

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ЛАКТОФЕРРИН ПОДАВЛЯЕТ АКТИВАЦИЮ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ

Абдурасулова И.Н.¹, Карташов А.В.², Киселева Л.Н.²,
Захарова Е.Т.¹, Карпенко М.Н.¹, Соколов А.В.¹,
Житнухин Ю.Л.¹, Коржевский Д.Э.¹, Васильев В.Б.¹,
Клименко В.М.¹

¹ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН,
Санкт-Петербург, Россия

² ФГУ Российский научный центр радиологии
и хирургических технологий Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) является адекватной моделью рассеянного склероза (РС) — аутоиммунного демиелинизирующего заболевания ЦНС, поражающего людей трудоспособного возраста. Клинические и экспериментальные исследования последних десятилетий привели к пересмотру концепции патогенеза РС, что стимулировало исследования по поиску новых патогенетических мишеней и разработке новых методов как иммуномодулирующей, так и нейротропной терапии. Одним из перспективных направлений представляется использование природных соединений с широким спектром биологической активности, в частности белка лактоферрина. Известно, что данный белок обладает выраженным противовоспалительным действием.

Целью работы явилось исследование влияния лактоферрина на течение ЭАЭ у крыс и его иммуномодулирующее действие. ЭАЭ индуцировали однократным подкожным введением гомогената гомологичного спинного мозга в полном адьюванте Фрейнда ЛФ вводили внутривенно в дозе 15 мг/крысу за день до индукции ЭАЭ, а также на 2-ой, 4-ый, 6-ой, 8-ой и 10-ый дни после индукции (д.п.и.) ЭАЭ. Герминальные зоны в паховых лимфоузлах выявлялись с помощью иммуногистохимической реакции с пролиферативным маркером PCNA. Фенотип Т-клеток на 14-ый д.п.и. определяли методом проточной цитометрии. Введение ЛФ предотвращало развитие ЭАЭ у 25% крыс и снижало выраженность неврологических нарушений у заболевших животных. На пике заболевания (14 д.п.и.) у крыс, получавших ЛФ, отмечалось увеличение количества герминальных зон в лимфоузлах, а также их интенсивность, по сравнению с животными без введения ЛФ. Количество Т-клеток CD4⁺, CD8⁺ и CD4⁺CD8⁺ не различалось у крыс, получавших и не получавших ЛФ, при этом количество активированных Т-клеток с фенотипами CD25⁺, CD25⁺CD4⁺ и CD25⁺CD8⁺ на фоне введения ЛФ было существенно ниже, чем у животных без введения ЛФ. Полученные

данные позволяют предположить, что ЛФ стимулирует продукцию Т-лимфоцитов, но подавляет их активацию.

Работа поддержана грантом РФФИ, грант № 09-04-00742.

ИНТЕНСИВНОСТЬ ТИМОПОЭЗА ПРИ ИММУНОПАТОЛОГИИ

Блинова Е.А., Борисов В.И., Непомнящих В.М.,
Сизиков А.Э., Кожевников В.С.

НИИ Клинической иммунологии СО РАМН,
г. Новосибирск, Россия

Введение. Среди многообразия возрастных изменений в наибольшей степени процесс старения иммунной системы отражается на дифференцировке и функциональной активности Т-лимфоцитов. Важная роль при этом отводится инволюции тимуса. При многих иммунопатологических заболеваниях наблюдается изменение показателей Т-клеточного гомеостаза, и механизмы пополнения наивных Т-клеток в этих условиях отличаются от таковых в норме. Несмотря на то, что у человека для наивных CD4⁺ лимфоцитов выявлен поверхностный маркер CD31, точно определить количество клеток, недавно мигрировавших из тимуса довольно трудно. Поэтому для оценки тимопоэза используют Т-рецепторные эксцизионные кольца (ТРЭК). Они представляют собой кольцевые фрагменты ДНК, образующиеся при реаранжировке α Т-клеточного рецептора, и содержащие определенные константные последовательности, по которым их можно обнаружить.

Несмотря на различия в этиологии и патогенезе, клинике, морфологической сущности ревматоидный артрит (РА) и бронхиальная астма (БА) объединены одним общим параметром — ускоренным сокращением теломер в иммунокомпетентных клетках. Это может быть связано с изменением количества мигрирующих из тимуса Т-клеток, последующей экспансией олигоклональных Т-клеток на периферии, что в конечном итоге и приводит к укорочению теломер.

Целью данной работы было определение количества ТРЭК в популяции Т-лимфоцитов как показателя функциональной активности тимуса у пациентов с РА и БА и сопоставление ее с таковой у доноров.

Материалы и методы. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из периферической крови пациентов с ревматоидным артритом, бронхиальной астмой и условно здоровых доноров на градиенте плотности фиколл-верографина. МНК делили на популяции CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов с помощью клеточного сортера. Из полученных клеток выделяли ДНК набором «Проба-ГС» (ДНК-технология), и методом PCR в режиме реаль-

ного времени с помощью специфичных праймеров и зонда, меченного FAM, определяли количество TREC. В качестве контроля количества вносимой ДНК использовали параллельную реакцию со специфичными праймерами и зондом, также меченным FAM, к гену CCR5. Для определения абсолютного количества использовали серию разведений стандарта (плазмида со встроенным фрагментом гена CCR5 или TCR δ).

Результаты и их обсуждение. В работе было исследовано 15 пациентов с РА со средним возрастом $52,5 \pm 5,22$ г. и 30 пациентов с различной формой БА и средним возрастом $40,7 \pm 12,3$ лет. Для каждой группы пациентов была подобрана по возрасту своя группа доноров (10 человек со средним возрастом $51,2 \pm 3,04$ г. для группы пациентов с РА и 22 человека со средним возрастом $40,4 \pm 10,00$ лет для группы пациентов с БА). Уровень ТРЭК в CD4⁺ лимфоцитах у доноров составил 5300 (4600-5800), в CD8⁺ — 6300 (4200-8500) молекул на миллион клеток, при РА их количество было достоверно ниже ($p < 0,05$) и достигало 1800 (760-3500) и 2000 (740-2400) соответственно. Данные представлены в виде медианы с указанием в скобках 25 и 75 перцентилей. У больных БА количество ТРЭК в CD4⁺ и в CD8⁺ лимфоцитах составило 10100 (3000-20900) и 8000 (3200-18000), достоверно не отличалось от такового у доноров — 6900 (5300-11200) и 9600 (7000-12000) соответственно. Также не было выявлено достоверных различий по количеству ТРЭК-содержащих клеток в зависимости от формы астмы и уровня IgE.

Значительное снижение количества ТРЭК как в CD4⁺, так и в CD8⁺ лимфоцитах свидетельствует о преждевременном старении тимуса при РА. Количество мигрирующих из тимуса наивных лимфоцитов не хватает для поддержания периферического пула, и на периферии начинают активно делиться лимфоциты, уже прошедшие антигенную презентацию. Что приводит к укорочению теломера, старению популяции лимфоцитов и их частичной дисфункции.

В случае БА наблюдается другая картина. В основе патогенезе данного заболевания лежит каскад воспалительной реакции, центральным звеном которого являются Т-лимфоциты, отвечающие на антигенную стимуляцию активацией, пролиферацией и синтезом цитокинов. Таким образом, обновление иммунокомпетентных клеток в результате хронического воспаления может сказываться на длине теломера, но не влияет на образование в тимусе и миграцию на периферию наивных Т-лимфоцитов.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

Булгакова Т.В.¹, Лапин С.В.¹, Харитонов А.Г.²,
Кондрашина Э.А.², Щукина О.Б.²,
Барановский А.Ю.²

¹ СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

² СПб МАПО, Санкт-Петербург, Россия

Группу воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) составляют болезнь Крона (БК) и неспецифический язвенный колит (НЯК). Для этих заболеваний характерны различная распространенность патологического процесса в ЖКТ, разная глубина поражения слизистой оболочки кишки, определенные морфологические признаки, а также различное течение и прогноз. Имму-

ная система играет значимую роль в патогенезе ЯК и БК. Одним из фактов, доказывающих аутоиммунный характер заболевания, является обнаружение в сыворотке крови этих пациентов специфических аутоантител, таких как антитела к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА) и антител к бокаловидным клеткам кишечника. Для определения клинического значения данных аутоантител в диагностике и прогнозировании ВЗК была проведена данная работа.

