диагностики кори. Помимо высокой чувствительности и специфичности при их применении, при производстве они, исходя из предварительных расчетов, будут в 10 раз дешевле соответствующих зарубежных аналогов.

ИЗОСЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РИСКА ПОСТТРАНСФУЗИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЭРИТРОЦИТАРНЫМИ АНТИГЕНАМИ

Володина Е.Е., Терских В.А.

ГСПК «Сангвис», Екатеринбург, Россия

В современной клинической практике переливание донорской крови остается распространенной процедурой. Несмотря на развитие альтернативных источников крови и кровезаменителей, в настоящее время отсутствуют данные о возможности отказа от гемотрансфузий. В частности, в Екатеринбурге ежегодно выполняется около 30 000 трансфузий препаратов крови. В связи с этим сохраняет актуальность проблема предупреждения осложнений переливания крови, прежде всего – иммунной природы.

Цель работы – провести анализ иммунных осложнений при гемотрансфузиях в г.Екатеринбурге с учетом частоты встречаемости эритроцитарных антигенов системы Резус и аллоантител различной специфичности.

Материалы и методы. Проанализированы результаты типирования крови 58 000 доноров и 441 беременной женщины за период 2001-2004 г. Для определения специфичности антигенов и аллоантител использовали стандартные изосерологические методики для определения антигенов системы Резус и выявления антиэритроцитарных аутоантител, а также гелевые технологии (Diamed, Scangel).

Результаты. Анализ посттрансфузионных осложнений в г.Екатеринбурге свидетельствует, что частота иммунных осложнений крайне низка, а на долю аллоиммунных и гемолитических приходится всего 0,2%. Однако несмотря на низкую встречаемость, они имеют высокую клиническую

значимость, связанную с угрозой для жизни реципиента. Поэтому одним из направлений обеспечения трансфузионной безопасности мы считаем лабораторный изосерологический мониторинг, позволяющий оценивать в динамике изменение антигенного профиля доноров и уровень сенсибилизации реципиентов, а также беременных женщин.

Среди доноров г.Екатеринбурга преобладает фенотип CcDee (37,7%), что характерно для жителей России. Несколько чаще в сравнении с данными других российских авторов обнаруживается сочетание ccDee, и достаточно редко встречаются CCDEe, CcDEE, Ccddee, CCddee, cddDe, CddDe (всего 1,5% от всех обследованных). Уровень D-отрицательных доноров составляет 14% (12,3-17,3% по данным отечественных авторов).

Беременные женщины с выявленными антиэритроцитарными аллоантителами представляют собой особо «угрожаемую» группу риска, поэтому во время беременности нами проводится определение как специфичности, так и титра аутоантител. Наиболее часто выявлялись антитела следующих специфичностей: анти-D (30%), анти-DC (13,9%), анти- DE (9,8%), анти- DCE (7,1%) и реже - другие. Однако именно они представляют особую опасность с точки зрения безопасности гемотрансфузий.

Гемотрансфузионные осложнения могут быть связаны не только с несовместимостью по системе Резус, поэтому нами проанализированы и другие эритроцитарные системы. Объективную характеристику трансфузионного риска дает индекс аллоиммунизации (ИА) эритроцитарными антигенами. Он заметно повысился у доноров и беременных женщин г.Екатеринбурга с 0,17 в 2000 году до 0,60 в 2002 году. Это было связано в значительной степени с более тщательным выявлением аутоантител благодаря внедрению гелевой технологии типирования. Сегодня ИА остается на относительно постоянном уровне (0,5-0,6 %).

В целом можно заключить, что изосерологическая оценка донорской популяции и уровня аллосенсибилизации являются важным фактором в решении некоторых вопросов оптимизации работы службы крови, формирования донорской политики и повышения безопасности гемотрансфузий.

ЗНАЧЕНИЕ ДИАГНОСТИКИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ХЛАМИДИОЗА И МИКОПЛАЗМОЗОВ РАЗЛИЧНЫМИ ЛАБОРАТОРНЫМИ МЕТОДАМИ

Глухова Е.И., Овинова Е.В., Мисевич И.А., Добровольский В.Е.

МУЗ Центральная городская больница №4, Нижний Тагил, Россия;

Городской кожно-венерологический диспансер, Нижний Тагил, Россия

В настоящее время вырос интерес к изучению инфекций, передаваемых половым путем, особенно хламидий и микоплазм, в этиологии воспалительных заболеваний мочеполовой системы. Урогенитальный хламидиоз, микоплазмоз (уреаплазмоз) являются достаточно распространенными среди заболеваний, передаваемых половым путем. Трудность диагностики этих инфекций, их распространенность и неадекватность проводимой терапии привели к преобладанию данных заболеваний. Инфекции, передаваемые половым путем, поражают человека в период его наибольшей половой активности и часто сопровождаются осложнениями, приводящими к инвалидности при болезни Рейтера, бесплодию или внутриутробному

инфицированию, обуславливая врожденную патологию плода и новорожденного. Зачастую данные инфекции не распознаются, т.к. имеют бессимптомное или вялотекущее течение, позднее диагностируются осложнения, такие как сальпингиты, бесплодие или артриты, возникающие в результате восхождения или персистенции возбудителей.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка эффективности использования различных лабораторных методов диагностики урогенитального хламидиоза и микоплазмозов и эффективности проводимой терапии.

Материалы и методы. В 2005 году были обследованы на инфекции, передаваемые половым путем, 3865 пациентов. Пробы сыворотки крови и мазки анализировали до и после лечения с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для постановки ИФА применяли тест-системы производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), определяющие в сыворотках крови иммуноглобулины классов G, A и M. ПЦР проводили с помощью диагностических наборов «АмплиСенс» производства ЦНИИ эпидемиологии (Москва).

Результаты. В процессе исследования установили наличие хламидиоза методом ПЦР у 545 пациентов (16,8%), уреаплазмоза – у 1664 пациентов (48,8%), микоплазмоза – у 754 пациентов (26,2%). Методом ИФА обнаружили антитела к антигенам хламидий (*C.trachomatis*) у 145 пациентов (27,3%), к антигенам уреаплазмы (*U.urealyticum*) – у 97 пациентов (22,1%), к антигенам микоплазмы (*M.hominis*) - у 172 пациентов (40,5%). Особый интерес представляет группа пациентов с выявленным методом ПЦР антигеном (ДНК) и отсутствием антител к данному антигену: по хламидиозу отмечено таких 13 пациентов, по уреаплазмозу – 40 пациентов, по микоплазмозу – 11 пациентов. При обследовании после лечения у пациентов данной группы вновь методом полимеразной цепной реакции обнаруживались инфекции, передаваемые половым путем.

Заключение. Полученные результаты показывают, что для эффективности диагностики урогенитальных инфекций, контроля за их лечением и оценки результатов проведенной терапии необходимо применять комплекс современных лабораторных исследований, включающий определение специфических иммуноглобулинов разных классов методом ИФА и выявление ДНК возбудителя с помощью ПЦР.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ WESTERN-BLOT В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТОКСОПЛАЗМОЗА

Долгих Т.И., Носкова Ф.В., Запарий Н.С.

Центральная научно-исследовательская лаборатория Омской государственной медицинской академии, г. Омск, Россия

Проблемы токсоплазмоза нельзя считать до конца решенными, несмотря на многочисленные исследования в этой области. Поскольку диагноз может быть выставлен только на основании лабораторного подтверждения, то продолжается поиск оптимальных методов лабораторной диагностики. Наибольшую сложность представляет диагностика врожденного токсоплазмоза. За последние 2 года в г. Омске установлены 3 случая врожденного токсоплазмоза у детей первого года жизни, из которых один случай

закончился летально в возрасте ребенка 5 мес. жизни. При этом, несмотря на наличие признаков, свидетельствующих о наличии внутриутробной инфекции, при первичном обследовании у всех трех детей были получены отрицательные результаты исследования сыворотки крови на наличие токсо-IgM и положительные на присутствие специфических IgG в низком титре. Наряду с этим продолжается рост приобретенного токсоплазмоза у детей с поражением различных органов и систем у детей и взрослых с неоднозначным отношением врачей к результатам исследования при выявлении только IgG. Все это в целом диктует необходимость формирования новых подходов к диагностике врожденного и приобретенного токсоплазмоза, требующего установления фазы инфекционного процесса и проведения адекватной терапии.

Цель работы: определить диагностическое и прогностическое значение метода WESTERN-BLOT на основе комплексной клинико-лабораторной характеристики пациентов с токсоплазмозом.

