

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

МОНОЦИТАРНЫЙ ХЕМОТАКСИЧЕСКИЙ БЕЛОК В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Азнабаева Л.Ф., Ганцева Х.Х., Афлятунова С.Ф.

Башкирский Государственный медицинский университет, Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова, г. Уфа, Башкортостан

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — заболевание, характеризующееся ограничением скорости воздушного потока, которое обратимо не полностью. Существенную роль в возникновении и прогрессировании обструктивной болезни легких играют клетки моноцитарно-макрофагального ряда. Миграция лейкоцитов в очаг воспаления осуществляется под действием хемотаксических цитокинов — хемокинов. Одним из основных хемокинов является моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1), который является мощным хемотаксическим и активирующим фактором моноцитов/макрофагов.

Целью исследования было определение роли MCP-1 в иммунопатогенезе ХОБЛ (при изолированных и сочетанных вариантах — с абсцессом или раком легких). Под наблюдением находилось 90 больных ХОБЛ, в том числе 30 — с изолированной формой ХОБЛ, 30 — в сочетании с абсцессом легкого и 30 — в сочетании с раком легкого (РЛ) в возрасте $51,1 \pm 4,8$ лет, мужского пола. Группой контроля выступали 21 практически здоровых лиц. Всем проводили исследование иммунограммы — определяли содержание основных популяций и субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитофлюориметрии, функциональные свойства лимфоцитов в РБТЛ с различными митогенами (фитогемагглютинин, конкавалин А, митоген лаконоса), количественные и функциональные показатели состояния макрофагально-фагоцитарного звена (фагоцитоз, НСТ-тест), IgG, IgA, IgM, IgE. Определяли уровень MCP-1, антитела острого периода к герпесвирусу (простого герпеса, цитомегаловирусу, вирусу Эпштейн-Барра) методом ИФА.

Результаты и обсуждение. Было установлено, что в иммунопатогенезе ХОБЛ ведущую роль играет формирование дисбаланса иммунного реагирования. Изолированный ХОБЛ сопровождался активацией I-ой линии защиты — в виде увеличения количества лейкоцитов, моноцитов, NK-клеток в периферической крови и концентрации иммуноглобулинов классов А и Е. Отмечалась незначительная активация Т-клеточного звена ($p > 0,05$).

Сочетание ХОБЛ с абсцессом легкого сопровождалось формированием иммунного ответа по двум путям (клеточного — в виде выраженного увеличения $CD3^+CD8^+$ до $37,20 \pm 3,53\%$ по сравнению с группой контроля —

$24,21 \pm 0,25\%$ ($p < 0,01$) и гуморального — повышался уровень IgG до $18,15 \pm 2,62$ г/л по сравнению с группой контроля — $12,50 \pm 0,68$ г/л ($p < 0,05$)). Одновременная активация по двум путям способствовала развитию несостоятельности иммунной системы.

ХОБЛ в сочетании с раком легкого также характеризовался активацией клеточного пути (увеличение $CD3^+CD8^+$ до $30,50 \pm 1,30\%$ по сравнению с группой контроля — $24,21 \pm 0,25\%$ ($p < 0,001$)) и угнетением фагоцитарного звена — снижение фагоцитарной активности нейтрофилов до $43,90 \pm 2,95\%$ по сравнению с группой контроля — $50,80 \pm 1,85\%$ ($p < 0,05$).

Общим для всех форм ХОБЛ являлось увеличение количества NK-клеток, основной функцией которых является поддержание гомеостаза и осуществление противовирусной защиты, в том числе сдерживание реактивации вирусов из семейства *Herpesviridae* (ЦМВ, ВПГ, ВЭБ). Оценка реактивации герпесвирусов путем изучения наличия антител острого периода у больных ХОБЛ показало высокую выявляемость реактивации — $58,0\%$ (у 52 из 90) по сравнению с группой контроля $14,3\%$ (у 3 из 21), $p < 0,002$. Наибольший процент выявляемости отмечался у больных ХОБЛ с сочетанными формами (абсцесс легкого — $66,7\%$, рак легкого — $66,7\%$). Полученные данные свидетельствовали о роли реактивации вирусов из семейства *Herpesviridae* в патогенезе ХОБЛ. Определение уровня одного из основных хемокинов для моноцитов — MCP-1 установило большой разброс показателей в группе больных ХОБЛ от 175 до 679 пг/мл, в группе контроля — 46–240 пг/мл. Сопоставление данных больных ХОБЛ в зависимости от сочетания с другой патологией с результатами в группе контроля показало значительное увеличение во всех исследуемых группах больных.

Наибольшие показатели содержания MCP-1 отмечались в группе ХОБЛ в сочетании с абсцессом легкого ($369,51 \pm 56,31$ по сравнению с $154,42 \pm 58,29$ пг/мл в группе контроля, $p < 0,05$). У больных ХОБЛ в сочетании с раком легкого наблюдались более низкие значения уровня MCP-1 ($298,27 \pm 16,13$ пг/мл) по сравнению с изолированной ХОБЛ ($339,75 \pm 46,45$ пг/мл) ($p > 0,05$), однако достоверно выше по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Следовательно, ХОБЛ сопровождался повышением уровня MCP-1, что согласуется с данными литературы.

Учитывая провоспалительный характер хемокинов, с целью определения роли MCP-1 в иммунопатогенезе ХОБЛ, был проведен анализ корреляционных взаимосвязей уровня MCP-1, показателей иммунограммы и реактивацией герпесвирусов (антитела острого периода). Оценка корреляционных связей показателей MCP-1 и данными иммунного реагирования у больных показала значимую роль MCP-1 в иммунопатогенезе ХОБЛ. Так, при изолированном ХОБЛ повышенный

уровень МСР-1 коррелировал с факторами врожденного и адаптивного иммунитета. Установлена прямая связь с уровнем лейкоцитов ($r = 0,51$) и моноцитов ($r = 0,63$). В то же время, были выявлены связи, характеризующие тесную взаимосвязь уровня хемокина с активностью Т-клеточного звена, NK-клеток и показателей гуморального звена (противовирусная защита). Отмечалась корреляция уровня МСР-1 с Т-лимфоцитами ($CD4^+$ ($r = 0,67$); $CD8^+$ ($r = 0,59$)); активированными Th⁺ ($CD4^+CD25^+$ ($r = 0,46$); $CD4^+HLADR^+$ ($r = 0,46$); $CD4^+CD95^+$ ($r = 0,49$); $CD4^+CD45RO^+$ ($r = 0,64$) и лимфоцитами с цитотоксическими свойствами — TNK ($r = 0,7$) и NK-клеток ($r = 0,44$). Полученные данные свидетельствуют о прямой связи МСР-1 с функциями противовирусной защиты. Полученные данные подтверждаются выявлением корреляции МСР-1 и наличием антител острого периода к ЦМВ (IgM, $r = 0,81$) и ВПГ (IgM, $r = 0,62$). Несмотря на отсутствие корреляции уровня МСР-1 с содержанием В-лимфоцитов ($CD19^+$), наблюдалась положительная корреляция с показателем, характеризующим активность В-клеточного звена — активационным маркером В-лимфоцитов ($CD23^+$) и антителами (IgM, IgE, ЦИК), в том числе специфичными — IgM против ЦМВ ($r = 0,81$) и IgM против ВПГ ($r = 0,62$). Следовательно, при изолированном ХОБЛ увеличение МСР-1, коррелирует с активацией противовирусной защиты к ЦМВ и ВПГ, что возможно и лежит в основе пускового механизма развития ХОБЛ. Сочетанный тип ХОБЛ с абсцессом легкого характеризовался корреляцией повышенного МСР-1 с показателями, характеризующими, прежде всего, противобактериальную защиту.

Сохранялись корреляционные связи МСР-1 с факторами врожденного иммунитета — способность нейтрофилов к фагоцитозу ($r = 0,59$), однако с уровнем моноцитов связи не было выявлено. С состоянием Т-клеточного звена — сохранялась корреляция лишь с показателями способности Т-лимфоцитов к пролиферации (РБТЛ). С данными В-клеточного звена была выявлена корреляция с уровнем IgG и ЦИК.

Следовательно, при сочетании ХОБЛ с гнойным процессом, высокий уровень МСР-1 характеризовал активность противобактериальной защиты.