Нами были обследованы 51 пациент с НЯК и 48 пациентов с БК в фазу обострения заболевания, в группу сравнения вошли 15 здоровых доноров. Средний возраст пациентов составил $39,2 \pm 4,06$ лет. У всех пациентов и доноров в сыворотке крови определяли антитела к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА) IgG и IgA классов и антитела к бокаловидным клеткам кишечника методом IgG методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием тест-системы Euroimmun (Германия).

У 66,7% пациентов с НЯК были обнаружены диагностические титры АНЦА класса IgG с перинуклеарным типом свечения в титре более 1:40 и 37,5% АНЦА класса IgA, в то время как у пациентов с БК диагностический титр АНЦА класса IgG был выявлен у 8,3% и 11,4% класса IgA. В группе контроля не обнаружено АНЦА IgG и IgA классов.

При исследовании антител к бокаловидным клеткам кишечника антитела в титрах более 1:80 отмечались с одинаковой частотой при ЯК (17,3%) и БК (16,3%), частота аутоантител у здоровых доноров несколько меньше и составляет 6,6%.

У больных НЯК в группе серопозитивных по АНЦА частота стула была выше по сравнению с АНЦА-негативными ($6,67 \pm 0,62$ vs. $4,23 \pm 0,68$, $p = 0,008^*$). Кроме того, у них чаще отмечалась лихорадка 26% vs. 6%, чаще лейкоцитоз 55% vs. 25%, ниже содержание альбумина. При эндоскопическом исследовании у пациентов с АНЦА чаще выявлялись язвенные поражения слизистой 62% против 12% ($p < 0,001$).

Таким образом, серологические тесты являются важными для диагностики и прогнозирования ВЗК, а выявление АНЦА является признаком неблагоприятного течения ВЗК.

АБЗИМЫ КАК МАРКЕРЫ ВИРУСНЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЙ

Бунева В.Н., Пархоменко Т.А., Одинцова Е.С.,
Невинский Г.А.

Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, Россия

Введение. Каталитически активные антитела (АТ), абзимы, обнаруживают при ряде аутоиммунных заболеваний (системная красная волчанка, рассеянный склероз и др.), а также при некоторых вирусных инфекциях (гепатит, ВИЧ-инфекция), в то время как антитела из крови здоровых доноров либо не обладают каталитической активностью, либо она крайне низкая. При клещевом энцефалите (КЭ) также обнаруживаются АТ не только к компонентам вируса, но и к органонеспецифическим аутоантигенам, наблюдается развитие аутоиммунных процессов.

Цель и задачи. Целью работы является выяснение сходства и различий причин и путей происхождения ау-

тоиммунных процессов при инфекционных заболеваниях, а также установление возможной роли каталитически активных антител (АТ) в этиологии и/или патогенезе развития вирусных (гепатит, ВИЧ-инфекция, клещевой энцефалит) заболеваний. Основная задача данной работы заключалась в исследовании и сравнении каталитических свойств абзимов из крови больных клещевым энцефалитом с абзимами при других аутоиммунных патологиях.

Методология работы включает разнообразные методы выделения гомогенных препаратов антител из плазмы крови, ионообменную и аффинную хроматографии, гель-фильтрацию, нативный и денатурирующий электрофорез белков и нуклеиновых кислот, спектрофотометрию, иммуно-ферментный анализ.

Основные результаты. Показано, что относительная ДНК-гидролизующая активность препаратов электрофоретически гомогенных препаратов иммуноглобулинов класса G из крови пациентов с клещевым энцефалитом варьирует от пациента к пациенту, но в отличие от здоровых доноров 92% препаратов крови демонстрируют достоверно тестируемую активность. На основании выполнения общепринятых критериев сделан вывод, что ДНК-гидролизующая активность иммуноглобулинов крови исследуемых больных клещевым энцефалитом является их собственным свойством. Определены кинетические параметры реакции гидролиза ДНК изучаемыми абзимами. Определенные величины K_m соответствуют описанному ранее сродству IgG пациентов с аутоиммунными заболеваниями и примерно на 3-4 порядка выше, чем сродство ДНКазы I к суперскрученной ДНК.

Заключение. Анализ данных исследования и сравнения ДНКазной активности антител крови при клещевом энцефалите и других аутоиммунных патологиях выявил закономерность увеличения уровня ДНКазной активности АТ в следующем порядке: диабет < вирусный гепатит $\approx$ КЭ < полиартрит $\leq$ тиреоидит Хашимото < ВИЧ-инфекция $\leq$ рассеянный склероз < СКВ.

Работа поддержана Программами фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» № 6.7 и «Молекулярная и клеточная биология» № 5.13, грантами РФФИ № 10-04-00387, 10-04-00281, 09-04-00804 и АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» 2.1.1/5580.

СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ К ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПРЕПАРАТАМ, Т-ХЕЛПЕРЫ 2 И ИММУНОГЛОБУЛИН Е У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Бычкова Н.В.¹, Чиненова Л.В.¹, Давыдова Н.И.¹, Карпов М.И.², Бисага Г.Н.²

¹ ФГУЗ ВЦЭРМ им. А.М. Никиторова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

² Военно-Медицинская Академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Лекарственная аллергия встречается часто, но может привести к активации аутоиммунного воспаления и появлению неврологической симптоматики у пациентов с рассеянным склерозом. Осуществление кожных проб и провокационных тестов *in vivo* для подтверждения причины сенсibilизации при лекарственной аллергии не получило широкого распространения из-за высокого уровня опасности для пациента и особенностей аллергенов. Существующие специфические методы лабораторной диагностики лекарственной аллергии не обладают высокой чувствительностью, поэтому

не всегда достаточно информативны, но трудоемкость их высока. В настоящее время определение количества активированных базофилов периферической крови при инкубации с конкретными лекарственными препаратами является новым и весьма перспективным тестом для выявления лекарственной аллергии.

Целью нашей работы стало изучение возможности применения теста активации базофилов с помощью Allergenicity kit (Beckman Coulter) для установления или подтверждения лекарственной аллергии у пациентов с рассеянным склерозом.

Материалы и методы. В работе была исследована периферическая кровь 9 условно здоровых человек, которые отрицали у себя наличие каких-либо проявлений аллергических реакций и 27 больных рассеянным склерозом.

Тест активации базофилов проводили с использованием набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, BECKMAN-COULTER), в котором идентификация базофилов осуществлялась с помощью маркеров CD3⁺CRTH2⁺, а выявление активации базофилов — по увеличению содержания клеток с маркером CD203c. Оценку теста осуществляли методом проточной цитометрии (FC500, BECKMAN-COULTER). В качестве индукторов в тесте активации базофилов использовали препараты, применяемые для лечения пациентов с рассеянным склерозом — аванекс, копаксон-ТЕВА, ребиф.

Содержание иммуноглобулина Е в сыворотке крови пациентов исследовали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ХемаМедика).

Для статистической обработки материала использовали метод расчета средних показателей с ошибкой среднего, непараметрический критерий Вилкоксона—Манна—Уитни для сравнения результатов обследования (различия в группах считали достоверными при $p < 0,05$) и точный метод Фишера (различия считали достоверными при $p < 0,025$).