Задачи исследования: 1. Оценить иммунореактивность к *T. gondii* на различных этапах инфекционного процесса у пациентов с токсоплазмозом. 2. Определить оценочные критерии развития инфекционного процесса у больных с данной патологией. 3. Установить клинико-лабораторные параллели при врожденной и приобретенной формах токсоплазмоза.

Методы и материалы. Методом ИФА обследовано 66 пациента, из которых 19 человек оказались серопозитивными по отношению к *T. gondii*. Из них методом иммуноблотинга были обследованы 12 пациентов в возрасте от 0 до 25 лет, у которых при проведении диагностических исследований методом иммуноферментного анализа (ИФА) были выявлены антитела классов IgA и IgG или только IgG к *Toxoplasma gondii* (тест-системы фирмы «EUROIMMUN», Германия). Все сыворотки были дополнительно исследованы с определением avidности IgG (наборы «Avidity» производства той же фирмы). Для подтверждения диагноза и установления фазы заболевания использованы наборы «RecomLine Toxoplasma», позволяющие выявить антитела к следующим белкам токсоплазм: ROP1, MAG1, SAG1, GRA7 и GRA8. Наряду с этим было оценено состояние цитокиновой системы по содержанию TNF α и IL-1 β (метод ИФА, тест-системы фирмы «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург). Комплексная оценка полученных данных позволила установить клинико-лабораторные параллели врожденной и приобретенной форм токсоплазмоза. Корреляционные связи выявляли с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

Основные результаты показали, что для активной фазы инфекционного процесса, в том числе в 2 случаях врожденного токсоплазмоза, который у обследованных нами детей сопровождался прежде всего нарастающей неврологической симптоматикой, и у 3-х беременных женщин, были характерны следующие критерии: наличие IgA к *T. gondii* (антитела данного класса не проходят через плаценту и нарабатываются в инфицированном организме) и антител к ROP1, MAG1, SAG1, GRA7 и GRA8. Сочетание этих показателей с низкоавидными IgG указывало на заболевание у 4 детей, а сроки заражения (до 3-х мес.) в трех случаях совпадали с эпидемиологическим анамнезом (контакт с кошками). Пограничные уровни позволили в двух случаях установить подострое течение, а у 7 человек был установлен диагноз хронического токсоплазмоза с признаками активации в 4-х случаях, о чем свидетельствовало наличие высокоавидных антител, IgA и белков

ROP1, MAG1, SAG1, GRA7 и GRA8. При острой и подострой формах токсоплазмоза наличие IgA и белков ROP1 коррелировало с повышенным уровнем провоспалительных цитокинов TNF α и IL-1 β ($r=0,32$). Вместе с тем, хроническое течение сопровождалось низким содержанием изученных цитокинов.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали целесообразность использования WESTERN-BLOT при диагностике токсоплазмоза и мониторинге, в том числе хронического токсоплазмоза в группах высокого риска (беременные женщины; дети, рожденные матерями с токсоплазмозом, иммунодефицитные лица).

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРТИЗОЛА СЛЮНЫ МЕТОДОМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Дорофейчик-Дрыгина Н.А., Калинина Н.М.

*Стоматологический центр «Профидент»,
Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины МЧС России, Санкт-Петербург, Россия*

Одним из приоритетных направлений современной медицины является внедрение неинвазивных способов диагностики заболеваний. В последние годы возросло количество публикаций, посвященных исследованию некоторых биохимических и иммунологических параметров в слюне. Это связано, с одной стороны, с выявлением диагностической ценности многих показателей, с другой стороны, с разработкой альтернативных методов определения компонентов слюны. Начиная с 70-х годов, исследования по анализу слюны начали проводиться стоматологами, в основном они были связаны с изучением ее бактерицидности. В настоящее время актуальным становится определение гормональных показателей и медиаторов воспаления.

Известно, что продукция кортизола подчинена циркадному АКТГ-зависимому ритму с двумя пиковыми уровнями: высоким – утром и низким – ночью. Факторы, регулирующие этот циркадный ритм, пока окончательно не ясны, однако известно, что становление данного ритма происходит в раннем детстве и может нарушаться по ряду физических и психических причин.

Цель исследования заключалась в выявлении возможности определения кортизола люминесцентным иммунохимическим методом в слюне детей, находящихся на ортодонтическом лечении.

Проведено сопоставление двух методов определения кортизола в слюне – иммунолюминесцентного (LIA, IBL, США) и иммуноферментного анализа (ELISA, DSL, США). Нами показано, что определение кортизола иммунолюминесцентным методом в слюне представляет информацию, аналогичную определению гормона в моче. Изучены ритмы изменения кортизола в течение суток.

Исследование слюны имеет много преимуществ по сравнению с методами анализа крови и мочи: слюну легче забирать на анализ и хранить, чем другие биологические жидкости организма, сбор слюны недорогой способ и легко осуществляется у детей. Во-вторых, образцы слюны, в случае серийных анализов (в течение суток) можно собирать в домашних условиях. Если концентрация кортизола в плазме крови отражает только концентрацию на момент взятия крови, то, напротив, небольшая аликвота слюны собирается не моментально, а в течение 15-20 мин, поэтому результат анализа такого образца

позволяет более точно оценить базальную эндокринную активность. В-третьих, метод не требует экстракции, так как слюна не содержит альбумина или транскортина (как кровь) и метаболитов глюкокортикоидных гормонов (как моча). Немаловажно, что для проведения гормонального анализа слюны не требуется дорогостоящего оборудования, подобного тому, которое обычно используется для определения свободного кортизола в моче методом ВЭЖХ.

Реактивы и наборы для получения и анализа слюны уже несколько лет используются в странах Скандинавии, в США – находятся на стадии согласования в Управлении по контролю за продуктами и лекарствами, однако они практически не внедрены в систему отечественного здравоохранения. Доступность слюнных протоколов и особенно сти регуляции слюноотделения создают условия для исследования секрета желез в диагностических целях и не требуют специальных условий для сбора материала, это удобно при профилактических обследованиях пациентов, находящихся на стоматологическом лечении. Исследования в данном направлении продолжаются.

РАЗРАБОТКА АВТОМАТИЗИРОВАННОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТЧНОЙ МИГРАЦИИ *IN VITRO*

**Коноплева М.В., Кохановская Н.А.,
Третьяков О.Ю., Даниленко В.В., Денисов И.А.,
Бушмин В.В., Вовк В.А., Волков Д.А.,
Теслер М.Э., Суслов А.П.**

ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

Существует ряд высокоинформативных методов клеточной иммунологии и иммунохимии, имеющих существенный недостаток – субъективизм учета результатов. В настоящей работе поставлена задача усовершенствовать ранее разработанный нами скрининговый тест клеточной миграции *in vitro* (Суслов А.П., 1989) путем автоматизации учета результатов. Была создана компьютерная программа, позволяющая очерчивать слабоконтрастные изображения клеточных популяций, полученных при сканировании реакций в 96-луночных планшетах. Клеточные культуры макрофагов мыши и лейкоцитов человека сканировали дважды: сразу после формирования исходных клеточных популяций в системе МигроСкрин и через 18 часов культивирования (миграции клеток) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Разработанная программа позволила точно вычислять зону истинной миграции путем определения разницы в реальной площади клеточных культур: начальной и мигрировавшей. В результате определение коэффициента подавления или стимуляции миграции стало объективным, более точным и достоверным. Работа программы была продемонстрирована при тестировании миграции клеток в присутствии MIF и белков ВИЧ (p24, gp41, gp120).

СПЕКТРОТУРБИДИМЕТРИЯ В ОЦЕНКЕ РАЗМЕРОВ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ: АДАПТАЦИЯ К КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Королевская Л.Б., Шмагель К.В., Смолина Л.А.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов
УрО РАН, Пермь, Россия*

Среди иммунопатологических состояний выделена группа заболеваний, в основе патогенеза которых лежит деструктивное влияние на органы и ткани комплексов

антиген-антитело (иммунных комплексов (ИК)). Особенно это относится к ИК, имеющим небольшие размеры. Для диагностики и лечения таких состояний требуются достаточно информативные диагностические методы. К сожалению, на сегодняшний день среди большого количества тестов, разработанных для определения циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), в мире нет ни одного универсального, который мог бы служить эталоном для сравнения: все они имеют те или иные недостатки (Н.А.Константинова, 1985; И.А.Туманова, 1986). Еще в 1970 году ВОЗ рекомендовала проводить определение ЦИК, опираясь на идентификацию в них какого-либо иммунного компонента: антигена, антитела или комплекта. Однако по ряду причин (в первую очередь из-за отсутствия необходимых реагентов и оборудования) в практике здравоохранения получил распространение простой, но малоинформативный метод, основанный на турбидиметрическом измерении мутности сыворотки, развивающейся после добавления к ней полиэтиленгликоля-6000 (ПЭГ-6000). В 1992 г Т.Аллен представил теорию, согласно которой при измерении любых частиц их можно расценивать как сферические и на этой основе рассчитывать их диаметр. Адаптация теории к характеристике нерастворимых иммунных комплексов обоснована недавно (Khlebtsov V.N. et al., 2004). Вместе с тем, диагностических методов, основанных на одновременной дифференциации ЦИК по размеру и содержанию изомеров иммуноглобулинов в мировой литературе пока не представлено.