Анализ корреляционных связей повышенного МСР-1 у больных ХОБЛ в сочетании с раком легкого не выявил значимых корреляционных связей с состоянием иммунной системы. Были установлены незначительной силы связи с показателями В-клеточного звена. Более того, отмечалась обратная (-) связь с данными врожденного иммунитета (уровнем зрелых нейтрофилов ($r = -0,39$)) и В-звена, а именно способностью к пролиферации ($-0,38$).

Следовательно, сочетание ХОБЛ с онкологическим процессом сопровождается разбалансировкой иммунного реагирования — повышенный уровень МСР-1 практически не коррелировал с данными активности иммунной системы.

Таким образом, МСР-1 при ХОБЛ выявляется в повышенных значениях и высокий уровень коррелировал с активностью иммунного реагирования либо противовирусной (при изолированном ХОБЛ), либо противобактериальной (при ХОБЛ в сочетании с абсцессом) защиты, что может быть расценено, с одной стороны, как маркер активации защитных сил иммунной системы, с другой — как возможный триггер запуска ХОБЛ. При сочетании ХОБЛ с онкологическим процессом повышенный

уровень МСР-1 не связан с защитными функциями иммунной системы и, возможно, участвует в проонкогенных процессах (что согласуется с данными исследования, посвященными изучению места МСР-1 при онкологических заболеваниях). Полученные данные свидетельствуют о роли МСР-1 в иммунопатогенезе ХОБЛ как белка острой фазы — свидетеля и участника иммунного ответа. Высокие значения в течение длительного времени, по-видимому, можно расценить как маркер напряженности иммунной системы.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИММУНОДИАГНОСТИКЕ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

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

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

Введение. Ревматические заболевания (РЗ) часто являются хроническими недугами, для которых характерны большое разнообразие форм и вариабельность темпов прогрессирования, что вызывает необходимость расширения круга иммунологических показателей. Для определения аутоантител используют самые различные подходы, но в настоящее время наиболее широко применяются иммуноферментный (ИФА) и иммунофлюоресцентный (ИФЛ) методы анализа. Расширение спектра изучаемых при РЗ аутоантител может быть достигнуто при переводе растворимых биополимеров (н., ферментов) в нерастворимую форму с сохранением их биологических свойств и возможностью дальнейшего использования в качестве антигенной матрицы в иммунологических методах диагностики.

Цель: изучение влияния метода эмульсионной полимеризации на растворимые биополимеры (ферменты) для использования их в качестве антигенной матрицы при создании антигенных наносистем (АНС).

Материалы и методы. В качестве антигенов использовали коммерческие препараты СОД (ЕС 1.15.1.1, производства «Sigma», США, Cat. № S 9636) и ГР (ЕС 1.6.4.2, «Sigma», США, Cat. № G 3664). АНС, представляющие собой двойные полиакриламидные микрогранулы размером 10–100 мкм с иммобилизованным в их структуре антигеном (фермент), получали методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота (Гонтарь И.П., 2002). Для исследования количества аутоантител к ферментам — супероксиддисмутазе (СОД) и глутатионредуктазе (ГР) в сыворотке крови больных РЗ использовали традиционный вариант ИФА, а также разработанный нами вариант ИФА с применением АНС.

Результаты. Проведенные исследования показали: 1) оптимальным носителем для используемых в качестве антигенной матрицы биополимеров с молекулярной массой не менее 30 Кд (СОД — 30–35 Кд, ГР — 50–55 Кд) является 20% полиакриламидный гель (ПААГ); 2) антигенную матрицу АНС целесообразно формировать, используя водные растворы антигенов (Ag) с оптимальной концентрацией СОД 16 мг/мл, для ГР — 14 мкг/мл; 3) изучение влияния времени хранения на АНС с белковой матрицей показало, что максимальное количество белка удаляется из гранул АНС на 2–3 суток хранения, а затем процесс резко замедляется. Общее количество Ag (на примере СОД) оставшееся в гранулах АНС после 6 суток хра-

нения составило 96,8%, после 30 суток — 96,8%; 4) потери иммобилизованного Ag из АНС изучали при температуре +4, 20 и 37°.

МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИЧЕСКОГО ИЗМЕНЕНИЯ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ *IN VITRO*

Борисов В.И., Королькова О.Ю., Кожевников В.С., Козлов В.А.

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

Введение. Представлен модифицированный метод измерения длины теломер с помощью гибридизации *in situ* и анализом на проточном цитофлуориметре (flow-FISH) для изучения длины теломер в клетках, совершивших известное количество раундов делений. Было проведено исследование изменения длины теломер в CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляциях лимфоцитов у 8 здоровых доноров при культивировании в течение 7 суток.

Материалы и методы. Т-лимфоциты активировались анти-CD3/IL-2. Измерение длины теломер проводилось с помощью метода flow-FISH до активации и после 7 дней культивирования. Количество делений определялось по количеству пиков на гистограмме CFSE витального красителя, в каждом из которых, методом гейтирования, определяли длину теломер через уровень флуоресценции теломерной PNA-пробы. Количество экспрессии белка hTERT субъединицы теломеразы определяли многоцветной проточной цитофлуориметрией.

Результаты. За 7 дней культивирования происходит резкое изменение соотношения по количеству CD4⁺ и CD8⁺ клеток: от 1,085 (до активации), до 0,545 (после). В обеих субпопуляциях клеток клетки прошли максимум 7 делений, но основная масса CD4⁺ клеток совершила только 3 деления, тогда как CD8⁺ клетки прошли 5 раундов делений, т.е. изменение соотношения происходит за счет более быстрой пролиферации CD8⁺ клеток. Измерение средней длины теломер показало, что в CD4⁺ клетках происходит слабое укорочение на 30 п.н., тогда как в CD8⁺ наоборот достоверное удлинение теломер, в среднем, на 380 п.н. ($p < 0,05$). Изучение динамического изменения теломер в зависимости от количества совершенных делений, показало, что в обеих субпопуляциях самые короткие теломеры находятся в клетках, совершивших только одно деление или не поделившиеся вовсе. В CD8⁺ клетках происходит наращивание теломер с пиком на 5 деления, а в CD4⁺ нет изменения длины от 3-го до 5-го деления, с последующим укорочением. До активации количество hTERT белка было одинаково низко в обеих субпопуляциях, а после активации уровень резко увеличился и в CD8⁺ клетках был значительно выше ($p < 0,05$), что объясняет возможную причину гетерогенности изменения теломер по субпопуляциям.

Заключение. Модифицированный метод flow-FISH позволяет одновременно определять пролиферативную активность субпопуляции клеток, выделенной по целевому антигену и измерять длину теломер в клетках, с известным количеством совершенных делений, выделяемых по пикам флуоресценции витального красителя CFSE. При использовании данного метода было показано серьезное различие по динамическому изменению длины теломер в субпопуляциях Т-клеток, что, вероятно,

происходит за счет различий в пролиферативном ответе и уровне экспрессии теломеразы.

ЗНАЧИМОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В КЛИНИКЕ ВНУТРЕННИХ БОЛЕЗНЕЙ

Борисов А.Г., Савченко А.А.

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск, Россия

В последние годы пришло понимание, что в диагностике иммунных расстройств должна базироваться, прежде всего, на общеклинических подходах. Но без проведения лабораторных исследований невозможно до конца охарактеризовать патогенез заболевания, определить уровень нарушений, назначить адекватную терапию. При всем том не все иммунологические показатели имеют одинаковую практическую значимость в диагностике различных заболеваний.

Целью исследования явилось изучение значимости лабораторных показателей в клинике внутренних болезней при стандартных иммунологических обследованиях.

Материалы и методы. Обследовано 3360 человек из них 1703 мужчины и 1657 женщин с различными заболеваниями внутренних органов. Заболевания сгруппированы по принципу единого патогенетического механизма развития патологии (аллергии, аутоиммунные заболевания, бактериальные, вирусные инфекции и онкологические болезни). Иммунологические исследования включали в себя определение общепринятыми методами числа лейкоцитов, лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16/56⁺, CD19⁺ клеток, концентрации иммуноглобулинов классов А, М и G, а также циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), осуществлялась оценка фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ).