Результаты. В группе лиц без аллергических проявлений в анамнезе спонтанная активация базофилов составила $4,2 \pm 0,5\%$, у больных рассеянным склерозом — $11,0 \pm 3,8\%$ ($p < 0,05$).

Индуктированная активация базофилов после инкубации с лекарственными препаратами у условно здоровых лиц не превышала спонтанной активации. У пациентов с рассеянным склерозом в ряде случаев индекс активации базофилов (отношение индуцированной активации к спонтанной) варьировал от 0,2 до 4,97, наиболее высокие индексы стимуляции наблюдались у пациентов на препарат копаксон-ТЕВА — $2,3 \pm 0,7\%$ (на аванекс — $1,7 \pm 0,3\%$, на ребиф — $1,8 \pm 0,3\%$, референтные значения индекса активации $< 1,05$).

В процессе исследования было выявлено, что процентное содержание Т-хелперов 2 (CD3⁺CRTH2⁺) в периферической крови в группе больных превышало данный показатель у здоровых лиц в два раза ($1,18 \pm 0,2\%$ против $0,60 \pm 0,1\%$, $p < 0,05$). Согласно литературным данным, содержание Т-клеток, несущих CRTH2, в периферической крови невелико, но степень их активации, оцениваемая по маркерам CD69, CD45RO, CD25, CD95 и HLA-DR, выше, чем у негативных по CRTH2.

Процент Т-хелперов 2 различался в двух группах пациентов с рассеянным склерозом: в 1-ой группе (пациенты с уровнем общего иммуноглобулина Е в сыворотке 70 Кг/л и более) составил $1,46 \pm 0,3\%$, во 2-ой группе (пациенты с уровнем общего иммуноглобулина Е в сыворотке менее 70 Кг/л) — $1,00 \pm 0,2\%$, референтные значения этого показателя $< 1,0$. У всех пациентов 1-ой группы от-

мечалось увеличение индекса активации базофилов хотя бы на один из исследованных препаратов. У 20% пациентов 2-ой группы индексы активации базофилов на все исследованные препараты были в пределах референтных значений.

Анализ количества Т-хелперов 2 и содержания иммуноглобулина Е в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом выявил взаимосвязь этих параметров — с вероятностью $p = 0,018$ у больных с высоким (> 70 Кг/л) уровнем иммуноглобулина Е чаще определяется повышенное ($> 1,0\%$) число Т-хелперов 2, что подтверждает способность Т-хелперов 2 индуцировать синтез иммуноглобулина Е плазматическими клетками.

Заключение. Тест на активацию базофилов *in vitro* — доступный и перспективный метод исследования сенсibilизации к лекарственным препаратам. Он дает дополнительную возможность клиницисту решить проблему выбора препарата с наименьшими побочными эффектами для каждого пациента индивидуально.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И ОСТЕОАРТРОЗОМ

Васильева Ю.А., Кратнов А.Е., Углов Е.С.

Государственная медицинская академия, г. Ярославль, Россия

Ревматоидный артрит (РА) — заболевание, в основе патогенеза которого лежит системное аутоиммунное воспаление, затрагивающее синовиальную оболочку. Согласно современным представлениям синовит облигатно развивается у больных с остеоартрозом (ОА), поэтому за рубежом принят термин «остеоартрит». Показано, что определенную роль в развитии воспаления при РА играет нарушение функции НФ, связанное с активацией в них кислородзависимого метаболизма.

Целью исследования было изучение кислородзависимого метаболизма и антиоксидантной защиты нейтрофилов (НФ) у больных с РА и ОА, осложненным вторичным синовитом.

Материалы и методы. Обследовано 87 пациентов, из них 15 (17,2%) больных с достоверным РА (средний возраст $52,3 \pm 15,5$ лет), диагноз которого выставлялся в соответствии с критериями АРА (1987). Больные РА находились в развернутой стадии заболевания, имели преимущественно среднюю степень активности заболева-

ния, умеренно тяжелый вариант течения, ревматоидный фактор был выявлен в крови у 9 пациентов (60%). Вторую группу составили 72 (82,8%) больных с первичным ОА (средний возраст $56,4 \pm 14,6$ года), который был диагностирован в соответствии с критериями Л.И. Беневоленской (1993). Для диагностики вторичного синовита использовались клинические критерии: умеренная и сильная боль, возникающая через 5-10 мин после начала ходьбы и не исчезающая в покое; утренняя скованность продолжительностью не менее 15 мин; локальное повышение кожной температуры; нарастание ограничения объема движений; иногда увеличение коленного сустава в объеме из-за наличия экссудата. Клинические признаки вторичного синовита были выявлены у 65 (90,2%) больных. Для изучения кислородзависимого метаболизма и антиоксидантной защиты НФ использовался тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), определение в клетках активности миелопероксидазы и глутатионредуктазы. В качестве индуктора кислородзависимого метаболизма НФ для изучения активности Fc-рецептора фагоцитов использовали взвесь убитых клеток *Staphylococcus aureus* штамма p-209, C3-рецепторов — фитогемагглютинин из бобов фасоли (*Phaseolus vulgaris*). В крови определяли активность каталазы, уровни малонового диальдегида и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Концентрацию С-реактивного белка (С-РБ) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве группы контроля было обследовано 20 (средний возраст $52,8 \pm 15$ года) пациентов без РА и ОА.

Результаты и обсуждение. У больных РА по сравнению с пациентами с ОА, осложненным вторичным синовитом, при поступлении в стационар выявлялось достоверно большее количество лейкоцитов в периферической крови ($9,3 \pm 5,8 > 6,1 \pm 1,4 \cdot 10^9/\text{л}$; $p = 0,00009$), уровень СОЭ ($29,3 \pm 15,5 > 11 \pm 8,9$ мм/ч; $p = 0,00001$) и С-РБ ($68,7 \pm 72,3 > 6,1 \pm 9,2$ мг/л; $p = 0,0004$). В группе больных ДОА было достоверно выше содержание в крови холестерина ($248,4 \pm 36,3 > 203,8 \pm 14,5$ мг/дл; $p = 0,0001$). Выявлено, что у больных РА и ОА по сравнению с контролем наблюдались достоверно выше показатели спонтанного и стимулированного НСТ-теста, ЦИК. Несмотря на то, что у больных РА был достоверно повышен уровень ЦИК по сравнению с ОА ($161,5 \pm 116,7 > 85,7 \pm 46,6$ ед. опт. плотности), значения НСТ-теста не различались. Активация нейтрофилов через C3-рецепторы была более выражена при ОА. Таким образом, у больных ОА, осложненным вторичным синовитом, состояние кислородзависимого метаболизма НФ было сопоставимо с показателями

ТАБЛИЦА. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БОЛЬНЫХ РА И ОА (К ТЕЗИСАМ ВАСИЛЬЕВОЙ Ю.А. И ДР.)

Показатель	РА (n = 15)	ОА (n = 72)	p
Спонтанный НСТ-тест, нмоль	126,7 $\pm$ 51,4	122,8 $\pm$ 39,1	нд
Стимулированный НСТ-тест, нмоль (Fc-рецептор)	126,1 $\pm$ 34,5	118,9 $\pm$ 29	нд
Стимулированный НСТ-тест, нмоль (C3-рецептор)	117,2 $\pm$ 39,9	130,9 $\pm$ 35,2	нд
Миелопероксидаза, SED	17,6 $\pm$ 6,1	14,8 $\pm$ 9,4	нд
Глутатионредуктаза, нмоль $\cdot$ л ⁻¹ $\cdot$ сек ⁻¹	40,5 $\pm$ 54,1	43,1 $\pm$ 119,6	нд
Каталаза, мкат/л	792,5 $\pm$ 348,2	798,2 $\pm$ 276,5	нд
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	46,3 $\pm$ 28	49,7 $\pm$ 26,5	нд
ЦИК, ед. опт. плотности	161,5 $\pm$ 116,7	85,7 $\pm$ 46,6	0,0002

РА. Учитывая более низкий уровень ЦИК при ОА, в качестве активатора кислородзависимого метаболизма НФ могут выступать другие агенты (глюкоза, липиды крови).