Целью настоящего исследования является разработка доступного в клинической практике метода, позволяющего одновременно определить размер и содержание различных изомеров иммуноглобулинов, входящих в состав ИК. Одной из задач на этом пути было определение на основе модельных ИК размеров образуемых агрегатов в зависимости от соотношения антиген/антитело.

Для моделирования ИК использовали столбчатый анатоксин и человеческий противостолбчатый иммуноглобулин. С целью оценки эквивалентности соотношения антиген/антитело при образовании ИК смешивали анатоксин и иммуноглобулин в различных концентрациях, инкубировали в 96-луночном планшете в течение 30 мин при 37°C. Затем снимали показатели оптической плотности (ОП) на вертикальном фотометре при длине волны 340 нм. На основе полученных данных строили графики зависимости ОП от соотношения концентраций антиген/антитело. По ним находили зоны эквивалентности концентраций антигена и антитела, а также выбирали точки для дальнейшего исследования. Разведение антигена 1:32 и антитела 1:2 соответствовало зоне эквивалентности. В ходе дальнейших экспериментов использовали также следующие соотношения антиген/антитело: 1/32 и 1/8; 1/32 и 1/4; 1/16 и 1/2; 1/64 и 1/2. Измерение ОП производили на спектрофотометре Shimadzu UV mini-1240 в диапазоне длин волн от 340 до 820. Затем строили график зависимости логарифмов ОП и длины волны, рассчитывали показатель волновой экспоненты и по уравнению Геллера определяли размер ИК. В нашей модельной системе диаметр ИК находился в пределах 150-450 нм и зависел от соотношения антиген-антитело. При недостатке антител размер ИК был значительно меньше, чем при избытке антигена. Это указывает на то, что в условиях избытка антигена и недостатка антител происходит формирование небольших по размеру (патогенных) ИК. Дальнейшее исследование будет направлено на определение концентраций различных изомеров иммуноглобулинов в ИК разной размерности.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

**Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Сахно Л.В.,
Распай Ж.М., Никонов С.Д., Старостина Н.М.,
Останин А.А., Черных Е.Р.**

*ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН,
Новосибирск, Россия*

Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антиген-презентирующими клетками с уникальной способностью праймировать наивные Т-клетки и обеспечивать наиболее эффективный иммунный ответ на различные антигены. Прогресс в методах генерации ДК *in vitro* позволяет рассматривать эти клетки в качестве нового варианта адьювантной терапии в клинической практике. Соответственно, изучение ДК при патологии представляет особый интерес как в плане изучения патогенеза иммунопатологических процессов, так и в отношении возможного их использования при иммунотерапии. Обычно ДК получают путем культивирования моноцитов периферической крови с GM-CSF и IL-4 с последующим добавлением созревающих стимулов. Замещение IL-4 на IFN- α служит альтернативой классическому протоколу и представляет более физиологическую систему генерации ДК, поскольку IFN- α начинает продуцироваться с самых ранних этапов иммунного ответа на различные патогены. IFN-ДК быстрее приобретают зрелый фенотип, отличаются большей гетерогенностью, миграционной активностью и способны активировать как Th1, так и Th2 ответ. В литературе имеются данные об изменении фенотипа GM-CSF/IL-4-индуцированных ДК, но практически отсутствуют сведения, характеризующие IFN-ДК при патологии. Исходя из этого, целью работы стало исследование фенотипических свойств IFN-ДК в популяции здоровых лиц и у пациентов с инфекционными и онкологическими заболеваниями.

ДК получали путем культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови в присутствии GM-CSF и IFN- α с последующим созреванием в присутствии липополисахарида. Фенотипирование клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson).

У здоровых доноров полученные ДК характеризовались следующим фенотипом: CD83⁺ 22,4±2,4%; CD25⁺ 25,1±3,5%; CD1a⁺ 10,4±2,0%; CD11c⁺ 28,7±2,2%; CD123⁺ 24,9±2,64%; CD14⁺ 8,7±1,4%. Большинство CD83⁺ клеток не несли CD1a антиген, то есть были представлены зрелыми ДК. При этом их количество соответствовало числу CD25⁺ клеток, относящихся к категории активированных зрелых ДК. Тем не менее, выявлялась небольшая субпопуляция клеток, очевидно, промежуточной степени зрелости, экспрессирующих одновременно CD83 и CD1a (5,3±1,7%). Характерно, что в полученных культурах идентифицировались клетки как с миелоидными (CD11c), так и лимфоидными (CD123) маркерами. Присутствие CD123, может быть связано со способностью IFN- α частично блокировать снижение экспрессии CD123 на поверхности моноцитов по мере их дифференцировки в ДК и свидетельствовать о простой коэкспрессии данного маркера на миелоидных клетках (учитывая миелоидное происхождение IFN-ДК из моноцитов периферической крови). В то же время, нельзя исключить, что среди прилипающих к пластику клеток имеются предшественники плазматоидных ДК и в данном протоколе генерируются не только миелоидные, но и плазматоидные ДК. Действи-

тельно, наряду с субпопуляцией CD11c⁺CD123⁺ (7,3±1,3%), у доноров выявлялась также субпопуляция клеток с фенотипом CD11c⁻CD123⁺ (14,3±2,3%). У больных с опухолевыми заболеваниями (злокачественные опухоли головного мозга, лимфомы) отмечалось нарушение дифференцировки миелоидных ДК, что проявлялось увеличением популяции незрелых CD14⁺ ДК и ДК промежуточной зрелости CD83⁺CD14⁺, а также снижением зрелых ДК (CD83⁺CD14⁻), в том числе с наличием активационного маркера (CD25⁺). При этом численность CD14⁺ и CD11c⁺CD123⁺-клеток достоверно возрастала. У больных с хроническими формами инфекции (туберкулез легких, хронический вирусный гепатит с исходом в цирроз) нарушения созревания миелоидных ДК были менее выражены. В обоих случаях отмечалось снижение относительного количества активированных ДК (CD25⁺) и увеличение числа CD11c⁺CD123⁺ клеток. Кроме того, у больных туберкулезом регистрировалось увеличение количества CD14⁺ клеток. Исходя из этого, можно заключить, что развитие различных иммунопатологических процессов сопряжено с изменением дифференцировки и созревания ДК.

АКТИВНОСТЬ ЦИТОКИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА

**Маммаев С.Н., Мажидов А.И., Халимова З.А.,
Богомолов П.О., Мурадова В.Р.**

Дагестанская государственная медицинская академия, г.Махачкала, Республика Дагестан, Россия

В последние годы большое внимание уделяется изучению патогенеза НАСГ, а именно, факторам, способствующим переходу стеатоза в стеатогепатит. Наличие достаточного количества окисляемого жира в печени является одним из факторов, необходимых для запуска процессов ПОЛ (перекисного окисления липидов). Продукты ПОЛ (альдегиды) способны повреждать мембраны гепатоцитов, активировать звездчатые клетки печени с развитием воспаления и фиброза. Но вместе с тем, у многих больных стеатоз печени никогда не прогрессирует до стадии воспалительно-некротических изменений и фиброза. Это позволяет предполагать, что для развития НАСГ требуется действие других факторов, разобщающих окисление и фосфорилирование, способствующих образованию РФК. Одними из таких факторов считается повышенная продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками.