Основные результаты. Группы обследованных отличались значительным разнообразием. Практически у всех пациентов выявлены отклонения различных иммунологических показателей. Повышение числа лейкоцитов чаще определялось у онкологических больных (в $30,15 \pm 1,66\%$ случаев). Также у онкологических больных чаще всего выявлялось повышение числа В-лимфоцитов ($44,78 \pm 2,37\%$), снижение числа NK-клеток ($27,21 \pm 1,94\%$). У больных с вирусными инфекциями чаще всего, по сравнению с другими группами больных, обнаружено снижение лейкоцитов ($25,37 \pm 1,57\%$) и В-лимфоцитов ($30,7 \pm 1,66\%$). Дополнительно установлено увеличение числа NK-клеток ($25,3 \pm 1,53\%$), иммуноглобулинов класса М ($26,46 \pm 1,45\%$) и G ($28,11 \pm 1,59\%$), повышение или снижение показателей фагоцитоза (у трети пациентов). При бактериальных инфекциях чаще выявлялось снижение числа NK-клеток ($26,68 \pm 1,87\%$), иммуноглобулинов всех классов (от 25 до 30% случаев). Для аутоиммунных заболеваний характерно высокие соотношения CD4⁺/CD8⁺ клеток ($24,07 \pm 1,34\%$), иммуноглобулинов G ($26,73 \pm 1,56\%$). При аллергических заболеваниях чаще всего обнаруживались высокие показатели числа лимфоцитов ($26,72 \pm 1,75\%$), CD4⁺ клеток ($29,03 \pm 2,10\%$), NK-клеток ($24,36 \pm 1,51\%$). У этих больных выявлялись самые низкие показатели концентрации иммуноглобулинов класса А ($28,50 \pm 1,76\%$). Необходимо отметить наибольшую информативность вычисляемых иммунологических показателей. Так наиболее выраженные изменения обнаружены по уровню относительного синтеза иммуноглобулинов. Только при перерасчете числа

CD8⁺ клеток ко всей популяции Т-лимфоцитов установлены значительные изменения при онкологических заболеваниях.

Заключение. На примере ряда групп заболеваний доказано, что величина и направленность изменений иммунологических показателей связана с патогенезом заболеваний.

МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КОНЬЮГИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ СПЕЦИФИЧНОСТИ ИММУНОАНАЛИЗА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Буркин М.А., Гальвидис И.А.

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

Специфичность, как основная характеристика иммуноанализа определяется способностью различать аналит среди близких структурных аналогов или метаболитов и оценивается по степени и спектру перекрестно-реагирующих субстанций. Нередко при экспертизе проб или скрининговых исследованиях по выявлению лекарственных препаратов, токсинов, гормонов или других физиологически активных низкомолекулярных соединений, использование тестов с групповой специфичностью, позволяющих идентифицировать сразу нескольких представителей из группы, экономически оправдано. В таких ситуациях необходимо располагать антителами, направленными к эпитопам общим для группы соединений и не затрагивающих их индивидуальные черты. На практике реализовать это требование весьма сложно в связи с тем, что введение иммуногена индуцирует в организме продукцию целого спектра антител, различающихся по эпитопной специфичности. Вероятность же селекции необходимого клонотипа с помощью гибридомной технологии чрезвычайно мала.

Цель настоящей работы — оценить эффективность подхода, позволяющего в условиях непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) видоизменять профиль перекрестных взаимодействий. Вследствие модификации структуры конъюгата белок-гаптен и ограничения спектра антител, взаимодействующих с таким (гетерологичным по отношению к иммуногену) иммобилизованным антигеном, происходило изменение результирующей специфичности анализа. Так, например, на основе поликлональных кроличьих антител к гликопептидному антибиотику эремомицину (ЭМ), конъюгированному при помощи глutarового альдегида с глюкозооксидазой ГО-ЭМ(га), и гомологичного конъюгата желатина-ЭМ(га) в качестве иммобилизованного антигена разработан ИФА, который позволял селективно выявлять ЭМ в водных растворах и плазме крови до 0,1 нг/мл. Перекрестное взаимодействие антител с ближайшим структурным аналогом ванкомицином (ВМ) составило всего 0,4% (Прикладная биохимия и микробиология, 2009). Гетерологичный твердофазный конъюгат (продукт карбодиимидной конденсации) желатина-ВМ(кди) при адсорбции на полистироле обеспечивал при сходной чувствительности анализа равноэффективное распознавание ЭМ и ВМ. Аналогичный эффект отмечен при иммуноанализе макролидных антибиотиков тилозина (ТИЛ) и тилмикозина (ТМН). Связывание анти-БСА-ТИЛ сыворотки с гомологичным конъюгатом желатина-ТИЛ могло наполовину подавляться (IC₅₀) 0,43 нг/мл ТИЛ.

Для ТМН этот показатель превышал 1000 нг/мл. Замена гаптена в твердофазном конъюгате на десмикозин, структурный аналог ТИЛ и ТМН способствовала групповому определению этих соединений с показателями IC₅₀, равными соответственно 0,9 и 0,87 нг/мл (Food Chemistry, 2011). Таким образом, на примере моделирования структуры конъюгатов антибактериальных соединений продемонстрирована возможность регуляции специфичности иммуноанализа низкомолекулярных соединений.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ К IL-1 НА СУБПОПУЛЯЦИЯХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК

Васильев Ф.Ф., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В.

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Введение. Интерлейкин-1 (IL-1) — цитокин с широким диапазоном биологических и физиологических эффектов. IL-1 входит в группу провоспалительных цитокинов и играет центральную роль в локальном и системном, остром и хроническом воспалении. Биологические эффекты IL-1 реализуются после связывания со специфическими мембраносвязанными рецепторами IL-1 I типа (IL-1PI). Рецептор IL-1 II типа (IL-1PII) не способен передавать сигналы, действуя как рецептор-«ловушка». Рецептор IL-1 I типа — гликопротеин с молекулярной массой 80 кДа, преимущественно экспрессируется на Т-лимфоцитах, эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках, эпителиальных клетках, гепатоцитах, фибробластах, кератиноцитах, эпидермальных и дендритных клетках. Рецептор IL-1 II типа — гликопротеин с молекулярной массой 60 кДа, экспрессируется на моноцитах, макрофагах, нейтрофилах и В-лимфоцитах. Ответ клеток иммунной системы на действие цитокинов возможен лишь при условии экспрессии на поверхности этих клеток соответствующих рецепторов и от уровня экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов IL-1 в значительной степени зависят биологические эффекты IL-1.

Цель. Целью настоящего исследования являлось изучение абсолютного уровня экспрессии рецепторов и относительного числа клеток несущих мембраносвязанные формы рецепторов IL-1, на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток условно-здоровых доноров.

Материал и методы. Материал для исследования — мононуклеарные клетки от 38 условно-здоровых доноров. Клетки, экспрессирующие рецепторы IL-1I и II типов, определялись методом проточной цитофлуориметрии с использованием PE-меченых антител (RnD systems). Для фенотипирования субпопуляций мононуклеаров использовались антитела фирмы eBioscience: anti-hCD14 PerCP-Cy5.5, anti-hCD3 APC и anti-hCD19 PE-Cy7. Для определения абсолютного количества рецепторов на клетку были использованы калибровочные частицы QuantiBRITE-PE (BD, USA). Мечение поверхностных антигенов проводилось по стандартной схеме, в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Основные результаты. В ходе проведенной работы установлено, что в субпопуляции моноцитов (CD14⁺) процент клеток, несущих рецепторы к IL-1 I и II типов составляет 63,6 и 7,05%, соответственно. Относительное число клеток, несущих данные рецепторы среди субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3⁺) составляет 10,85 и 2,83%, для рецепторов I и II соответственно. В субпопуляции В-лимфоцитов (CD19⁺) процент клеток, несущих ре-

цепторы к IL-1 I и II типов составляет 3,34 и 4,25%, соответственно. Абсолютное количество рецепторов к IL-1 I и II типов на моноцитах составило 1101 и 843,4, соответственно. Число рецепторов на клетку в субпопуляции Т-лимфоцитов составило 1130,8 и 547,9 для рецепторов к IL-1 I и II типов соответственно. Наибольшее количество рецепторов к IL-1 I типа выявлено в субпопуляции В-лимфоцитов и составило 1254,8 на клетку. Количество рецепторов IL-1 II типа на В-лимфоцитах составило 1071,15.