Заключение. У больных ОА, осложненным вторичным синовитом, наблюдается активация кислородзависимого метаболизма НФ, сопоставимая с его уровнем при РА.

СИСТЕМА $TNF\alpha$ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Голикова Е.А., Лопатникова Ю.А., Шкаруба Н.С., Сизиков А.Э., Сенников С.В.

НИИ Клинической иммунологии СО РАМН,
г. Новосибирск, Россия

В современной иммунологии активно развивается направление посвященное изучению аутоантител к собственным иммунорегуляторным молекулам организма в норме и при различных патологиях. Известно, что аутоантитела могут выполнять ряд существенных функций в организме человека и регулировать активность собственного медиатора. Таким образом, изучение аутоантител при патологиях, в которых иммунорегуляторный цитокин играет важную патогенетическую роль, представляется актуальным, с точки зрения как фундаментальной, так и прикладной иммунологии.

Цель исследования: определить соотношение между медиатором $TNF\alpha$, растворимыми рецепторами и классами, субклассами аутоантител к $TNF\alpha$ у больных ревматоидным артритом (РА) и условно-здоровых доноров.

Материалы и методы. Для выделения аутоантител использовалась сыворотка больных РА в стадии обострения и условно-здоровых доноров. Процедуры по получению аутоантител проводились с помощью ряда хроматографических сорбентов (Bio Gel P 6 DG (Bio Rad), Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare), Affi-Gel 15 (Bio-Rad)). Рекombинантный человеческий $TNF\alpha$ был представлен ООО «Инженерная иммунология». Определение медиаторов в сыворотке проводили методом ИФА коммерческими тест-системами фирм «Вектор-Бест», «RayBioTech» и сборным набором с помощью моноклональных антител фирмы «Полигност».

Результаты показали, что среднее содержание компонентов системы $TNF\alpha$ в сыворотке составило: для $TNF\alpha$ — 2,76 пг/мл и 0,216 пг/мл, для рецептора 1 типа к $TNF\alpha$ — 771,16 пг/мл и 132,554 пг/мл, для рецептора 2 типа — 586,3 пг/мл и 1620,887 пг/мл, у больных РА и здоровых доноров соответственно. При оценке относительного содержания аутоантител к $TNF\alpha$ было показано значительное преобладание класса IgG по сравнению с классами IgA и IgM у обоих групп, а также тенденция к увеличению содержания всех классов у больных РА, по сравнению со здоровыми донорами, однако достоверные различия получены только для класса IgM. Для субклассов IgG, различия были показаны для 3 и 4 субкласса, в виде снижения содержания у здоровых доноров по сравнению с больными РА.

Таким образом, показано что, аутоантитела к $TNF\alpha$ присутствуют как в сыворотке условно-здоровых доноров, так и в сыворотке больных РА, при этом их функциональная роль при патологии и в норме, возможно, различается, о чем косвенно свидетельствуют изменения качественного и количественного содержания аутоантител. На основании полученных данных в будущем возможно будет обосновать новые молекулярные патогенетические механизмы развития заболевания, а также разработать новые подходы в терапии и диагностике. Работа поддер-

жана грантом ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг (Госконтракт П1305).

АУТОАНТИТЕЛА К ЭНДОГЕННЫМ ПЕПТИДАМ КАК ФАКТОР РИСКА НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА КОЛЛАГЕНА У БОЛЬНЫХ ДИВЕРТИКУЛЕЗОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Гудкова Р.Б., Левченко С.В., Потапова В.Б., Лазебник Л.Б.

ГУ ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва, Россия

Введение. При дивертикулезе толстой кишки (ДТК) вовлечение в патологический процесс структур слизистой оболочки (СО) сопряжено с иммунными реакциями на пептиды бактерий и стареющих клеток. В развитии иммунного ответа в СО важная роль принадлежит многочисленным паттернам — распознающим рецепторам, к которым относятся Toll- и Toll-подобные; для маннозы; «мусорщики»; распознающий коллагеновые белки — cC1qR (collagen-tail C1q-receptor). Эти регуляторные молекулы экспрессируются макрофагами, нейтрофилами, дендритными клетками и эпителиоцитами. Кроме того, эпителиальные клетки экспрессируют белок, повышающий проницаемость (BPI), который модулирует аутоиммунный ответ на бактериальный эндотоксин и тканевые ферменты, включая тканевую трансглутаминазу, регулирующий метаболизм коллагена.

Цель. Целью исследования было изучение роли аутоантител к эндогенным пептидам в возникновении нарушений в коллагенсодержащих структурах СО.

Материалы и методы. У 87 больных ДТК и 17 больных синдромом раздраженной кишки (СРК) определяли в сыворотке крови аутологичные IgG антитела: к протеиназе 3, лактоферрину, миелопероксидазе, эластазе, катепсину G, к тканевой трансглутаминазе (АТ тТГ), к белку, повышающему проницаемость (BPI IgG). В плазме — молекулярный коллаген IV типа. Использованы тест-системы: «Euroimmun», «Orgentec», «BCM Diagnostics». Морфологические изменения слизистой оболочки толстой кишки изучены на одномокронных срезах ткани. Использована компьютерная программа Statistica 6.0.

Результаты. При ДТК выявлено повышение уровня циркулирующих аутоантител (IgG) к антигенам цитоплазмы — протеиназе у 58% больных, лактоферрину — у 20%, миелопероксидазе — 26%, к эластазе — у 33%. Аутоантитела к катепсину G у больных не выявлялись. Концентрация аутоантител к BPI IgG у 70% больных составляла $34,7 \pm 4,2$ ед/мл (при СРК — $4,6 \pm 0,13$ ед/мл) ($p = 0,015$). Уровень АТ тТГ у 42% больных составлял $15,6 \pm 0,4$ ед/мл (при СРК — $2,2 \pm 0,34$ ед/мл). Молекулярный коллаген IV типа в плазме больных ДТК выявлялся в повышенной концентрации в 47% случаев, нормальный уровень в 26%. В слизистой оболочке толстой кишки при ДТК выявлена избыточная пролиферация эпителия в криптах с образованием многослойных пластов эпителиоцитов в субэпителиальной области. В поверхностном эпителии обнаружены группы клеток с дистрофическими изменениями в виде вакуолизации и гомогенизации цитоплазмы. В собственной пластинке коллагеновые волокна немногочисленны, истончены и образуют небольшие сетчатые структуры. Экстрацеллюлярный матрикс характеризуется неравномерной плотностью. Базальная мембрана эпителия и кровеносных сосудов, структурной основой кото-

рой является коллаген IV типа, фрагментирована и имеют участки расслоения.

Заключение. Повышенная активность аутоантител в классе IgG к ферментам (метаболическим и каталитическим) и к белку, повышающему проницаемость, отражают развитие аутоиммунного процесса при ДТК. Изменения метаболизма коллагена IV типа сопряжены со структурными нарушениями в соединительнотканых структурах слизистой оболочки.

КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ЮВЕНИЛЬНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Джубатова Р.С., Каипбекова Г.К.

РСНПЦ Педиатрии, г. Ташкент, Узбекистан

Ювенильный ревматоидный артрит — хроническое воспалительное заболевание суставов у детей до 16 лет с неизвестной этиологией и сложным патогенезом, характеризующееся неуклонно прогрессирующим течением. При ревматоидном артрите синовиальные мембраны секретируют большое количество фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, который разрушает дисульфидные связи в клеточной мембране. При этом наблюдается «утечка» протеолитических ферментов из клеточных лизосом, вызывающие повреждения близлежащих костей и хрящей. Организм отвечает на это путем выработки цитокинов. Каскады реакций в клетках, запускаемые цитокинами, еще больше усугубляют симптомы болезни.