В исследование было включено 40 больных НАСГ в возрасте от 29 до 65 лет, из них мужчин 12, женщин 28. Контрольную группу составили 25 здоровых добровольцев: 8 мужчин и 17 женщин (средний возраст 38±15 лет). Диагноз НАСГ устанавливали на основании исключения вирусного, алкогольного, аутоиммунного и других причин поражения печени. Морфологическое исследование биоптатов печени проведено 25 (62%) больным с определением выраженности некротического процесса и стадии фиброза по E Brunt. Концентрацию цитокинов в сыворотке крови – TNF-α, IL-4, IFN-γ определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-систем. При изучении цитокинов сыворотки крови выявлено повышение содержания TNF-α, IFN-γ у 26 (65 %) и у 33 (82 %) больных соответственно по сравнению с таковыми в контрольной группе. Средние значения TNFα и IFN-γ достоверно отличались от показателей кон-

трольной группы (p<0,05 и p<0,01 соответственно). Средние значения IL-4 достоверно не отличались (p<0,05) от такового в группе контроля. Изучение взаимосвязи между содержанием цитокинов и биохимическими показателями у больных НАСГ установило наличие достоверной прямой связи: уровня TNF-α и IFN-γ, с одной стороны и концентрации холестерина, с другой (r=0,58 и r=0,67, p<0,01, соответственно); количества TNF-α и уровня АСТ (r=0,54, p<0,05); концентрация IFN-γ и уровня АЛТ (r=0,62, p<0,01). При сопоставлении уровня цитокинов сыворотки крови с морфологическими показателями установлена статистически значимая прямая связь: уровня TNF-α со степенью стеатоза печени (r=0,46, p<0,05); концентрации IFN-γ с выраженностью долькового воспаления (r=0,49, p<0,05).

Таким образом, по результатам нашего исследования система цитокинов активирована у больных НАСГ. Дисфункция цитокиновой системы сопровождается повышенной продукцией провоспалительных цитокинов (TNF-α, IFN-γ), уровень которых в сыворотке крови имеет достоверную связь с основными клинико-лабораторными показателями больных НАСГ. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что цитокиновая система вовлечена в патогенез НАСГ.

СОДЕРЖАНИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ И УРОВНИ АНТИТЕЛ К ПЕПТИДАМ ТИМУСА У БОЛЬНЫХ АНДРОГЕНЗАВИСИМЫМИ НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ДЕРМАТОЗАМИ

**Пескова И.В., Аутеншлюс А.И., Ефремов А.В.,
Масленников А.Б., Патрина М.В.**

ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет; ГУЗ Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр, Новосибирск, Россия

Введение. Клиническая практика свидетельствует, что своевременное и эффективное лечение вульгарных и розовых угрей, себореи, относящихся к группе андрогензависимых нейтрофильных дерматозов (АНД), учитывая их распространенность и возможные осложнения, является чрезвычайно актуальной медико-социальной проблемой. Уже сейчас становится ясно, что отбор пациентов для лечения АНД и оценка эффективности терапии должны проводиться как на основе комплексной оценки клинического, биохимического, эндокринного статуса больного, индивидуальных особенностей его генотипа, но и, прежде всего, включать характеристику иммунного статуса. В настоящее время не вызывает сомнений патогенетическое значение в формировании хронической кожной патологии нарушений нормального функционирования и взаимодействия различных звеньев иммунной системы, сопровождающееся вторичными иммунодефицитами. В последние годы появился ряд работ, в которых было показано, что одним из факторов ауторегуляции функциональной активности Т-лимфоцитов могут быть антитела (АТ) к пептидам тимуса, в частности, к тимогену, который является аналогом одного из активных компонентов тималина.

Цель - изучить возможности использования содержания Т-лимфоцитов и уровней антител к тимогену, Т-активину у больных андрогензависимыми нейтрофильными

дерматозами для отбора лиц с изменениями в иммунной системе.

Материалы и методы. Обследовано 80 пациентов, которые по результатам клинического исследования сформировали четыре группы. Первую группу составили пациенты с папулопустулезной формой вульгарных угрей (ВУ) средней степени тяжести (51 человек), вторую - пациенты с индуративной формой ВУ тяжелой степени (10 человек), третью - пациенты с абсцедирующей формой ВУ тяжелой степени (15 человек) и четвертую - больные с конглобатной формой ВУ тяжелой степени (4 человека). Все обследованные пациенты - лица мужского пола. Контрольная группа состояла из практически здоровых лиц (50 мужчин) аналогичного возраста, не имевших патологических отклонений со стороны кожных покровов. **Материалом исследования** служила венозная кровь. Относительное содержание популяций и субпопуляций лимфоцитов определялось методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных АТ производства НПЦ «Медбиоспектр» (Москва). Использовались моноклональные АТ к следующим антигенам: к CD3 - маркеру зрелых Т-лимфоцитов (ИКО 90), к CD4 - маркеру Т-хелперов/индукторов (ИКО 86), к CD8 - маркеру Т-супрессоров/цитотоксических клеток (ИКО 31), к CD38 - маркеру активированных Т- и В-лимфоцитов (ИКО 20), к CD25 - маркеру L-цепи рецептора интерлейкина-2 (ИКО 105), к CD71 - рецептору трансферрина (ИКО 92) и к CD95 - маркеру Fas-антигена, опосредующего апоптоз (ИКО 160). Вычислялся индекс CD4/CD8. Исходя из абсолютного содержания лейкоцитов и процента лимфоцитов в периферической крови, определялось абсолютное содержание популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов. Определение уровней АТ к тимогену и Т-активину проводилось с помощью тест-систем «Тимоген-тест» и «Т-активин-тест» (ПМЦ Сибмедприбор, Новосибирск). Повышенными уровнями АТ к тимогену и Т-активину считались значения коэффициента (К) $\geq 1,20$. Коэффициент рассчитывался как отношение оптической плотности продукта реакции опытной сыворотки к величине оптической плотности продукта реакции контрольной сыворотки.

Основные результаты. Установлено, что наиболее существенным различием между ВУ средней степени тяжести и ВУ тяжелой степени является сочетание достоверной обратной корреляционной связи между относительным содержанием CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитов с достоверной прямой корреляционной связью между абсолютным содержанием CD25⁺ и CD38⁺ лимфоцитов и уровнями АТ к тимогену. Кроме того, были получены результаты, согласно которым нормализация лабораторных и клинических показателей у больных с АНД достигалась иммунотерапией именно тем пептидом, к которому были выявлены наиболее высокие уровни АТ.

Заключение. Полученные данные позволяют рекомендовать определение уровней АТ к пептидам тимуса для отбора лиц с изменениями в иммунной системе. У больных андрогензависимыми нейтрофильными дерматозами возможно использование определения уровня АТ к пептидам тимуса в качестве одного из критериев назначения индивидуальной иммунокорректирующей терапии для повышения эффективности их фармакотерапии в целом. Это не только повышает экономичность такого лечения, но также вовлекает в лечение пациентов на более ранних стадиях.

ВЫЯВЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (МКАТ) ЭПИТОПОВ IgA, SIgA И СЕКРЕТОРНОГО КОМПОНЕНТА (SC), ОБЩИХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Писарева М.Н., Ибрагимова Д.Г., Грязева И.В., Самойлович М.П., Климович В.Б.

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт, Санкт-Петербург, Россия

Исследование с помощью МкАт общих эпитопов на гомологичных молекулах у животных разных уровней организации направлено на раскрытие закономерностей эволюции этих молекул, а также способствует разностороннему изучению молекул одних видов животных с помощью реагентов, созданных против антигенов других видов. Компоненты, составляющие комплекс SIgA человека, имеют разный эволюционный возраст: SC обнаруживают у представителей всех классов позвоночных, начиная с хрящевых рыб, IgA – только у птиц и млекопитающих. Задачи работы: 1- выявление консервативных детерминант, представленных на молекулах SIgA и SC человека и других позвоночных; 2- определение взаимного расположения этих детерминант; 3- оценка возможных вариантов детекции IgA, SIgA и SC методом двухцентрового иммуноанализа с помощью МкАт у животных разных таксономических групп. Объектами исследования служили препараты IgA, SIgA, SC из молозива человека, а также образцы слюны, молока, сыворотки крови, мочи и смывов из трахеи позвоночных животных разных таксонов, от хрящевых рыб до млекопитающих. Антигенные детерминанты компонентов SIgA выявляли с помощью МкАт против альфа-цепей и SC человека, полученных в лаборатории гибридомной технологии ЦНИРРИ. Для обнаружения антигенных детерминант и изучения их свойств использовали несколько вариантов твердофазного ИФА: двухцентровый, прямой, непрямой, конкурентное и неконкурентное ингибирование. Для определения природы эпитопов применяли восстановление дисульфидных связей 0,1М дитиотрептолом с последующим алкилированием. На молекуле IgA человека МкАт выявляют 7 эпитопов, сгруппированных в 3 кластера. Ни один из этих эпитопов не является специфичным для человека. Высокая антигенная гомология молекул IgA выявлена у человека и представителей отряда парнокопытных. Наибольшее антигенное сходство обнаружено между альфа-цепями человека и свиньи (6 общих эпитопов из 7). Один из эпитопов, сохраняющийся после восстановления дисульфидных связей, оказался наиболее консервативным и был обнаружен на молекулах IgA у представителей нескольких отрядов млекопитающих и у птиц. Восемь эпитопов из девяти, выявляемых с помощью МкАт на SC человека, было обнаружено у животных разных видов. Семь эпитопов являются общими для человека и представителей парнокопытных. Один из двух наиболее консервативных эпитопов имеет конформационную природу, тогда как другой является криптическим. Предварительные данные указывают на присутствие общего консервативного эпитопа SC млекопитающих, птиц, рептилий и хрящевых рыб. Исследование взаимного расположения эпитопов на молекулах IgA, SIgA и SC позволило определить пары МкАт для детекции этих молекул методом двухцентрового иммуноанализа. Обнаружены пары МкАт, пригодные для исследования IgA коров, овец и свиней. Определены комбинации МкАт для выявления SIgA