Заключение. Таким образом, получены данные о различиях не только в процентном отношении клеток, несущих данные рецепторы, но и в уровне экспрессии данных молекул, что позволяет оценить вклад медиаторов в регуляцию различных субпопуляций МНК, а также разработать в будущем нормативные критерии для использования в клинических исследованиях

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ СЕКРЕТОРНОГО IgA В КОПРОФИЛЬТРАТАХ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ И У БОЛЬНЫХ С АТОПИЧЕСКИМИ ДЕРМАТИТАМИ

Гладкова С.Е.¹, Ливичкая Н.И.¹, Белых О.А.², Герасимова Н.А.²

¹ ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

² Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии Минздрава России (УрНИИ ДВиИ), г. Екатеринбург, Россия

Основную роль в иммунной защите слизистых оболочек играет секреторный иммуноглобулин А (sIgA), представляющий собой димерный IgA с ковалентно присоединенным внеклеточным участком рецептора полимерных иммуноглобулинов (pIgR). Доказано, что секреторный компонент присутствует как в составе sIgA, так и в свободном виде и может функционировать как фактор неспецифического иммунитета (Phalipon A., 2003), связывая токсины некоторых бактерий или нейтрализуя фибриновые факторы колонизации простейших.

Уменьшение количества sIgA в различных биологических жидкостях носит характер преходящего вторичного иммунодефицита, который исчезает по мере адекватного лечения причин заболевания и восстановления слизистых. Это объясняет интерес исследователей к определению sIgA именно в физиологических секретах (слезы, слюна, бронхо-альвеолярный лаваж, секрет цервикального канала). Исследования копрофильтратов, представленные в отечественной литературе посвящены проблемам дисбактериозов и занимают, в основном, инфекционистов, а не иммунологов, хотя рециркуляция лимфоцитов — важнейшее свойство системы местного иммунитета кишечника. Сенсибилизированные антигенами (пищевыми или инфекционными) лимфоциты пейеровых бляшек кишечника мигрируют в брызжеечные лимфоузлы, оттуда через лимфотические протоки и систему кровообращения к собственному слою слизистой оболочки кишечника, главным образом в качестве клеток, секретирующих IgA. Благодаря присутствию нормофлоры sIgA эффективнее удерживается в зоне эпителия и, взаимодействуя с гликокаликсом, играет роль «главного чистильщика» и иммуномодулятора слизистой ЖКТ. Микробиологический дисбаланс нормофлоры влечет за собой де-

фицит sIgA, в результате чего повышается колонизация слизистой оболочки условно-патогенной или патогенной флорой, круг замыкается.

Цель исследования. Анализ содержания sIgA в копрофильтратах детей с острой кишечной инфекцией (ОКИ), а также у детей и взрослых с atopическими дерматитами.

Материалы и методы. sIgA определяли методом твердофазного ИФА при помощи набора реагентов «IgАсекреторный—ИФА—Бест» в копрофильтратах от:

1. детей 1 мес-4 лет из инфекционного отделения детской клинической больницы № 3 г. Новосибирска, с острыми кишечными инфекциями (n = 481);

2. детей 1-14 лет с обострением atopического дерматита из дерматологической клиники УрНИИ ДВиИ г. Екатеринбурга (n = 34);

3. подростков (15-17) и взрослых (18-63) лет с обострением atopического дерматита из дерматологической клиники УрНИИ ДВиИ г. Екатеринбурга (n = 64).

Контрольные детская и взрослая группы включали в себя копрофильтраты от здоровых на текущий момент детей и взрослых без диагнозов ОКИ и atopического дерматита. В копрофильтратах детей первой группы методом ИФА определяли антигены к адено- и ротавирусам при помощи наборов реагентов «Аденовирус—антиген—ИФА—Бест» и «Ротавирус—антиген—ИФА—Бест». В сыворотках второй и третьей группы определяли специфические антитела к антигенам описторхов и лямблий при помощи наборов реагентов «Описторх—IgG—ИФА—Бест» и «Лямблия—антигены—IgA—Бест». Методика приготовления копрофильтрата описана в инструкции для набора реагентов «IgАсекреторный—ИФА—Бест». Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Microsoft Excel. Рассчитывали показатели подраздела «Описательная статистика», «Анализ данных», для сравнения средних величин и оценки степени достоверности различий между выборками — критерий Стьюдента и χ^2 . Достоверность полученных данных оценивали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения. В копрофильтратах детей с ОКИ были выявлены антигены ротавирусов (в 49,8% образцов) и аденовирусов (3,7%). В этой выборке, больше чем в половине случаев, причиной тяжелых состояний детей была вирусная инфекция, другая половина тяжелых состояний (упорная диспепсия, рвота и т.д.), обеспечивалась бактериальной условно-патогенной или патогенной флорой, и/или пищевыми отравлениями. У 39 человек (8%) количество sIgA было очень низким (от 0 до 10 мг/л), в копрофильтратах от 217 детей (45%) sIgA определялся в интервале 10-30 мг/л, что достоверно ниже по сравнению с контролем. Значения sIgA в копрофильтратах (sIgАк) здоровых детей до 4 лет (n = 8) составляло от 75,7 до 184,3 мг/л. Низкие значения kSIgA обнаруживались как в образцах содержащих вирусные антигены, так и в анализах отрицательных по антигенам адено- и ротавирусов. Не удалось найти прямой корреляционной зависимости между обнаружением этих видов вирусной инфекции и низким количеством sIgАк, большая часть копрофильтратов содержащих вирусные антигены (82,1%) имела нормальные или повышенные количества sIgA, что позволяет предполагать нормальную работу муккозального иммунитета у этих детей.

Другой выборкой интересной для нас оказалась группа больных с atopическими дерматитами (АД), которые часто связывают с пищевыми аллергенами и нарушением всасывания на слизистой кишечника. Паразитарные

инвазии способствуют угнетению местного иммунитета слизистых ЖКТ, поэтому вначале исследуемых больных с АД проанализировали на наличие в их сыворотках антител специфических к антигенам имеющих широкое распространение описторхов и лямблий. В копрофильтратах от этих же больных исследовали количественное содержание sIgA. В «детской» группе антипаразитарные антитела (IgG, IgM и ЦИК) выявили в 23,5% сывороток (у 8 человек), во «взрослой» в 25% (у 16 человек). У четверых детей из восьми с сывороточными АТ к описторхам и/или лямблиям в копрофильтратах был низкий sIgA (1-21 мг/л), у других 4-х пациентов он был от 87 до 424 мг/л. Из 16 взрослых с дерматитами и сывороточными АТ к описторхам или лямблиям низкий к sIgA (0-25 мг/л) был только у 4 больных (25%), у оставшихся 12 пациентов sIgA был от 80 до 300 мг/л. На наш взгляд, именно больные с низким содержанием sIgA, при наличии паразитарной инфекции, нуждаются в срочном восстановлении иммунной системы слизистой кишечника, что поможет снизить клинические симптомы АД.

По результатам ИФА достоверно низкое содержание sIgA в копрофильтратах детей и взрослых страдающих дерматитами наблюдалось в 30% и 32% образцов соответственно. В этих анализах, не зависимо от наличия либо отсутствия антител к описторхам или лямблиям количество sIgA определялось в интервале 0-30 мг/л (у детей) и 0-25 мг/л (у взрослых). За «нормальные» значения sIgA у детей в возрасте 1-14 лет принимали интервал 75-176,4 мг/л ($n = 11$), который обнаружили копрофильтраты условно здоровых детей указанного возраста без диагноза атопический дерматит. В копрофильтратах здоровых взрослых (18-61 год) количество sIgA находилось в диапазоне 64,3-150,3 мг/л ($n = 14$).

Заключение. 1. Применение рутинного ИФ-метода определения sIgA в копрофильтратах дает возможность оценивать состояние гуморального иммунитета слизистой кишечника при ОКИ или АД независимо от причин этих патологий с последующей коррекцией иммунодефицитных состояний. 2. «Неинвазивность» способа забора анализа особенно привлекательна для оценки количества sIgA у маленьких пациентов (1 мес — 4 года).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Зубков А.В., Яковлева И.В., Кузнецова Г.И., Кириллова Г.А., Шамкина Е.В., Гаврилова Н.Ф., Свиридов В.В., Кузьмина Н.С.

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

Введение. Пероксидаза щитовидной железы (ТПО) является основным ферментом, участвующим в биосинтезе гормонов щитовидной железы (ЩЖ), и ведущим антигеном при аутоиммунных заболеваниях ЩЖ. Антитела к ТПО являются маркером аутоиммунных заболеваний ЩЖ, тем не менее, их роль в аутоиммунных процессах до конца не определена. Современные исследования сосредоточены на определении эпитопов молекулы ТПО, с которыми взаимодействуют тиреоид-специфические Т-клетки и тиреоидные аутоантитела. Однако изучение

ТПО связано с определенными трудностями, и, прежде всего, с получением исходного природного антигена.