Целью исследования явилось изучение уровня сывороточных цитокинов (IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-2 и TNF α) у детей с ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА). Были обследованы 32 ребенка в возрасте от 5 до 13 лет. Диагноз ставили на основании критериев Американской Ревматологической Ассоциации. У всех больных диагноз был подтвержден рентгенологически. 16 практически здоровых детей составили контрольную группу. Цитокины определяли методом ИФА с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (СПб, Россия) в сыворотке крови. Анализ полученных результатов показал повышение уровня IL-1 α в 1,8 раза ($P < 0,001$), IL-1 β в 1,5 раза ($P < 0,01$), IL-2 в 2,3 раза ($P < 0,001$), IL-6 в 1,6 раза ($P < 0,01$) и TNF α в 1,4 раза ($P < 0,05$) по сравнению с показателями контрольной группы. Повышенный уровень изученных цитокинов способствуют миграции лейкоцитов и лимфоцитов из крови в ткани, что усугубляет воспалительные деградации соединительной ткани и хрящей. Проведенные исследования дают возможность изучить «пусковые» механизмы, ответственные за развитие заболевания и разработать схему лечения с использованием новых терапевтических препаратов, действие которых направлено на нормализацию баланса цитокинов.

РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ИНГИБИТОРА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ

Житнухин Ю.Л., Абдурасулова И.Н., Соколов Д.И., Новикова Т.А., Фрейдлин И.С.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) является общепризнанной моделью рассеянного

склероза (РС) — тяжелого аутоиммунного демиелинизирующего заболевания, поражающего людей трудоспособного возраста. Важным патогенетическим звеном при этих заболеваниях являются провоспалительные цитокины. Отсутствуют сведения о зависимости выраженности неврологических нарушений от характера экспрессии цитокинов в ЦНС, а также о влиянии иммуномодулятора пентоксифиллина (ПФ) на ЭАЭ, что обосновывает целесообразность проверки способности ПФ модифицировать развитие заболевания в сопоставлении с уровнем продукции циркулирующих цитокинов и их экспрессией в спинном мозге. ЭАЭ индуцировали у крыс Wistar-самок массой тела 300–350 г однократной подкожной инокуляцией гомогената ткани гомологичного спинного мозга с полным адьювантом Фрейнда. Степень выраженности неврологических расстройств оценивали от 1 до 4 баллов. В разные сроки после инокуляции исследовали сыворотки крови крыс для оценки цитотоксического эффекта содержащегося в них TNF α на чувствительную линию мышечных фибробластов L-929. IL-10 определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA). Экспрессию TNF α , IL-1 β , IL-10 и IL-1 α в спинном мозге определяли методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Срезы головного и спинного мозга толщиной 30 мкм окрашивали по Нислю для выявления очагов воспаления. Для обнаружения демиелинизации ткани ЦНС исследовали срезы толщиной 1 мкм, окрашенные толудиновым синим. Препараты ПФ под названием «Трентал» и «Пентамер» вводили с 1-го для латентного периода ежедневно внутривентриально по 5–10 мг в сутки в течение 15 дней после иммунизации. Показано, что при развитии ЭАЭ у крыс патоморфологические изменения характеризуются менингеальной, периваскулярной и перивентрикулярной инфильтрацией и демиелинизацией в ЦНС-стволе, мозжечке и спинном мозге. У сенсibilизированных животных установлено повышение уровня сывороточного TNF α , который был более высоким у заболевших животных в сравнении со здоровыми как в латентный период, так и в стадии неврологических расстройств. Ранее возрастание уровня циркулирующего IL-10 предопределяло легкое течение болезни, сопровождавшееся снижением активности TNF α , тогда как низкий уровень IL-10 зарегистрирован у тяжело больных крыс с высоким уровнем TNF α и последующим летальным исходом. Ежедневное парентеральное введение ПФ привело к снижению показателей заболеваемости, летальности и уровней сывороточного TNF α при наличии прямых корреляции между тяжестью заболевания и уровнем циркулирующего цитокина. У получавших ПФ животных наблюдалось снижение экспрессии провоспалительных цитокинов в ЦНС. Выявлена определенная зависимость экспрессии TNF α , IL-1 β и IL-1 α от выраженности и длительности клинических проявлений ЭАЭ в условиях введения ПФ. Результаты указывают на то, что одним из факторов, способствующих реализации повреждений ЦНС при ЭАЭ может быть высокий уровень сывороточного TNF α не только в латентном периоде, но и после его окончания. Потеря веса тела в процессе развития ЭАЭ может быть следствием избыточной продукции TNF α . Различия динамики циркулирующих в крови цитокинов и паттерна их экспрессии в ЦНС крыс с различной тяжестью заболевания свидетельствуют о том, что уровень цитокинов и их наличие в ЦНС определяют вероятность развития и тип течения ЭАЭ. Показано, что ПФ при парентеральном введении в определенных дозах предотвращает развитие ЭАЭ у ча-

сти животных и значительно снижает летальность. Полученные данные выявляют участие $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ в патогенезе ЭАЭ, защитную роль $IL-10$ в развитии заболевания, корреляцию продукции и экспрессии цитокинов с тяжестью течения и исходом ЭАЭ, обосновывают целесообразность использования препаратов-ингибиторов продукции противовоспалительных цитокинов в терапии аутоиммунных демиелинизирующих процессов.

УРОВЕНЬ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ – ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА – $\beta 3$, $IL-17$, $IL-10$, $IL-1\alpha$ И $IL-1\beta$ В ДЕБЮТЕ АУТОИММУННОГО ТИРЕОТОКСИКОЗА ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА–БАЗЕДОВА

Здор В.В., Маркелова Е.В.

ВГМУ, г. Владивосток, Россия

ГУЗ ККБ № 2, Краевой центр диабета и эндокринных заболеваний, г. Владивосток, Россия

Болезнь Грейвса–Базедова (БГБ) является одной из актуальных проблем современной медицины. Ведущая роль в патогенезе аутоиммунного тиреотоксикоза отводится нарушениям в процессах регулирования иммунного ответа, а также дисбалансу в активации различных субпопуляций эффекторных Т-хелперов ($Th1$ -, $Th2$ -, $Th17$ -клеток). Важную роль отводят не только балансу вышеперечисленных субпопуляций, но и продукции маркерных для них цитокинов ($IL-1\alpha$ и $IL-1\beta$; $IL-10$, $IL-17$ и $TGF-\beta$ в нашем исследовании), а также взаимосвязи $Th17$ и $Treg$ -клеток, осуществляемой в том числе с помощью $TGF-\beta$. Однозначного мнения о роли и взаимосвязях данных клеток и цитокинов в патогенезе БГБ не существует, что послужило предпосылкой для нашего исследования.

Цель работы: изучение и оценка сыровоточного уровня $IL-1\alpha$ и $IL-1\beta$, $IL-10$, $IL-17$ и $TGF-\beta$ у больных болезнью Грейвса–Базедова (БГБ) различной степени тяжести. Обследовано 106 пациентов. Возраст больных от 18 до 65 лет. Исследование цитокинов проведено методом ИФА с помощью диагностических наборов “R&D Diagnostics Inc. USA”. Оценивая уровень сыровоточного $IL-1\alpha$ в дебюте БГБ выявлено его увеличение в десятки раз, по сравнению с показателями у здоровых лиц ($19,15 \pm 5,41$ пг/мл против $0,56 \pm 0,04$ пг/мл $p < 0,01$). Увеличение показателей $IL-1\beta$ было не столь значимым ($9,7 \pm 4,41$ пг/мл против $5,24 \pm 2,18$ пг/мл). При этом $IL-17$ у больных с БГБ составил $22,11 \pm 5,69$ пг/мл против $7,82 \pm 2,58$ у здоровых лиц ($p < 0,001$). Выявлена также тенденция к увеличению $TGF-\beta 3$ ($61,56 \pm 5,36$ пг/мл; $p > 0,05$) по сравнению с контрольной группой ($52,73 \pm 10,41$ пг/мл). Показатели противовоспалительного $IL-10$ при манифестации аутоиммунного тиреотоксикоза в группах легкой и средней степени тяжести БГБ составили $58,5 \pm 6,43$ пг/мл, при норме $13,86 \pm 0,7$ пг/мл ($p < 0,01$), а в группе тяжелого течения тиреотоксикоза до $136,93 \pm 14,03$ пг/мл ($p < 0,001$). Корреляционный анализ позволил установить положительную связь умеренной силы между содержанием в сыровотке крови $IL-17$ и $TGF-\beta 3$ ($r = 0,32$).