у тех же животных, а также у кошек и птиц. Для выявления свободного SC необходимо, чтобы одно из МкАт распознавало криптическую, а второе – постоянно экспрессируемую детерминанту антигена. Обнаружены комплементарные пары реагентов для детекции SC у овец и коз. Результаты исследования не обнаруживают связи между консервативностью эпитопов и их конформационной или линейной природой. Полученные данные указывают на высокую антигенную гомологию у животных разных таксонов молекул SC и IgA, и на возможность их детекции с помощью МкАт, полученных против соответствующих молекул человека. Работа выполняется при финансовой поддержке РФФИ (грант 05-04-48860).

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ АУТОЭРИТРОЦИТНЫХ ГЕМОКОМПОНЕНТОВ ПРИ ЛЕЙКОФИЛЬТРАЦИИ

Пугина Н.В., Касьянов А.Д., Чечеткин А.В., Вильянинов В.Н.

Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Наличие лейкоцитов в гемотрансфузионных средах способствует избыточному накоплению в них свободнорадикальных форм кислорода и провоспалительных цитокинов, что ухудшает качество гемокомпонента при хранении.

Целью работы явилось исследование эффективности применения лейкоцитарных фильтров в процессе дооперационного резервирования аутогемокомпонентов у больных ортопедического профиля.

Больные (60 человек) были разделены на 2 группы: в первую были включены пациенты, которым проводилась фильтрация аутокрови в процессе эксфузии, вторая – контрольная. Непосредственно после гемоэксфузии применяли лейкоцитарные Leukotrap A1 с последующим разделением на аутогемокомпоненты.

Установлено, что спонтанный уровень малонового диальдегида (МДА) в фильтрованных эритроцитных средах при хранении был ниже на 46% по сравнению с контролем на 10-14 сутки хранения. При применении лейкоцитарных фильтров уровень ПОЛ на 10-14 сутки в I группе уровень МДА снизился на 12%, в то время как в контрольной группе наблюдался рост по сравнению с исходными значениями на 33%. Определение стимулированного уровня МДА, являющегося более чувствительным показателем, выявило снижение данного показателя в опытной группе на 5-7 сутки на 6%, а в контроле повышение на 33%, разница между группами составила 30%. На 10-14 сутки хранения содержание МДА в I группе выросло на 7%, а во II группе на 40% по сравнению с 5-7 сутками хранения. Разница между группами составила 40%.

При анализе динамики концентрации цитокинов и компонента комплемента C_{3a} установлено, что достоверных различий в содержании в супернатанте IL-1 β в исследуемых средах не было. Лейкофильтрация аутокрови не оказывала непосредственного влияния на содержание TNF- α . К 10-14 суткам хранения концентрация TNF- α в супернатанте лейкофильтрованной аутоэритроцитной массы (АЭМ) была в 1,5 раза ниже по сравнению с АЭМ, из которой лейкоциты не удаляли. Содержание IL-8 уже на начальных сроках хранения была ниже в лейкофильтрованной АЭМ на 26%, на 5-7 сутки – на 31%, на 10-14 сутки имела отчетливую тенденцию к снижению по сравнению со стандартной АЭМ.

Таким образом, лейкофильтрация эритроцитосодержащих аутогемокомпонентов положительно влияет на их качество, препятствуя интенсификации процессов перекисного окисления липидов при хранении, способствует снижению концентрации провоспалительных цитокинов и препятствует активации системы комплемента.

СООТНОШЕНИЕ ОСНОВНЫХ ЦИТОКИНОВ – ПОЗИТИВНЫХ И НЕГАТИВНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ГЕМОПОЭЗА – У БОЛЬНЫХ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ: РЕЦИДИВЕ И РЕМИССИИ

Розанова О.Е., Бубнова Л.Н.

Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Апластическая анемия (АА) является одним из самых тяжелых заболеваний системы крови и характеризуется гипоклеточностью костного мозга и панцитопенией в периферической крови. Согласно современным представлениям, основой патогенеза АА в большинстве случаев является иммунологически опосредованное нарушение гемопоэза, связанное с дисбалансом синтеза цитокинов, продуцируемых клетками иммунной системы больных. Известно, что кроветворение в норме обеспечивается сбалансированным комплексом как позитивных, так и негативных цитокиновых сигналов. Однако соотношение оппозитных цитокинов у больных АА до сих пор не определено.

С целью выяснения цитокиноопосредованных механизмов формирования депрессии кроветворения при АА, в **задачу** настоящего исследования входило определение соотношения основных позитивных и негативных регуляторов гемопоэза, продуцируемых мононуклеарами больных АА, и их динамика в разные фазы заболевания: в рецидиве и в периоде полной клинико-гематологической ремиссии.

Методы исследования. Продукцию цитокинов исследовали с помощью стандартного метода ИФА в супернатантах мононуклеарных клеток периферической крови и костного мозга (2×10^6 кл/мл) после их 24-часового культивирования при 37°C без добавления стимуляторов (спонтанная) и в присутствии соответствующих индукторов синтеза цитокинов (индуцированная). В работе использовали диагностикумы фирмы "Протеиновый контур" (СПб, Россия). Исследовали следующие цитокины: IL-1 β , IL-6 - позитивные факторы, TNF α - негативный регулятор гемопоэза, IL-4 - антагонист TNF α и IL-2 - фактор роста Т-лимфоцитов.

Результаты. Сравнительный анализ спонтанной продукции цитокинов в группе доноров и в группе больных показал, что в норме интенсивность выработки позитивного фактора IL-6 превалирует над синтезом других цитокинов как в периферической крови, так и в костном мозге. При АА приоритеты в продукции гемопоэтических факторов, в отличие от нормы, переменяются с IL-6 в сторону ингибиторного цитокина TNF α , спонтанная продукция которого превышает норму (42,3 и 44,2 пг/мл в костном мозге и периферической крови соответственно) более, чем в 10 раз. Рецидив заболевания характеризуется прогрессией всех нарушений в соотношении цитокинов, выявленных при АА. Так, достоверному увеличению продукции IL-1 β и IL-2 сопутствует сверхвысокая, доминирующая над всеми цитокинами интенсивность синтеза негативного

регулятора гемопоэза TNF α (в 12 и 18 раз превышающая норму в костном мозге и периферической крови соответственно) при снижении продукции его антагониста IL-4. Полная клинико-гематологическая ремиссия характеризуется тенденцией к нормализации соотношения цитокинов и в периферической крови, и в костном мозге. Так, в период ремиссии происходит смещение приоритетов в продукции цитокинов с негативного регулятора TNF α в сторону IL-6, и интенсивность синтеза данного позитивного фактора становится преобладающей над синтезом других цитокинов, как это было выявлено в норме. Однако даже в состоянии полной клинико-гематологической ремиссии уровень продукции TNF α мононуклеарами и периферической крови, и костного мозга больных остается повышенным.

Заключение. Таким образом, одним из ведущих механизмов формирования депрессии кроветворения при апластической анемии является цитокин-опосредованная иммуносупрессия, обусловленная нарушением синтеза и соотношения основных регуляторных цитокинов, продуцируемых клетками иммунной системы – мононуклеарами периферической крови и костного мозга больных и связанная прежде всего со сверхвысокой продукцией негативного регулятора гемопоэза TNF α .

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ИММУНОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ К ДИФТЕРИЙНОМУ ТОКСИНУ

Свиридов В.В., Титова Н.Г., Яковлева И.В., Котова Л.Ю.

ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН, Москва, Россия

При оценке качества сывороточных препаратов, в частности, антитоксической противодифтерийной сыворотки (ПДС), окончательное заключение о её активности делается на основании довольно трудоемкого и дорогостоящего биологического тестирования на лабораторных животных – реакции нейтрализации дифтерийного токсина (ДТ) на коже кролика или на морских свинках при сравнении испытуемых препаратов с отраслевым стандартным образцом.