Целью работы являлось создание высокочувствительного теста для определения пероксидазы щитовидной железы на основе моноклональных антител и его применение для контроля и совершенствования процесса выделения ТПО.

Материалы и методы. В работе использовали ранее полученную коллекцию из 36 гибридом-продуцентов моноклональных антител (МкАт) к пероксидазе щитовидной железы человека. ТПО выделяли методом аффинной хроматографии с использованием МкАт. Конъюгаты МкАт с пероксидазой из корня хрена готовились по методу Nakane et al., 1975. Эпитопную специфичность МкАт изучали в конкурентном ИФА с использованием конъюгатов МкАт с пероксидазой из корня хрена (ПХ) на планшетах, сенсibilизированных нативной, денатурированной ТПО, химерными белками, клонированными в *E. coli*, и рекомбинантной ТПО человека, экспрессированной в клетках насекомых Sf9 (EUROIMMUN AG, Германия). Перекрестно-реагирующими считали МкАт, вызывающие более 20% подавления связывания при условии дозозависимого характера этого взаимодействия. Константы комплексообразования для моноклональных антител рассчитывали по методу Friguet et al., 1985.

Результаты. Все МкАт взаимодействовали с нативной и рекомбинантной ТПО человека, из них пять (№ 1, 70, 76, 82 и 88) реагировали как с нативным, так и с денатурированным антигеном, что указывало на взаимодействие с линейными участками молекулы ТПО. С помощью МкАт, направленных к различным эпитопам ТПО, в молекуле определяется 5 групп антигенных детерминант (доменов).

Для создания высокочувствительного иммуноферментного теста для определения антигена было отобрано 8 вариантов МкАт (1, 70, 76, 82, 88, 2, 77, 55), направленных к различным эпитопам молекулы ТПО. Анализ всех возможных комбинаций МкАт для адсорбции на твердой фазе и в виде конъюгатов в двух вариантах ИФА (одностадийном и двухстадийном) позволил определить лучшие варианты пары антител для «сэндвич» — ИФА (МкАт 82–88-ПХ; МкАт 8255-ПХ; МкАт 55–88-ПХ и МкАт 88–55-ПХ). Максимальная чувствительность метода (20 ± 5 нг/мл) достигалась при использовании пары МкАт 82–88-ПХ в двухстадийном варианте «сэндвич»-ИФА. Отобранные МкАт были направлены к эпитопам составляющим различные домены на молекуле ТПО и обладали высокими значениями константы комплексообразования: K^a для МкАт 82 составляла $(2,1 \pm 1,1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, для МкАт 88 — $(0,39 \pm 0,20) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Линейный диапазон определяемых концентраций ТПО составлял 20–1000 нг/мл, коэффициент вариации не превышал 8%, а общее время проведения анализа равнялось 1,5 ч.

Применение разработанного метода позволило установить оптимальные параметры исходного сырья (концентрация ТПО в гомогенате щитовидной железы) для выделения ТПО. При этом ключевым этапом технологии является процесс солиubilизации микросом тиреоцитов.

Заключение. Разработанный высокочувствительный иммуноферментный метод количественного определения пероксидазы щитовидной железы пригоден для контроля процесса выделения ТПО как из ткани щитовидной железы, так и из продуцентов рекомбинантного антигена.

КОЛЕБАНИЯ УРОВНЯ УРОМОДУЛИНА (УМ) В МОЧЕ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ**Крутецкая И.Ю., Климович В.Б.***ФГУ РНЦ радиологии и хирургических технологий,
Санкт-Петербург, Россия*

Уромодулин (белок Тамма–Хорсфолла) составляет преобладающую фракцию белка в нормальной моче. Он является специфическим почечным антигеном и относится к семейству консервативных, склонных к полимеризации белков, содержащих домен ZP (*zona Pellucida*). Экспрессируется УМ на мембранах эпителиальных клеток, выстилающих толстый восходящий участок петли Генле. В результате протеолиза белок переходит в растворимую форму и выводится с мочой в количестве около 50 мг в сутки (Devust, Serafini-Cessi). Нанogramмовые количества УМ выявлены в сыворотке крови здоровых людей. Причины появления УМ в крови обсуждаются. Уромодулин относят к секреторным ингибиторам бактериальной адгезии, защищающим мочевой тракт от инфекций. У мышей с выключенным UMOD-геном снижена устойчивость к восходящим инфекциям мочевых путей.

Физиологическая роль взаимодействия УМ с компонентами иммунной системы до сих пор не выяснена. *In vitro* показано, что УМ может выступать в качестве активатора механизмов врожденного иммунитета при воспалительных процессах в урогенитальном тракте. Он индуцирует созревание дендритных клеток, активирует продукцию IL-8 и других провоспалительных цитокинов, способствует вовлечению нейтрофилов. Кроме того, УМ с высоким аффинитетом связывает компоненты комплекса C1, C1q и C3, ряд цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-8), IgG и легкие цепи Ig (Saemann). Выявлена положительная корреляция между повышенным содержанием УМ и концентрацией провоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Снижение уровня УМ в моче показано при ряде почечных патологий (семейная ювенильная нефропатия, мочекаменная болезнь, миеломная почка, диабетическая нефропатия и др.). Одновременное определение уровня УМ в крови и в моче может служить критерием оценки степени воспалительного процесса и повреждения почки [Prajczek]. Для проведения таких исследований необходимы высокочувствительные и точные тест-системы.

Ранее нами были получены и описаны моноклональные антитела против УМ. На их основе разработан тест для определения количества УМ в моче. Характеристику теста по метрологическим параметрам проводили согласно рекомендациям ВОЗ для иммуноферментных тест-систем. Коэффициент вариации (CV) результатов измерения концентрации УМ не превышает 8%. Минимальная граница определения УМ составляет 30 нг/мл. Зависимость концентрации УМ в моче имеет линейный характер в диапазоне концентраций 40–5000 нг/мл (+10%). Показатель теста на «открытие» составляет 90,5%.

С помощью данной тест-системы определяли уровень УМ в суточной моче 25 доноров без почечной патологии. Во всех образцах уровень креатинина находился в пределах нормы (от 4,4 до 17,6 ммоль/24 ч). Границы нормальных значений УМ составили от 20,4 до 95 мкг/мл. От 6-ти доноров моча была собрана порционно в течение суток. УМ и креатинин определяли в каждой порции и оценивали суточные колебания УМ в моче здоровых людей. Уровень УМ в течение суток изменялся индивидуально, в широком диапазоне, в пределах установленных границ

нормы. Аналогичные колебания уровня УМ были выявлены в суточной моче 3-х доноров, собранной в разные дни. Выделение УМ не зависело от уровня креатинина и объема мочи.

Для определения УМ в сыворотке крови необходимо разработать тест с чувствительностью не менее 0,5–1,0 нг/мл.

КИНЕТИКА ОБРАЗОВАНИЯ КРИОГЛОБУЛИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ**Куликова И.Ю., Константинова Н.А., Курек А.К.***ГОУ ВПО РГМУ Росздрава им. Н.И. Пирогова, Москва,
Россия*

Введение. Криоглобулинемия (КГМ) сопровождается заболеваниями самой разной этиологии: лимфопролиферативной, аутоиммунной, вирусной. Несмотря на широкий интерес к этой проблеме, патогенез КГМ, функциональная роль и значимость криоглобулинов (КГ) в регуляторной системе, в том числе иммунной, остается не выясненной.

Цель и задачи: изучение особенностей кинетики образования и разрушения криоглобулиновых комплексов (КП), выделенных из сыворотки больных с различными типами КГМ.

Материалы и методы. Выделение криоглобулинов (КГ) из сыворотки крови проводилось методом А.Е. Kalovidoris в модификации. Процесс комплексообразования при различных температурах оценивался спектрофотометрически (Cary, США) при длине волны 500 нм. Проводилось последовательное многократное циклическое нагревание до 37 °С и охлаждение до 4 °С по стандартной методике. Время выдерживания раствора КГ при заданной температуре было постоянным. Разделение по типу КГ осуществлялось с использованием твердофазного иммунноанализа. Исследовались КГ, выделенные из сыворотки крови больных множественной миеломой (I тип), системной красной волчанкой (СКВ) (II тип), хроническим гломерулонефритом (ХГН) (III тип).

Основные результаты. У всех исследуемых больных определен повышенный уровень КГ в сыворотке крови, при этом концентрация КГ варьировала от 80 до 1500 мкг/мл и зависела от типа и стадии заболевания.