Выводы: повышенные уровни исследованных цитокинов, в том числе высокий уровень $IL-17$, демонстрируют нарушения в системе иммунорегуляции при БГБ и объективно отражают выраженность аутоиммунного процесса на системном уровне. Установлена корреляция умеренной силы между $IL-17$ и $TGF-\beta 3$.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ДНК-ЦИТОМЕТРИИ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ПЕРВИЧНЫМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

Кальметьева Л.Р.

ГУЗ Республиканская детская клиническая больница, г. Уфа, Россия

Актуальной проблемой современной нефрологии остается прогрессирование хронических гломерулонефритов (ХГН), выявление маркеров активности воспалительного процесса, оценка эффективности иммуносупрессивной терапии (ИСТ). Адекватными, достоверными, легковоспроизводимыми критериями обострения ХГН могут являться иммунологические параметры и показатели кинетики клеточного цикла. Особый интерес представляет изучение пролиферативной активности клеток на фоне применения иммуносупрессивных препаратов, которые, как известно, обладают антипролиферативным эффектом [М.С. Игнатова, 2009].

Целью исследования явилась оценка диагностических и прогностических маркеров активности почечного процесса по данным комплексного исследования иммунного статуса и функционального состояния клеток периферической крови у детей с ХГН.

Материалы и методы. Нами обследовано 30 здоровых и 46 больных детей с ХГН в возрасте от 6 до 17 лет: 27 больных с гормонозависимым нефротическим синдромом (НС) и 19 – с ХГН с гематурией. Все пациенты поступили в клинику в стадии обострения основного заболевания и получали ИСТ гормональными и/или цитостатическими препаратами (циклофосфан А, азатиоприн, циклофосфан). Комплексное обследование включало: сбор анамнеза, анализ клинических данных, проведение лабораторных исследований, определение концентрации сыровоточных иммуноглобулинов (Ig) классов М, G, A, уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК); иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии. Впервые у больных с ХГН проведено исследование плоидности и кинетики клеточного цикла клеток периферической крови методом проточной ДНК – цитометрии. При этом определялся процент клеток в фазах пролиферации (G2 и S). Статистический анализ проводился с использованием пакета компьютерных программ «Statistica 7», «Excel 8,0», применялись непараметрические методы анализа (ранговый коэффициент корреляции Спирмена и Mann–Whitney Test).

Результаты. При сравнительном анализе иммунологических показателей здоровых детей и больных ХГН были выявлены особенности гуморального звена системы иммунитета, патогномоничные для различных нозологических форм ХГН. Так, при НС установлены достоверное снижение концентрации IgG до 5,20 г/л (колебания изучаемого показателя составили 2,4–8,4 г/л), а также тенденция к повышению уровня IgM. При ХГН с гематурией отмечалось достоверное повышение медианы концентрации IgA в крови до 1,98 г/л, уровень IgA колебался от 1,02 до 3,97 г/л. Клеточное звено системы иммунитета при всех клинических вариантах ХГН, характеризовалось достоверным повышением по сравнению с контролем процентного содержания общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$ клеток), растворимых рецепторов к $IL-2$ ($CD25^+$), Выявлено снижение уровня ЕКК ($CD16^+CD56^+$ клеток). По данным ДНК-цитометрии клеток периферической крови показатели клеточного цикла здоровых детей от-

личались высокой стабильностью, в 100% случаев выявлялся диплоидный тип гистограмм, доля клеток в стадии синтеза ДНК составляла 0,1%, в фазе G2 — 0,02%. При анализе результатов ДНК-цитометрии клеток периферической крови больных с ХГН также в 100% случаях определялся диплоидный набор хромосом, отмечалось увеличение доли клеток в фазах пролиферации (G2 и S). При этом у пациентов с НС медиана содержания клеток периферической крови в G2-фазе составила 0,09%, в S-фазе — 0,15%, а у детей с ХГН с гематурией — 0,04% и 0,31% соответственно. Значительное возрастание пролиферативной активности при ХГН с гематурией является неблагоприятным признаком, отражающим выраженность почечного процесса.

Таким образом, выявленные особенности иммунного статуса и кинетики клеточного цикла на фоне базисной ИСТ укладываются в клинко-лабораторную картину обострения ХГН, отражают реакцию организма на базисную терапию. На основании анализа результатов проведенных исследований, мы считаем возможным рекомендовать мониторинг показателей кинетики клеточного цикла в качестве маркера активности процесса.

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-17 *IN VITRO* У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Кологривова И.В., Суслова Т.Е., Кошельская О.А., Винницкая И.В.

НИИ кардиологии СО РАМН, г. Томск, Россия

Существует иммунологическая концепция патогенеза воспаления при сахарном диабете (СД) 2-го типа, согласно которой высокие концентрации глюкозы, воздействуя на клетки иммунной системы, приводят к индукции синтеза воспалительных медиаторов. В ряде работ, выполненных на мышиных моделях СД 2-го типа, получены данные, свидетельствующие о нарушении функционирования недавно открытой субпопуляции Т-хелперов 17 (Th17), обладающих провоспалительной активностью. Однако влияние различных концентраций глюкозы на продукцию интерлейкина-17 (IL-17), ключевого цитокина Th17, у пациентов с СД 2-го типа пока остается не исследованным.

Целью работы являлась оценка влияния различных концентраций глюкозы на секрецию IL-17 в культуре мононуклеаров периферической крови у пациентов с СД 2-го типа и у здоровых добровольцев.

Материалы и методы. Обследовано 12 пациентов с СД 2-го типа и 10 практически здоровых добровольцев. Материалом для исследования являлась венозная кровь, взятая утром натощак. Мононуклеары периферической крови выделяли из гепаринизированной крови на градиенте плотности. Клетки инкубировали с глюкозой в концентрации 5, 10 и 20 ммоль/л в течение суток на среде RPMI 1640 при 37 °C и концентрации CO₂ 5%. Затем супернатант отбирали и в нем определяли содержание IL-17 методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Исследование содержания IL-17 в супернатантах суточных культур клеток показало, что при физиологической концентрации глюкозы 5 ммоль/л мононуклеары пациентов с СД 2-го типа секретировали IL-17 в большем количестве, чем клетки здоровых доноров ($p = 0,001$). При культивировании клеток с глюкозой в концентрации 10 ммоль/л наблюдалось увеличение уровня IL-17 в супернатанте по сравнению с концентрацией 5 ммоль/л ($p = 0,01$ для пациентов с СД 2-го типа;

$p = 0,03$ для здоровых добровольцев). Уровень IL-17 в среде с концентрацией глюкозы 20 ммоль/л не отличался от аналогичных показателей здоровых и пациентов с СД 2-го типа, полученных при культивировании клеток при 5 ммоль/л глюкозы.