Для рутинного определения напряженности противодифтерийного иммунитета единственный сертифицированный тест, используемый у нас в стране, – реакции пассивной геммаглютинации (РПГА). Предлагается также тестирование сыворотки крови в ИФА. В этих реакциях учитывается то предельное разведение сыворотки, при котором происходит агглютинация или регистрируется пороговая реакция в ИФА. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты этих тестов обусловлены тем, что в применяемом для сенсibilизации эритроцитов и планшетов дифтерийном анатоксине (ДАТ) не контролируется содержание антигенов собственно микробной клетки (соответственно – выявляются антитела не к токсину), а также тем, что не все выявляемые в этих реакциях антитела обладают функциональной способностью нейтрализовать действие нативного токсина.

Альтернативным тестированию *in vivo*, но более доступным, стандартным, чувствительным и специфичным является определение нейтрализующей активности антител *in vitro* в микроцитотоксическом (МЦТ) тесте в культуре чувствительных клеток (*Vero* или *СНО*), позволяю-

щим оценить эффекторную функцию антител – способность предупреждать действие ДТ.

При контакте ДТ с чувствительными к нему клетками в цепи событий, приводящих к их гибели вследствие блокады фактора элонгации 2, первым является связывание С-концевого участка молекулы ДТ с клеточным рецептором токсина. Наши исследования с использованием панели моноклональных антител (МкАт) свидетельствуют, что токсиннейтрализующий эффект наиболее выражен у антител, специфичных к С-концевому участку молекулы ДТ. Это позволяет считать его основным протективным эпитопом токсина и рассматривать эффект нейтрализации как результат конкуренции за связывание с ДТ между такими антителами и клеточными рецепторами, а сами паратопы этих антител – как структуры в известном смысле функционально эквивалентные клеточным рецепторам токсина. Иммунные комплексы, образованные ДТ и МкАт иной специфичности, например к фрагменту А токсина, в полной мере проявляют токсические свойства *in vivo* и на клетках *in vitro*.

Исходя из этого, нами рассмотрена возможность использования протективных МкАт ДТ-17 к С-концевому участку молекулы токсина для оценки в ИФА содержания протективных антител к ДТ. Выступая в качестве функционального эквивалента клеточных рецепторов, сорбированные на планшетах МкАт захватывают молекулы ДТ со свободным протективным эпитопом, не нейтрализованным антителами. В культуральном тесте не нейтрализованный токсин проявляет цитотоксический эффект на монослое чувствительных клеток, а в ИФА он выявляется при помощи пероксидазного конъюгата поликлональных антител к ДАТ.

В параллельных опытах в ИФА и МЦТ-тесте в культуре клеток *СНО* оценено содержание протективных антител в образцах лошадиной противодифтерийной сыворотки (ПДС) и образцах сыворотки крови вакцинированных лиц. В качестве эталона использован стандартный образец противодифтерийной сыворотки (10 МЕ/мл, ГИСК им. Л.А.Тарасевича). В работе также использованы высокоочищенный ДТ (любезно предоставлен В.Д.Смирновым), образцы коммерческих препаратов ДАТ, пероксидазные конъюгаты аффинно очищенных из ПДС антител к ДАТ. В ИФА для сенсibilизации планшетов использованы аффинно очищенные из асцитной жидкости МкАт ДТ-17.

Принципиальное сходство ИФА и МЦТ теста заключается в том, что в лунках планшетов смешивается в равных объемах определенное предварительно оттитрованное количество дифтерийного токсина с пробами референтной и исследуемых сывороток, взятыми в серийных двукратных разведениях. В МЦТ-тесте к смесям в лунках вносятся в суспензии по 10^4 клеток-мишеней *СНО*, планшеты на 2 суток помещают в CO_2 -инкубатор для выявления эффекта ДТ. В ИФА преинкубированные смеси вносят в лунки планшетов, сенсibilизированных МкАт ДТ-17. После часовой инкубации выявляют не нейтрализованный токсин при помощи пероксидажного конъюгата поликлональных анти-ДАТ антител. Контролем служат пробы, содержащие только токсин (контроль токсичности для клеток в МЦТ-тесте и исходное, принимаемое за 100%, выявление не нейтрализованного ДТ в ИФА), и данные титрования референтного образца антитоксина (минимальная концентрация антител, при которой полностью нейтрализуется использованная доза ДТ в МЦТ-тесте и численные данные оптической плотности для регрессионного анализа при выявлении не нейтрализованного токсина в ИФА).

Сопоставление данных, полученных в обеих системах определения нейтрализующих ДТ антител, показывает практически полное их совпадение. Оба метода позволяют адекватно оценить их содержание. Коэффициент корреляции r между ними достигает 0,98, в то время как между РПГА и МЦТ-тестом (по нашим данным) не превышает 0,64. Вместе с тем, следует отметить, что тестирование сывороток в предлагаемом варианте ИФА имеет ряд преимуществ по сравнению с тестированием в МЦТ-тесте: ИФА дешевле, доступнее, быстрее; процедура постановки проще при возможности точного ($\pm 0,001$ МЕ/мл) количественного анализа, высокой чувствительности, стандартности и воспроизводимости. Кроме того, как было установлено в серии специальных опытов, протективную активность антисывороток можно адекватно оценивать в ИФА, используя не только «живой» дифтерийный токсин, но и дифтерийный анатоксин производственных серий.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ GPIIb/IIIa НА ТРОМБОЦИТАХ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Сиваченко Е.Б., Кадинская М.И.,
Эмануэль В.Л., Вавилова Т.В.,
Заботина А.,
Зуева Е.Е.

*Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им.акад.И.П.Павлова,
Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Интегриновый рецептор GPIIb/IIIa играет большую роль в осуществлении первичного гемостаза, и при врожденном дефиците этих гликопротеинов, болезни Гланцмана, развивается тяжелая форма кровоточивости. Значение GPIIb/IIIa определяется прежде всего тем, что после стимуляции тромбоцитов в зоне повреждения эндотелия экспозиционируются рецепторные места связи для кофакторов адгезии и агрегации. Взаимодействие GPIIb/IIIa с фибриногеном лежит в основе первичной и вторичной агрегации тромбоцитов, а участие его с молекулами витронектина, ламинина, коллагена и фактором Виллебранда содействует реакциям необратимой адгезии и агрегации. Собственно активация тромбоцитов играет центральную роль в патогенезе многих сердечно-сосудистых заболеваний. Процесс активации тромбоцитов включает несколько этапов. Начальный этап сопровождается сменой формы тромбоцита с дискоидной на сферическую, выбросом биологически активных веществ из гранул тромбоцитов и образованием псевдоподий. Это создает условия для адгезии, которая обеспечивается взаимодействием тромбоцитов с компонентами внеклеточного матрикса в месте повреждения эндотелия. Завершение процесса адгезии сопровождается образованием монослоя тромбоцитов на месте повреждения. В процессе агрегации тромбоцитов происходят конформационные изменения поверхностных рецепторов псевдоподий GP IIb/IIIa, что приводит к увеличению их аффинности к своим лигандам: фибриногену и фибронектину.

Целью данного исследования было количественное определение рецепторов GP IIb/IIIa на поверхности тромбоцитов периферической крови.

Материалы и методы. Исследована периферическая кровь 5 волонтеров, 3 мужчин и 2 женщин в возрасте от 25 до 40 лет с отсутствием нарушений тромбоцитарного звена гемостаза и сердечно-сосудистых заболеваний в анамнезе. Ана-

лиз поверхностных рецепторов был проведен методом проточной цитометрии (Partec PAS) с помощью набора ADIAflo Platelet GPIIb/IIIa Occurance (American Diagnostica Inc.)

Результаты. Проведена оценка средней интенсивности флюоресценции калибровочных частиц с различной интенсивностью флюоресценции (низкая, средняя, высокая и очень высокая). На основании построенной в результате калибровочной кривой средние значения количества рецепторов GP IIb/IIIa у доноров соответствовали $51134,8 \pm 5666$ усл.ед., причем самые высокие значения получены у самого старшего донора.