Температурные кривые образования КП сходны по виду для всех типов исследуемых КГ (образование и разрушение КП происходило по несовпадающим кривым). Полученные кривые отличаются по скорости формирования КП. Повторное охлаждение – нагревание вызывало образование гистерезисных петель. Гистерезисные кривые отличались для разных типов исследуемых заболеваний. КГ, выделенные у больных с СКВ при многократном циклическом воздействии температуры (трехкратном) теряли способность формировать КП. КГ, выделенные у больных с множественной миеломой, при однократных температурных воздействиях не теряли способности к образованию КП. КГ при хроническом гломерулонефрите представляли в данном отношении очень гетерогенную группу. Кроме того, были рассчитаны энергии активации процесса КП для всех типов КГ.

Заключение. Низкие значения энергии активации и концентрации КГ в крови при тяжелых формах заболевания указывают на участие в КП Ван-дер-Ваальсовых сил в формировании иммунных комплексов и на нестабильность КК. Энергия активации КП не связана со степенью тяжести заболевания. Наблюдаемый гистерезисный характер связи между исследуемыми параметрами указывает на наличие пространственно-временных

переходных процессов при формировании КП. Характер кривых неоднозначный, что говорит о гетерогенности свойств криобелков. Количество КП зависело от направления нагрев-охлаждение или наоборот охлаждение-нагрев. Исследование механизма КП в зависимости от циклического изменения температуры может оказаться полезным для понимания патогенеза холодовой крапивницы и заболеваний, с аутоиммунным компонентом.

СТИМУЛЯЦИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В КУЛЬТУРЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ТРАНСФЕЦИРОВАННЫХ ПОЛИЭПИТОПНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ HER2/ERBB2

Лопатникова Ю.А., Курилин В.В., Гаврилова Е.В.¹, Максютков Р.А.¹, Зайцев С.А.¹, Максютков А.З.¹, Сенников С.В.

НИИ Клинической иммунологии СО РАМН,
г. Новосибирск, Россия

¹ ООО «АваксисБио», г. Новосибирск, Россия

В настоящее время ведется активный поиск опухоле-специфических антигенов для создания таргетной терапии злокачественных новообразований. Полиэпитопные генетические конструкции на основе белка HER2, содержащие последовательность, кодирующую как отдельные эпитопы специфического белка, так и весь белок, были использованы в работе для проведения высокоэффективной магнитной трансфекции зрелых дендритных клеток.

Цель: оценить цитотоксический потенциал мононуклеарных клеток (МНК) после сокультивирования с аутологичными дендритными клетками, трансфицированными ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими полиэпитопные иммуногены, содержащие антигенные детерминанты, специфичные белку HER2.

Материалы и методы. Дендритные клетки (ДК) получали из прилипающей фракции МНК периферической крови условно-здоровых доноров, несущих по результатам генотипирования аллель HLA-A*02. Процедура магнитной трансфекции осуществлялась на стадии зрелых ДК с помощью реактивов фирмы Promokine, и плазмидных конструкций: универсальная конструкция, содержащая эпитопы для 35 аллельных вариантов молекул МНС класса I человека, аллелеспецифическая полиэпитопная конструкция для гаплотипа HLA-A*0201 и конструкция несущая целый белок HER2. Совместное культивирование МНК и ДК в соотношении 10:1, проводилось в течение 48 часов. Определение числа перфорин-позитивных клеток проводилась методом проточной цитометрии, а анализ на лактатдегидрогеназу (ЛДГ) набором фирмы Promega.

Результаты. При оценке количества перфорин-позитивных клеток в культуре МНК + ДК была показана достоверная стимуляция при трансфекции универсальной плазмидой, специфичной для HLA-A*0201 и плазмидой несущей полноразмерный ген HER2. При оценке ЛДГ после сокультивирования с опухолевой линией MCF-7, несущей HLA-A*0201, обнаружено, что группы с трансфекцией универсальной плазмидой и плазмидой, специфичной к HLA-A*0201, имеют достоверно больший цитотоксический индекс по сравнению с группами контроля и группой с трансфекцией плазмидой, несущей ген HER2.

Таким образом, показана эффективность стимуляции специфического цитотоксического иммунного от-

вета в культуре МНК с помощью дендритных клеток, трансфицированных целевыми генетическими конструкциями, кодирующими универсальный и специфичный для гаплотипа HLA-A*0201 полиэпитопные иммуногены, содержащие антигенные детерминанты, специфичные белку HER2.

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТА НА СВЯЗЫВАНИЕ ЭОЗИН-5 МАЛЕИМИДА В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО СФЕРОЦИТОЗА

Прохорова Ю.А., Соколова Н.Е., Зуева Е.Е.

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

Наследственный сфероцитоз (НС) – врожденная гемолитическая анемия, обусловленная снижением содержания белков мембраны эритроцитов в связи с мутациями в гене, кодирующем мембранный протеин анкирин-1, реже – структурными изменениями альфа-спектрина, бета-спектрина, белка полосы 3.

Традиционные методы диагностики мембранопатий эритроцитов – оценка осмотической хрупкости и определение в мазке крови морфологически различных типов эритроцитов. С помощью пробы на осмотическую хрупкость невозможно выявить атипичный сфероцитоз, результаты пробы могут быть ложно-положительными у беременных, при патологии почек и т.д. У детей первого года жизни диагностика наследственного сфероцитоза затруднена в силу возрастных особенностей морфологии эритроцитов (макроцитоз). Генетический анализ как диагностическое исследование нецелесообразно, поскольку мутации, определяющие заболевание, уникальны.

Проточная цитометрия для оценки характеристик эритроцитов применяется с 2000 года, подтверждена исследователями Великобритании, Италии и Южной Кореи (метод окрашивания эритроцитов эозин-5 малеимидом, или э5м). Для переноса метода связывания э5м в клиническую практику проведено совместное пилотное исследование вместе с отделением общей гематологии Детской Городской Больницы № 1 г. Санкт-Петербурга. В исследование включены данные по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) э5м эритроцитов пациентов с верифицированным диагнозом наследственного сфероцитоза (9 детей в возрасте от 4 месяцев до 12 лет, в том числе 4 детей первого года жизни, и 1 взрослый с проведенной спленэктомией). Для каждого пациента СИФ э5м была сопоставлена со средней СИФ шести человек с доказанным отсутствием гематологических заболеваний (группы сопоставления). В качестве группы сопоставления была оценена СИФ э5м эритроцитов 54 взрослых (возраст 21-74 года) и, учитывая особенности эритропоэза детского возраста, 6 детей в возрасте от 3 месяцев до 17 лет.

СИФ э5м эритроцитов детей с наследственным сфероцитозом составила 19-22,7 усл. ед., для пациента с проведенной спленэктомией – 25 усл.ед. Для группы сопоставления взрослого возраста СИФ э5м составила 27-34 усл.ед. (среднее – 31,1); для группы сопоставления детского возраста СИФ – 27-35 усл. ед. (среднее – 30,4). Различия групп сопоставления детского и взрослого возраста по СИФ э5м не выявлено (критерий Манна-Уитни). Различия СИФ э5м больных сфероцитозом и пациентов обеих групп сопоставления достоверны.

Апробированный метод оценки состоятельности структурных белков мембраны эритроцитов высоко чувствителен и может быть использован для верификации наследственного сфероцитоза.

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ОРГАНИЗАЦИЮ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ: ПРЕДПОСЫЛКИ И СЛЕДСТВИЯ ФОРМИРОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КЛАСТЕРОВ

Сарап П.В.¹, Винник Ю.С.², Останин А.А.³

¹ МБУЗ «ГКБ № 6 им. Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

² Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, Россия

³ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Изучению состояния иммунной системы у пациентов с urgentной хирургической патологией уделяется достаточно много внимания, поскольку оно связано с активностью воспалительного процесса, глубиной стресса и во многом определяет характер течения послеоперационного периода, исход заболевания и сроки выздоровления. Современные методы системного анализа позволяют с новых позиций рассмотреть организацию иммунной системы. Формирование взаимосвязей внутри систем происходит при участии внешних факторов. Для компенсации влияний извне элементы системы стремятся приобрести оптимальные характеристики. За счет этого массив изучаемых данных становится неоднородным: в областях с оптимальными характеристиками появляются сгущения данных – кластеры, состоящие из элементов системы с относительно сходными характеристиками. Центр кластера соответствует оптимальным характеристикам для компенсации внешних влияний, а функциональное состояние элементов внутри кластера связано с величиной дистанции их показателей от центра кластера (ДК).