Результаты нашего исследования показали, что при СД 2-го типа, характеризующимся состоянием гипергликемии, наблюдается активация Th17-лимфоцитов, которая проявляется в повышенной по сравнению со здоровыми донорами секреции IL-17 и при физиологической, и при высокой концентрации глюкозы *in vitro*. Причем уровень глюкозы в среде культивирования, равный 10 ммоль/л, приводит к увеличению секреции IL-17 мононуклеарами как у пациентов с СД 2-го типа, так и у здоровых добровольцев. Данная концентрация соответствует уровню постпрандиальной гипергликемии при нарушении толерантности к углеводам — состоянию, которое обычно предшествует развитию СД 2-го типа. Таким образом, мы полагаем, что уже на ранних стадиях нарушений углеводного обмена под влиянием умеренно повышенного уровня глюкозы может происходить активация Th17-лимфоцитов, способствующая развитию воспаления, которое еще более усугубляется при СД 2-го типа.

CD40⁺Т-ЛИМФОЦИТЫ КАК МИШЕНИ ЭКСТРАТИМИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПРИ АУТОИММУННОЙ ФОРМЕ ДИАБЕТА

Куклина Е.М., Лопатина В.А., Смирнова Е.Н., Шуклина О.Л.

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия

Введение. Недавними исследованиями мы показали, что при аутоиммунном диабете в зрелых периферических Т-лимфоцитах может индуцироваться реаранжировка генов антигенного рецептора (T Cell Receptor, TCR), ключевое событие Т-клеточной дифференцировки. Целью настоящей работы был поиск механизмов индукции такой реаранжировки, в частности, оценка наличия молекулы CD40 на мембране периферических Т-лимфоцитов у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (СД1) и роли CD40-зависимого сигнала в активации экспрессии рекомбиназы RAG-1 в данных клетках.

Материалы и методы. В работе исследовали лимфоциты периферической крови пациентов с СД1. В качестве контроля использовали лимфоциты здоровых доноров, а также пациентов с диабетом неаутоиммунной природы — сахарным диабетом 2 типа (СД2). Аутоиммунный тип СД1 подтвержден тестами на антитела к основным диабет-ассоциированным аутоантигенам. Экспрессия внутриклеточного белка RAG-1, а также мембранных молекул $\alpha\beta$ TCR (антигенного рецептора) и CD40, определялась проточной цитометрией с помощью соответствующих моноклональных антител.

Результаты исследования. Установлено, что зрелые периферические $\alpha\beta$ Т-лимфоциты пациентов с СД1 несут на мембране нетипичную для Т-клеток молекулу — CD40 ($15,5 \pm 1,89\%$ $\alpha\beta$ TCR⁺ клеток), в отличие от здоровых доноров ($0,51 \pm 0,037\%$ $\alpha\beta$ TCR⁺ клеток) и пациентов с СД2 ($0,77 \pm 0,059\%$ $\alpha\beta$ TCR⁺ клеток). Характер распределения белка RAG-1 по субпопуляциям лимфоцитов в зависимости от присутствия на мембране молекулы CD40 убедительно указывает на участие данной молекулы в индукции рекомбиназной активности: так, в основной, CD40-негативной, популяции $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов RAG-1

выявляется в следовых количествах, тогда как во фракции CD40-позитивных $\alpha\beta$ T-лимфоцитов рекомбиназу несет $62,5 \pm 4,10\%$ $\alpha\beta$ TCR⁺ клеток. Кроме того, культивирование фракционированных Т-лимфоцитов пациентов с СД1 на фоне анти-CD3-зависимой стимуляции приводило к повышению уровня RAG-1⁺ $\alpha\beta$ T-лимфоцитов, тогда как в случае блокады CD40-зависимого сигнала этот эффект отменялся.

Заключение. Сахарный диабет аутоиммунной этиологии сопряжен с экспрессией на мембране периферических $\alpha\beta$ T-лимфоцитов нетипичной для Т-клеток молекулы CD40, причем одной из функций данной молекулы является индукция рекомбиназной активности в клетке.

АУТОАНТИТЕЛА В ДИАГНОСТИКЕ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

Лазарева Н.М., Лапин С.В., Добронравов В.А., Храброва М.С.

ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Поражение почек, проявляющееся развитием гломерулонефрита (ГН) является одним из самых серьезных осложнений при системной красной волчанке (СКВ). Оно может развиваться у 40-60% больных СКВ и является одной из главных причин смертности при данном заболевании. Иммунологическая лабораторная диагностика волчаночного ГН основана на выявлении ряда аутоантител: антинуклеарного фактора (АНФ), антител к двуспиральной ДНК (дсДНК), антител к нуклеосомам (НС) и антител к c1q компоненту комплемента (c1q).

Цель и задачи. Определить встречаемость АНФ, антител к дсДНК, антител к НС и антител к c1q у больных СКВ с развитием ГН. Выяснить встречаемость данного спектра аутоантител при различных морфологических классах ГН.

Материалы и методы. Было исследовано 39 сывороток крови больных с критерияльно подтвержденным диагнозом СКВ. В группу сравнения вошли 60 больных с другой ревматологической патологией. У больных СКВ диагноз ГН (I-VI класс) был подтвержден морфологическим исследованием биопсий почки в соответствии с классификацией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). В данной группе определялись АНФ, антитела к дсДНК, антитела к НС, антитела к c1q . В группе сравнения выявлялись АНФ, антитела к дсДНК и антитела к НС. АНФ определялся методом непрямой иммунофлюоресценции (ИРИФ) на клеточной линии Нер-2. Антитела к дсДНК, НС и c1q выявлялись с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА). Для оценки встречаемости данного спектра аутоантител в разных классах ГН, были сформированы следующие группы. Первая группа (I и II классы), вторая группа (III и IV классы), третья группа (V класс) и четвертая группа (VI класс).

Основные результаты. У больных СКВ с развитием ГН АНФ встречался в 67%, антитела к дсДНК в 44%, антитела к НС в 38% и антитела к c1q в 44% случаев. В группе больных с другой ревматологической патологией АНФ, антитела к дсДНК и НС выявлялись в 28%, 3% и 7% случаев соответственно. При оценке встречаемости данного спектра аутоантител в различных группах ГН были получены следующие результаты. Антитела к НС во второй группе были выявлены в 69% случаев, а в первой и третьей в 24% и 14% соответственно ($p < 0,05$). Встречаемость антител к c1q во второй группе ГН составила 77%, в первой и третьей группах по 29% ($p < 0,05$). Достовер-

ной разницы по встречаемости АНФ и антител к дсДНК в разных группах ГН получено не было.

Заключение. Антинуклеарный фактор, антитела к дсДНК, антитела к НС и c1q компоненту комплемента являются высокочувствительными и специфическими маркерами ГН у больных СКВ. При сравнении различных классов ГН антитела к НС и c1q компоненту комплемента достоверно чаще определяются при наиболее тяжелых (III и IV классы) классах ГН. Встречаемость АНФ и антител к дсДНК у больных СКВ с различными классами ГН не отличается.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ CD3⁺CD5⁺CD19⁺ И CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ТРАВМОЙ ГЛАЗА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

Марачева Н.М.¹, Зурочка А.В.¹, Зурочка В.А.¹, Хайдуков С.В.^{2,3}

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

² Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³ ФГУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва, Россия

При травме глаза развитие патологического процесса может идти тремя основными путями: развитие острого воспалительного процесса, с последующим восстановлением до нормы, формирование хронического воспалительного процесса с периодическими обострениями и развитие самого грозного осложнения симпатической офтальмии. При всех вариантах течения травмы глаза офтальмологи находятся в сложной ситуации, так как необходимо решать вопросы, связанные с удалением поврежденного глаза или его сохранением. В настоящее время многие вопросы патогенеза травмы с учетом переходов одного состояния в другое остаются не изученными. Это касается и оценки состояния иммунной системы, в частности формирования и активности аутоиммунных клонов В1-лимфоцитов (фенотипа CD3⁺CD5⁺CD19⁺) и субпопуляции Т-регуляторных клеток (фенотипа CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺).