Выводы. Поверхностные рецепторы GP IIb/IIIa являются ключевым звеном в процессе агрегации и ответственны за образование тромбоцитарного агрегата. У пациентов, длительно страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, полученные результаты могут быть использованы для планирования профилактики и проведения ранней диагностики преинфарктных состояний и артериальных тромбозов у лиц молодого возраста с целью снижения осложнений и риска летальных исходов. Установление ключевой позиции GP IIb/IIIa в механизмах адгезии и агрегации определит новые возможности для блокирования тромболитических процессов путем применения ингибиторов и антител.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НЕКОТОРЫХ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ РАЗЛИЧНЫХ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Тактаров В.Г.¹, Шуляк Ю.А.²

¹ *Московский государственный медико-стоматологический университет;*

² *Клиническая наркологическая больница №17 ДЗ г. Москвы, Россия*

В проведенном исследовании ставили основной целью оценить достоверность, чувствительность и «фармакоэкономическую» эффективность наиболее распространенных иммунохимических методов детекции наиболее распространенных и актуальных наркотических препаратов и их метаболитов в биологических средах человека (моча, слюна, волосы, ногти). Определяли содержание опиатов (Оп), в том числе – диацетилморфина (ДАМ – маркер потребления героина), метадона (Мт), амфетамина/метамфетамина (Аф), фенциклидина (РСР), кетамина (Кт) и каннабиноидов (Кнб) в традиционных объектах токсикологической экспертизы (моча, слюна) и относительно новых, «нетрадиционных» объектах (волосы, ногти). Забор материала осуществляли как у потребителей наркотиков, проходящих лечение в стационаре, так и у пациентов хирургических, гинекологических, ожоговых и хосписных отделений. Образцы слюны и/или мочи использовались практически в нативном виде, либо разводились фосфатным буфером, УЗ-экстракцию из измельченных навесок волос и ногтей осуществляли метанолом по общепринятым методикам.

В качестве иммунохроматографических тестов использовали наборы QuickScreen™ (Phamatech Inc., США) для мочи, а для образцов слюны применяли COZART Rapiscan (Saliva Diagnostic Systems Inc., США). В образцах мочи и экстрактах ногтей/волос сравнительную детекцию проводили методом поляризационного флуороиммуноанализа (ПФИА) на приборе TDx/TDx-FLx (Pex, Abbott, США) со стандартными наборами и калибраторами, для количественного иммуноферментного анализа применяли

гетерогенный твёрдофазный вариант ИФА с наборами ООО «Фарматех» (Москва) в комплексе с автоматическим анализатором «Униплан» (ЗАО «Пикон», Москва). Для радиоиммунного анализа использовали наборы для РИА компании DRG (США) и многофункциональный универсальный счётчик «Триатлер» фирмы «Hidex» (Финляндия).

Наиболее низкая чувствительность (50-300 нг/мл) и специфичность выявлена при использовании экспресс-тестов для детекции Оп, ДАМ, Кнб, Аф, Мт и РСР в моче. Время определения метаболитов наркотиков, после последнего приёма препарата не превышало нескольких дней. При применении метода ПФИА величины пороговой концентрации для Оп составили 20 нг/мл, что позволяло уверенно определять метаболиты наркопрепаратов как в моче, так и в экстрактах волос и ногтей. Наиболее чувствительным и специфичным для Оп, Кнб, РСР и Кт следует признать количественный ИФА (предел обнаружения 0,1-10 нг/мл) и особенно РИА. Радиоиммунологический метод наиболее предпочтителен при работе с волосами и ногтями наркопотребителей для целей судебно-токсикологической экспертизы (время детекции после последнего приёма препарата может составлять многие недели). Необходимо отметить, что РИА характеризуется, наряду с высокой чувствительностью и специфичностью, низкой технологичностью (короткие сроки жизни изотопов – небольшой срок годности, проблемы с таможенной и т.п.).

Выводы: иммунохимические методы выявления наркотиков и их производных в биологических средах являются предпочтительными, так как не требуют предварительной очистки образцов и фракционирования. «Быстрые» иммунохроматографические тесты для выявления наркотических веществ в моче отличаются относительно низкой чувствительностью и специфичностью и могут быть рекомендованы лишь для предварительной экспресс-диагностики/контроля ремиссии. Использование экспресс-тестов для определения наркопрепаратов в слюне никаких преимуществ по сравнению с мочой, по результатам исследования, не имеет. Выявление наркотиков и их метаболитов (Оп, Кнб, Мт, РСР, Аф) в моче методом ПФИА на анализаторе TDx/TDx-FLx характеризуется высокой специфичностью и достаточной чувствительностью и может применяться для скрининговых исследований (особенно при одновременной обработке большого количества образцов). Самая высокая чувствительность и специфичность детекции Оп, ДАМ, Кнб, Мт и РСР достигается при применении методов твёрдофазного ИФА и особенно РИА, однако для задач экспертизы необходимо последующее подтверждающее исследование образцов, например методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС). Следует подчеркнуть, что наряду с положительными моментами технология использования таких объектов, как волосы и ногти, характеризуется достаточно высокой стоимостью и трудоёмкостью.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (МКАТ) ПРОТИВ CAG-A БЕЛКА *HELICOBACTER PYLORI*

Терехина Л.А., Грязева И.В., Самойлович М.П., Климович В.Б.

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт РосЗДРАВА, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время *Helicobacter pylori* рассматривается в качестве основной причины язвенных поражений желуд-

ка и двенадцатиперстной кишки. Использование МКАТ, полученных против антигенов *H. pylori*, делает возможным выявление, выделение и исследование антигенной вариабельности штаммов этих бактерий. Целью работы было получение и исследование иммунохимических свойств МКАТ против CagA – белка *H. pylori*. Антигеном для иммунизации служил рекомбинантный С-концевой фрагмент цитотоксин-ассоциированного белка вирулентных (ульцерогенных) штаммов *H. pylori* (CagA). Размер фрагмента составлял 580 аминокислот из 1183 аминокислот полного CagA. Самок мышей F1 (SJL/JxBALB/c) иммунизировали дважды сначала в полном, затем в неполном адьюванте Фрейнда внутривенно или внутрибрюшинно. Наиболее высокий титр антител выявлен у животных, иммунизированных внутрибрюшинно. С помощью стандартных методов гибридомной технологии проведено слияние спленоцитов мыши и клеток миеломной линии 653А. Отбор продуцирующих клонов и активность МКАТ определяли с помощью твёрдофазного ИФА на иммобилизованном иммуногене. Выявляющим реагентом служили антимишьянные кроличьи антитела, меченные пероксидазой. Получено 7 стабильно растущих и продуцирующих антитела клонов гибридом, которые были выращены в массовой культуре и привиты внутрибрюшинно мышам F1 (SJL/JxBALB/c) для получения асцитических жидкостей. Установлено, что 6 МКАТ распознают эпитопы CagA белка, иммобилизованного на твердой фазе или находящегося в растворе. Из этого можно заключить, что распознаваемые МКАТ эпитопы устойчивы к изменениям конформации, происходящей при адсорбции антигена на твердой фазе. Одно МКАТ связывается только с адсорбированным CagA-антигеном. Среди полученных МКАТ выявлены реагенты, сохраняющие после иммобилизации на твердой фазе способность к связыванию антигена. Все МКАТ взаимодействуют с антигеном *H. pylori*, выделенным от инфицированных пациентов. Предполагается использовать полученные МКАТ для выявления антигенов ульцерогенных CagA-положительных штаммов *H. pylori* в материале пациентов, для контроля качества антигена, адсорбированного на твердой фазе и для дифференцирования штаммов этих бактерий.

ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ И ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА АНАТОКСИНОВ

Титова Н.Г., Свиридов В.В., Яковлева И.В., Буркин М.А., Грубер И.М., Гальвидис И.А., Котова Л.Ю.

ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН, Москва, Россия

Эффективность вакцинации определяется в значительной мере качеством используемых вакцин, а контроль и стандартизация их параметров – важнейший момент в их производстве. Для характеристики токсинов и получаемых из них анатоксинов применяются тесты *in vivo* и *in vitro*, отражающие различные их свойства, не имеющие однозначной взаимозависимости. В частности, активность нативных токсинов оценивается в тестах на животных и измеряется в D_{1m}, ЛД₅₀. Активность анатоксинов («антигенные свойства»), определяемую на животных, выражают в единицах связывания (ЕС), отражающих взаимодействие со стандартной антитоксической сывороткой в присутствии токсина. Антигенные свойства токсинов и анаток-

синов оценивают и в флоккулирующих единицах (Lf). Не всегда контролируется содержание в препаратах балластных примесей (антигенов микробных клеток, компонентов среды культивирования). Кроме того, тестирование препаратов на животных продолжительно (до 4 суток), что не позволяет оперативно следить за накоплением продукта в процессе культивирования продуцента.