Цель. Выделить кластеры организации иммунного ответа и оценить взаимосвязь между тяжестью состояния и ДК у пациентов с urgentной хирургической патологией.

Материал и методы. Обследованы 442 пациента с экстренной патологией органов брюшной полости, требовавшей экстренного оперативного лечения. Использованы 949 результатов исследования иммунного статуса, интоксикации, вегетативной регуляции, шкал балльной оценки тяжести состояния с помощью шкал Apache II, SAPS II, SOFA, MODS. Выбор информативных показателей осуществляли методами факторного анализа. Учитывали число лейкоцитов, абсолютные количества (abs) CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD16⁺н, CD20⁺,

CD25⁺, CD38⁺, CD95⁺, число фагоцитирующих нейтрофилов, уровни IgG, IgA, IgM, ЦИК. Наиболее информативными для кластеризации признаны показатели, ассоциированные с действием основного фактора организации показателей иммунной системы: abs CD3⁺, abs CD4⁺, abs CD8⁺, abs CD16⁺. С учетом величин Евклидовых расстояний между среднегрупповыми величинами были выделены 6 кластеров – вариантов организации иммунной системы. Рассчитывали коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r_s) между показателями состояния пациентов и ДК.

Результаты. Для большинства кластеров отмечены положительные значения r_s между показателями шкал тяжести состояния и ДК (табл.). Информативность шкал тяжести состояния сохраняется как для каждого кластера, так и в общем массиве изучаемых данных, что не противоречит традиционным подходам к статобработке. С увеличением ДК возрастает функциональная нагрузка на компоненты иммунной системы; количество достоверных корреляционных связей на периферии кластеров выше, чем в центрах, что согласуется с теоретическими предпосылками самоорганизации сложных биологических систем.

Заключение. Структура кластеров характеризуется нарастанием тяжести состояния пациентов с увеличением дистанции от центра кластера. Результаты исследования открывают перспективы в разработке новых интегральных методов оценки тяжести состояния пациентов, прогноза течения и исхода заболеваний, выбора наиболее эффективной тактики комплексного лечения.

СИСТЕМНАЯ ПРОДУКЦИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ (VEGF, fIGF-I) И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ТЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ДЕТЕЙ С РУБЦОВОЙ СТАДИЕЙ РЕТИНОПАТИИ НЕДОНОШЕННЫХ

Слепова О.С., Катаргина Л.А., Гвоздюк Н.А., Белова М.В.

ФГУ «МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, Москва, Россия

Актуальность. В последнее десятилетие в литературе накопился материал, свидетельствующий о том, что в патогенезе ретинопатии недоношенных (РН) важную роль играет локальное и системное (на уровнях глаза и всего организма) нарушение баланса ростовых факторов, определяющих эмбриональный васкулогенез сетчатки: VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) и IGF-I (инсулиноподобный фактор роста).

Цель работы: изучение роли системной продукции fIGF-I и VEGF после «критического» для РН срока (примерно к 6 месяцам после рождения), когда клиниче-

ТАБЛИЦА. ВЗАИМОСВЯЗЬ ДИСТАНЦИИ ОТ ЦЕНТРА КЛАСТЕРА И ТЯЖЕСТИ СОСТОЯНИЯ ПАЦИЕНТОВ (r_s) (К ТЕЗИСАМ САРАПА П.В. И ДР.)

Показатель	Кластер 1, n = 15	Кластер 2, n = 71	Кластер 3, n = 166	Кластер 4, n = 241	Кластер 5, n = 253	Кластер 6, n = 203
Apache II	0,50*	0,48***	0,32***	0,26***	0,04	-0,03
SOFA	0,44*	0,51***	0,26***	0,25***	0,13*	-0,06
SAPS II	0,35	0,63***	0,32***	0,24***	-0,05	0,03
MODS	0,45*	0,52***	0,30***	0,26***	0,09	-0,08

Примечание. Интервалы значений r обозначены: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

ская картина заболевания практически сформировалась и процесс перешел в рубцовую стадию.

Материалы и методы. Клинико-иммунологическое исследование проведено у 35 детей разного возраста (от 4 мес. до 13 лет; большинство — от 7 мес. до 2,5 лет, 23 чел., 67,7%) с рубцовой стадией РН разной (1-5) степени. 13 детей были обследованы после хирургических вмешательств на глазах, в том числе повторных (10 чел.); из них 6 чел. через 2-6 мес. после операции, 7 чел. в отдаленные сроки. Изучалось содержание в сыворотке крови (СК) фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и, впервые, свободной (биологически активной) фракции инсулиноподобного фактора роста IGF-I (*f* IGF-I). Ретроспективный анализ полученных данных осуществлялся в зависимости от степени и симметричности РН, наличия осложнений и сопутствующей патологии, давности хирургического вмешательства, возраста ребенка, а также гестационного возраста (от 24 до 34 недель) и веса тела при рождении (700-1960 грамм).

Результаты. Показано, что рубцовая стадия РН характеризуется широким диапазоном уровней VEGF (38-700 пг/мл) и, особенно, *f* IGF-I (< 15-1070 пг/мл) в СК. Установлено, что системная продукция обоих медиаторов закономерна и не являетсяотягощающим фактором, но только до тех пор, пока уровни их в СК не превысят определенного предела. Критерии такого повышения были определены по результатам ретроспективного клинико-иммунологического анализа. Выявлена зависимость от возраста детей достоверная связь между «гиперпродукцией» *f* IGF-I (≥ 300 пг/мл; $p = 0,002$) и/или VEGF (≥ 250 пг/мл; $p = 0,007$) и отягощенным течением заболевания (тяжелые двусторонние процессы; осложнения РН, характеризующиеся неоваскуляризацией и фиброваскулярной пролиферацией; сопутствующая офтальмопатология). Показано, что неоднократные хирургические вмешательства на глазах могут сопровождаться нежелательным повышением уровней *f* IGF-I ($p = 0,007$) и VEGF ($p = 0,023$) в СК.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что системный дисбаланс IGF-I и VEGF, патогенетическое значение которого в развитии РН у новорожденных, исходя из литературных данных, сомнения не вызывает, может иметь место и при переходе активной стадии заболевания в рубцовую стадию. При этом неблагоприятным показателем, ассоциирующимся с формированием тяжелых осложнений РН является повышение в СК уровня обоих или хотя бы одного из этих ростовых факторов: биологически активной фракции *f* IGF-I и/или VEGF. Это определяет актуальность дальнейших исследований по коррекции не только местной гиперсекреции VEGF, эффективность которой при активной РН обсуждается многими авторами, но и системной гиперпродукции обоих ростовых факторов, в частности у детей с рубцовой стадией РН. Необходимо подчеркнуть, что возможность ориентироваться по сывороточным уровням ростовых факторов имеет важное практическое значение в связи с трудностями забора внутриглазных жидкостей для лабораторных исследований.

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Смирнова Н.И.¹, Бызова Н.А.¹, Жердев А.В.¹, Кравченко И.В.¹, Фуралев В.А.¹, Лисовская С.Б.², Изотов Б.Н.², Дзантиев Б.Б.¹

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

² Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Благодаря высокой специфичности иммунного распознавания иммунохимические методы анализа играют ключевую роль в современной системе выявления случаев немедицинского употребления психоактивных веществ (ПАВ). Целью выполненного исследования было формирование отечественной реагентной базы для иммунодетекции ПАВ основных классов и разработка на ее основе ускоренных методов иммуноферментного определения ПАВ.

Получены препараты антител к ПАВ пяти основных классов: моноклональные антитела к морфину, тетрагидроканнабиноловой кислоте, метамфетамину и бензоилэргонину (основному метаболиту кокаина) и поликлональные антитела к амфетамину. Охарактеризована аффинность и специфичность данных антител; периодатным методом синтезированы их конъюгаты с пероксидазой. С использованием полученных реагентов реализованы форматы конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) ПАВ с прямым и непрямым мечением антител. Изучена взаимосвязь между соотношениями реагентов и длительности взаимодействия на стадиях ИФА, с одной стороны, и аналитическими характеристиками иммуноферментных тест-систем — пределом обнаружения и точностью определения, с другой стороны. Определены оптимальные методики ИФА в неравновесном режиме, позволяющие проводить количественное определение содержания ПАВ без ухудшения аналитических характеристик по сравнению с равновесным режимом. Продолжительность ИФА в соответствии с предложенными методиками составляет от 60 до 80 мин., что существенно меньше по сравнению с равновесным ИФА (2,5-3 часа).

Разработанные тест-системы характеризуются следующими параметрами: ИФА опиатов — предел детекции 0,01 нг/мл, рабочий диапазон количественного определения — 0,03-1,4 нг/мл; ИФА каннабиноидов — 0,02 нг/мл и 0,05-1,5 нг/мл, ИФА амфетамина — 0,4 нг/мл и 0,8-16 нг/мл, ИФА метамфетамина — 2,2 нг/мл и 5,5-120 нг/мл, ИФА бензоилэргонина — 4,2 нг/мл и 12-500 нг/мл, соответственно.

Изготовлены экспериментальные образцы тест-систем. Изучена стабильность реагентов, выбраны оптимальные среды для хранения антител и иммунопероксидазных конъюгатов. Проведены медицинские испытания тест-систем для выявления ПАВ в моче, подтвердившие их диагностическую эффективность. Разработаны и утверждены методические рекомендации «Порядок проведения иммуноферментного анализа на наличие наркотических средств и психотропных веществ в биологических объектах». Сформированная реагентная база может быть также использована для реализации других видов иммунохимического анализа.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Комплексные меры противодействия

злоупотреблению наркотиками и их незаконному обороту на 2005-2009 годы».

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА В-КЛЕТОК ПАМЯТИ У ДЕТЕЙ

Топтыгина А.П., Семикина Е.Л.¹, Алешкин В.А.
ФГУН МНИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва,
Россия

¹ Научный центр здоровья детей РАМН, Москва, Россия

Формирование иммунологической памяти является базовым атрибутом адаптивного иммунитета. Традиционно выделяют клеточную память, осуществляемую Т-клетками памяти и гуморальную. Гуморальное звено осуществляет защитные функции за счет специфических антител, синтезируемых долгоживущими плазматическими клетками. Эти клетки образуются в процессе формирования иммунологической памяти в лимфоузлах и мигрируют в костный мозг, где и сохраняются многие годы. Долгоживущие плазматические клетки можно рассматривать в качестве эффекторных клеток В-клеточного звена иммунологической памяти. Наравне с ними существуют В-клетки памяти (V_m), выполняющие функции центральных клеток памяти. Эти клетки образуются в герминальных центрах в результате специфических контактов с фолликулярными хелперами. После завершения иммунного ответа V_m частично остаются в лимфоузлах, составляют основную массу клеток маргинальной зоны фолликулов селезенки, разделяющей красную и белую пульпу. Также большое количество V_m присутствует в костном мозге. В отличие от долгоживущих плазматических клеток, V_m рециркулируют и определяются в крови, составляя примерно 30-40% от всего количества В-клеток у взрослых доноров. Наиболее типичным поверхностным маркером, позволяющим отличить V_m от других субпопуляций В-лимфоцитов является CD27. Эта молекула относится к семейству рецепторов для фактора некроза опухолей. CD27 экспрессируется на Т-лимфоцитах и натуральных киллерах, а среди В-клеток только на субпопуляции V_m . Роль CD27 на Т- и В-клетках различна. Если на Т-лимфоцитах эта молекула поддерживает активацию и пролиферацию клеток, то связывание CD27 на В-клетках сдвигает баланс в сторону развития V_m и ингибирует образование плазматических клеток, тогда как дифференцировка плазматических клеток, напротив, усиливается.

В настоящей работе была исследована возрастная динамика формирования популяции V_m у здоровых детей. С этой целью были исследованы пробы пуповинной крови от 11 детей, 11 новорожденных в возрасте 4-7 дней, 33 грудных детей в возрасте 4-7 месяцев, 13 детей в возрасте 1-2 года, 10 детей в возрасте 4-5 лет, 25 детей в возрасте 6-7 лет, 15 детей 9-11 лет и 28 детей 14-16 лет, всего — 146 детей. Определение V_m проводилось методом проточной цитофлуориметрии в комбинации CD20⁺, CD27⁺. Количество V_m рассчитывалось в процентах от общего числа В-клеток.

В результате проведенных исследований было показано, что в пуповинной крови количество V_m составило $1,9 \pm 0,4\%$ и практически не отличалось от группы новорожденных — $1,6 \pm 0,3\%$. В течение первых лет жизни отмечался экспоненциальный рост количества V_m , составив $2,9 \pm 0,3\%$ у детей 4-7 месяцев и $10,4 \pm 1,1\%$ у детей 1-2 лет.

Далее наблюдался плавный рост количества V_m , и в 4-5 лет он оказался $12,3 \pm 1,2\%$. Затем вновь отмечен период интенсивного подъема — в 6-7 лет этот показатель достиг $19,8 \pm 1,8\%$, и далее плавный рост: в 9-11 лет — $22,2 \pm 2,3\%$ и в 14-16 лет — $23,6 \pm 1,7\%$. Установлена тесная корреляционная связь между возрастом обследованных детей (в месяцах) и процентом CD27⁺В-лимфоцитов ($r = 0,82$). Также обнаружена тесная корреляция между возрастом детей (в месяцах) в течение первого года жизни и количеством В-клеток ($r = 0,71$) и отрицательная корреляция для этих показателей в более старшем возрасте ($r = -0,45$).

Таким образом, было показано, что количество V_m нарастает с возрастом от практически единичных клеток в пуповинной крови до более чем двадцати процентов у подростков. Это нарастание имеет нелинейный характер, имеется два периода ускоренного процесса образования V_m . Первый период — конец первого и второй год жизни. В это время ребенок активно взаимодействует с окружающей средой, встречается с большим количеством новых антигенов и идет активный прирост процента V_m . Второй пик интенсивного прироста V_m отмечается в 6-7 лет — ребенок идет в школу, выходит из-под бдительной опеки взрослых, спектр новых антигенов расширяется, и, как следствие, идет бурный прирост V_m . Установленные возрастные особенности показателей V_m позволяют внести вклад в понимание становления адаптивного иммунного ответа у человека.

ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Хайдуков С.В.

Институт биоорганической химии им. акад.

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва,
Россия

ФГУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, МЗиСР РФ,
Москва, Россия

Развитие современной технической, методологической и идеологической базы проточной цитофлуориметрии формируется на основе очень широких возможностей современных инструментов. Оснащенные гибким программным обеспечением, они способны одновременно анализировать колоссальное количество клеток, локализовать отдельные их группы, классы, популяции, субклассы, субпопуляции и т. д., измерять их поверхностные и внутриклеточные маркеры, оценивать их функциональное состояние.

На современном уровне развития проточной цитофлуориметрии и ее чрезвычайно широких возможностях для науки, необходимо ввести некие логические ограничения для практической медицины. Формирование стандартов иммунологического обследования пациентов должно учитывать как достижения современных технологий, так и клиническую значимость получаемых результатов.

С этой целью предлагается к внедрению в практическую работу четырехцветная панель моноклональных антител к различным маркерам, охватывающую большинство лимфоцитов периферической крови, включая степень их активации. Данная панель позволяет локализовать различных субпопуляций Т-клеток (Т-хелперы, Т-цитотоксические, Т-активированные, $\gamma\delta$ -Т-клетки, $\alpha\beta$ -Т-клетки, Treg), В-клеток (B1, B2, В-клетки памяти)

и NK-клеток (продуцирующие цитокины, цитолитические, активированные).

Возможности метода проточной цитофлюориметрии не ограничиваются только иммунофенотипированием лимфоцитов периферической крови. Не менее важно проводить исследования и других популяций лейкоцитов, как моноцитов, нейтрофилов, базофилов. В связи с этим, хотелось бы видеть в широкой медицинской практике использование таких тестов, как анализ септического состояния пациентов (по экспрессии HLA-DR на моноцитах и CD64 на нейтрофилах), анализ фагоцитарной активности и «кислородного взрыва» нейтрофи-

лов, *in vitro* активации базофилов в присутствии аллергенов и многое другое.

Не менее важным является проведение как внутрилабораторного контроля, так и участие в программах внешней оценки качества цитофлюориметрических исследований.

Все это, несомненно, должно привести к усовершенствованию диагностики, стратегии и тактики лечения, больных с нарушениями иммунной системы, позволит систематизировать новые данные, полученные в ходе освоения новых возможностей современных проточных цитофлюориметров.