Исследована возможность применения МкАт с заданными специфичностью и эффекторными свойствами с целью совершенствования методов контроля и стандартизации анатоксинов. Изучено в динамике накопление дифтерийного токсина (ДТ) при различных параметрах глубинного периодического культивирования производственного штамма *PW-8 C.diphtheriae*. Процесс вели под контролем параметров окислительно-восстановительного потенциала, рН, потребления кислорода и выделения углекислоты, режима углеводного питания. Сравнивалась биологическая и антигенная активность ДТ в системах *in vivo* (определение DIm для морских свинок) и *in vitro* в реакции флоккуляции (РФ), в микроцитотоксическом тесте (МЦТТ) на культуре клеток СНО и в ИФА с применением моноклональных антител (МкАт) ДТ-17. Используются МкАт, специфичные к С-концевому участку молекулы ДТ и нейтрализующие его действие *in vivo* и *in vitro*. Референтными препаратами служили высокоочищенный ДТ с оттитрованной активностью 600 Lf/мл и производственные серии анатоксина с активностью 300–315 Lf/мл. В стандартной постановке МЦТ-теста отчетливый цитотоксический эффект выявляется при содержании всего лишь 0,0006 Lf ДТ в 1 мл анализируемой пробы. ИФА позволяет выявлять ДТ при концентрации его в пробе 0,0012 Lf/ml. Сравнительное определение в МЦТТ и в ИФА накопления ДТ в пробах среды, взятых на различных сроках культивирования коринебактерий, свидетельствует о выраженной корреляции получаемых в них данных ($r = 0,98$ для 95% вероятности). Столь же высока коррелятивная связь результатов МЦТ-теста с результатами определения DIm для морских свинок ($r=0,986$). В то же время, антигенная активность, выявляемая в РФ, не совпадает с данными МЦТ-теста и ИФА. Связано это с тем, что в РФ с поликлональной антисывороткой выявляются все присутствующие в среде антигенные компоненты, в том числе самих коринебактерий и белковые компоненты питательной среды.

Использование МкАт к ДТ для сенсibilизации планшетов в ИФА обеспечивает избирательность «настройкой» системы на захват молекул только токсина, а применение пероксидазного конъюгата поликлональных Ат позволяет выявлять захваченную моноклональными антителами молекулу ДТ за счет связывания его с любым доступным эпитопом молекулы. К тому же применение нейтрализующих ДТ МкАт позволяет оценить сохранность и содержание не просто токсина или анатоксина, а специфического протективного эпитопа – С-концевого участка молекулы ДТ. Определение антигенной активности препаратов дифтерийного анатоксина (ДАТ), уравненных по концентрации с ДТ по флоккулирующим единицам Lf/мл, показало, что выявляемые в ИФА концентрации вдвое ниже выявляемых в РФ. Это можно рассматривать как свидетельство сохранности пространственной структуры протективного эпитопа ДТ после токсонидирования формальдегидом лишь у части молекул ДАТ, и правильной было бы оценивать иммуногенную протективную активность анатоксинов по этому параметру.

Таким образом, для оценки качественных и количественных характеристик бактериальных токсинов и получаемых из них препаратов анатоксинов применение биологических тестов в культуре клеток и ИФА с использованием МкАт с определенными свойствами имеет несомненные преимущества по сравнению с используемыми. Главные их достоинства – высокая чувствительность и воспроизводимость, а ИФА, при абсолютной специфичности, позволяет дать строгую количественную оценку содержания продукта, что дает возможность оперативного контроля технологического процесса. Использование подобных методов на различных этапах процесса производства иммунобиологических препаратов и в процедуре их стандартизации могло бы способствовать уменьшению себестоимости и повышению качества МИБП и отвечало бы рекомендациям экспертов ВОЗ.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ В КЛИНИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОЛОГИИ

**Туйгунов М.М., Фархутдинов Р.Р.,
Медведев Ю.А., Тевдорадзе С.И., Друх В.М.,
Лиховских В.А.**

ФГУП «НПО»Микроген» МЗ и СР РФ, Башкирский государственный медицинский университет, Уфимский государственный авиационный технический университет, Россия

Для изучения функционального состояния клеток крови в последнее время начинают использоваться хемилюминесцентные (ХЛ) методы исследования, позволяющие оценить уровень и характер генерации фагоцитами активных форм кислорода (АФК), которые выполняют микробицидные функции. Однако, несмотря на большие возможности этих методов, они еще мало доступны из-за отсутствия в России широкого промышленного производства приборов для регистрации ХЛ и стандартизации условий измерения, вносящих минимальные изменения в активность клеток: способов подготовки и хранения биологических образцов, используемых антикоагулянтов, питательных сред и т.д., существенно влияющих на генерацию АФК.

Разработан портативный прибор с пакетом программ и методов исследования ХЛ биологического материала, прошедшие апробацию в экспериментальных и клинических условиях. Модифицирован метод измерения спонтанной и стимулированной ХЛ крови, позволивший упростить техническое выполнение исследования, повысить точность анализа. Выявлены корреляционные связи между функциональным резервом фагоцитов, величинами спонтанной и стимулированной ХЛ крови, коэффициентом активации ХЛ, характером и стадией патологического процесса, его продолжительностью, наличием очагов инфекции, сенсibilизацией организма и т.д. Сильные связи обнаружены между спонтанной ХЛ и СОЭ, количеством и активностью нейтрофилов при воспалении, процентом CD8⁺ лимфоцитов при отеке Квинке и крапивнице. В норме величина стимулированной ХЛ существенно выше спонтанной, и по разнице этих величин можно судить о функциональном резерве фагоцитов. В острой фазе патологии происходит активация нейтрофилов, повышается интенсивность спонтанной и стимулированной ХЛ крови. Уменьшение разницы между ними свидетельствует о снижении функционального резерва клеток. В разгар

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕТИНОИДНОГО S-АНТИГЕНА МЕТОДАМИ ТРЕХСТАДИЙНОГО СУЛЬФАТАММОНИЙНОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЕЙ

Название пробы	Объем пробы, мл	S-антиген		Общий белок (Бредфорд)		S-антиген/Белок
		мг/мл	в объеме, мг	мг/мл	в объеме, мг	
После второй стадии осаждения	50	1,34	67	4,72	236	0,28
После третьей стадии осаждения	50	1,26	63	3,60	180	0,36
Нанесено на колонку с Sephacryl S-200	11	5,45	60	15,64	172	0,36
Первая фракция	50	0,72	36	1,80	90	0,40
Вторая фракция	26	0,62	16	0,77	20	0,80
Третья фракция	101	0,01	1	0,44	45	0,02

патологического процесса способность нейтрофилов к выработке АФК падает, функциональный резерв минимален. При неблагоприятном течении заболевания стимулированная ХЛ становится даже ниже спонтанной - наступает фаза истощения. По мере выздоровления функциональный резерв нейтрофилов и коэффициент активации ХЛ восстанавливаются. Многие лекарственные препараты влияют на этот процесс как *in vitro*, так и *in vivo*, ускоряя или замедляя его.

Использование ХЛ методов исследования может служить экспресс-способом оценки функционального состояния клеток на различных этапах заболевания, оказать помощь при изучении механизма гуморально-клеточного действия иммуотропных препаратов и выборе адекватной терапии.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ РЕТИНОИДНОГО S-АНТИГЕНА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ

Хорошева Л.Р.¹, Суховая Д.А.¹, Гаврилова Т.В.¹, Сибиряк С.В.², Черешнев В.А.¹, Родионов С.Ю.¹

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия;

² Всероссийский центр глазной и пластической хирургии г. Уфа, Россия

S-антиген представляет собой водорастворимый белок с молекулярной массой 48-50 кДа, являющийся наиболее

увеитогенным из всех известных белков сетчатки, имеет высокую значимость в патогенезе самых разных офтальмологических заболеваний.

Создание технологии получения ретиноидного S-антигена высокой чистоты, достаточной для создания ИФА тест-систем, до сих пор является актуальной задачей, так как все предлагаемые ранее методы выделения и очистки отличались технологической сложностью, трудоемкостью и зачастую не обеспечивали необходимые чистоту и выход конечного продукта.

Для выделения S-антигена из сетчатки глаз крупного рогатого скота использовался метод трехстадийного осаждения раствором сульфата аммония насыщенным, рН=7,2 с последующей гель-фильтрацией на Sephacryl S-200, Pharmacia. В качестве рабочего буферного раствора применялся 0,05 М Трис-соляная кислота рН = 7,25.

Было установлено, что для выделения S-антигена необходимой чистоты достаточно одной стадии хроматографической очистки, в отличие от ранее предлагаемых методов, включающих несколько технологически сложных этапов, выполнение которых не обеспечивало достаточного выхода целевого продукта.

В таблице представлены основные результаты получения ретиноидного S-антигена.

В результате использования предлагаемого метода для получения S-антигена, чистота и выход целевого продукта превышают аналогичные показатели в предлагаемых ранее способах; кроме того, предлагаемый метод более доступен в аппаратном исполнении и технологически более прост.