Целью работы явилось изучение субпопуляций В1-лимфоцитов и Трег у больных с травмой глаза в зависимости от формирования острого, хронического процессов и симпатической офтальмии.

Пациенты были обследованы на 7-14 сутки после травмы, через 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев, 1-2 года и при развитии симпатической офтальмии. Первые два срока нами были отнесены к острому периоду травмы, все остальные к хроническому. По степени выраженности воспалительного процесса больные были распределены на следующие группы: острые неосложненные, острые осложненные, хронические неосложненные, хронические осложненные и пациенты с симпатической офтальмией. У части пациентов после энуклеации глаза было проведено гистологическое исследование для подтверждения степени выраженности воспалительного процесса. У всех пациентов были определены уровни В1- и Трег-клеток методом проточной цитометрии на цитометре FC500 «Backman Coulter» США.

Исследования показали, что в остром периоде травмы отмечается значительный рост количества как ау-

тоиммунных В-лимфоцитов, так и Тreg. При отсутствии осложнений через месяц оба этих показателя приходят в норму. При осложненном течении и хронизации процесса отмечается стабильно повышенное количество В1-лимфоцитов на фоне сниженного содержания Т-регуляторных клеток. При осложненном течении хронического воспалительного процесса травмированного глаза наблюдается рост В1-лимфоцитов, но не Тreg-субпопуляции. Развитие же симпатического воспаления сопровождается значительным одновременным ростом как аутоиммунного клона В-лимфоцитов, так и Т-регуляторных клеток.

Таким образом, оценка уровней $CD3^+CD5^+CD19^+$ и $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$ клеток может служить дополнительным критерием при дифференциальной диагностике фаз патологического процесса и формирования симпатической офтальмии у пациентов с травмой глаза.

СОДЕРЖАНИЕ АУТОАНТИТЕЛ К БЕЛКУ S100B ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ У ВЗРОСЛЫХ

Мешкова М.Е., Никитин В.Ю., Гранстрем О.К., Тюликов К.В., Малахова Е.А., Задорожний А.А., Новицкая Ю.А., Елисеева М.И.

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

Введение. Известно, что гипоксия мозга и развитие воспаления являются неотъемлемыми факторами, сопровождающими острый период черепно-мозговой травмы (ЧМТ), при этом именно эти факторы могут способствовать развитию вторичных повреждений мозга и неблагоприятных исходов ЧМТ. Наиболее важное значение в посттравматических повреждениях мозга имеет потеря способности организма вовремя восстанавливать целостность гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), в результате чего значительный вклад в развитие патологического процесса ЧМТ может вносить аутоиммунный ответ. В связи с этим представляется чрезвычайно важным поиск показателей, которые позволили бы одновременно оценивать гипоксические повреждения мозга и состояние проницаемости ГЭБ.

Цель исследования: установить корреляционные связи между содержанием аутоантител (АТ) к белку S100B и тяжестью патологического процесса у взрослых пациентов на фоне ЧМТ в остром периоде.

Материалы и методы. Было обследовано 42 пациента с сочетанной ЧМТ: сотрясение головного мозга (СГМ) – 13 человек, ушиб головного мозга (УГМ) различной степени тяжести – 29. Тяжесть ЧМТ оценивали по шкале комы Глазго (ШКГ), исход ЧМТ по шкале исходов Глазго (ШИГ): 1-ая группа – полное выздоровление, 2-ая группа – инвалидизация средней степени и 5-ая группа – летальный исход. Больных с тяжелой степенью инвалидизации и вегетативным состоянием не наблюдали. 26 (64%) пациентов, перенесших легкую ЧМТ, включая СГМ и УГМ (I), имели 13–15 баллов ШКГ и относились к 1-ой группе ШИГ. 10 (24%) больных с УГМ средней степени тяжести (II) – 9–12 баллов ШКГ, а 5 (12%) человек были отнесены к группе с тяжелым УГМ (III) – 3–8 баллов ШКГ. По оценке ШИГ группа пациентов II является неоднородной. В 5-ю группу по ШИГ вошли все пациенты с тяжелой степенью УГМ. Содержание АТ к S100B определяли в сыворотке крови в единицах оптической плотности с помощью набора ГЭБ-ИФА-Тест (ООО «Герофарм») на 1-, 3-, 7-й дни после получения травмы. В случаях УГМ – каждую неделю пребывания в стационаре.

Полученные данные были обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0, с использованием непараметрических методов анализа (тест Манна–Уитни, коэффициент корреляции Спирмена). Среднее значение оценивали с использованием медианы – Me.

Основные результаты. Статистическая обработка данных позволила выявить обратную корреляционную связь между уровнем АТ к S100B и показателями ШКГ ($r = -0,50$), а также прямую корреляцию с показателями ШИГ ($r = 0,42$). При сравнении содержания АТ к S100B в зависимости от тяжести ЧМТ установлено: 1) отсутствие достоверных отличий у пациентов с СГМ и группы I; 2) наличие достоверной разницы у пациентов I и II, а также I и III групп в первые сутки наблюдения ($Me_I = 0,110$; $Me_{II} = 0,215$; $Me_{III} = 0,225$; $p_{I-II} = 0,043$; $p_{I-III} = 0,005$); 3) наличие достоверной разницы у пациентов I и III групп на третьи сутки наблюдения ($Me_I = 0,105$; $Me_{III} = 0,251$; $p_{I-III} = 0,003$).

Заключение. Таким образом, содержание АТ к белку S100B в сыворотке крови взрослых пациентов с ЧМТ, можно рассматривать как дополнительный критерий оценки степени тяжести повреждения мозга.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У ДЕТЕЙ С АРТРИТАМИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Пашнина И.А.^{1,2}, Криволапова И.М.^{1,2}, Козлова Е.С.¹, Скоробогатова О.В.¹

¹Областная детская клиническая больница, г. Екатеринбург, Россия

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

Ювенильные артриты (ЮА) являются разнородной группой хронических заболеваний суставов, имеющих различную этиологию и патогенез. Поиск критериев диагностики этих заболеваний, в том числе дифференциальной диагностики с реактивными артритами, является весьма актуальной задачей, поскольку их лабораторные маркеры до сих пор не определены. Оценка антителопродукции при ЮА значительно менее информативна, чем при ревматоидном артрите взрослых, так как ревматоидный фактор и антитела к цитруллинированным пептидам встречаются у детей весьма редко. Анализ изменения иммунологических показателей и их взаимосвязей друг с другом должен способствовать пониманию роли иммунных механизмов в формировании этих заболеваний.

Целью нашей работы явилось исследование параметров иммунной системы при различных артритах у детей.

Обследованы дети от 7 до 17 лет: 23 ребенка с реактивными артритами (ReA), 35 детей с олиго(пауци)артикулярным ювенильным артритом (о/аЮА), 17 детей с полиартикулярным ювенильным артритом (п/аЮА), 11 детей с ювенильной спондилоартропатией (ЮСА), 20 условно здоровых детей (контроль). Исследовали концентрацию антител к модифицированному цитруллинированному виментину (АМЦВ) и уровень суммарных антинуклеарных антител к 20 экстрагируемым антигенам (АНА-скрининг) методом ИФА, антинуклеарный фактор (АНФ) в реакции непрямой иммунофлюоресценции, количество популяций и субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии, количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу, уровень сывороточных иммуноглобулинов IgAMG.

Установлено, что средний титр АНФ у детей с ЮА превышал контрольный уровень (1/80) в 7–10 раз ($p < 0,01$). Между собой группы детей с ЮА по этому параметру

не различались. При РеА средний титр АНФ также был больше контрольных значений ($1/280$, $p < 0,05$). Диагностические титры АНФ ($1/320$ и более) не были выявлены ни у одного ребенка из контрольной группы. У детей с о/аЮА они обнаруживались наиболее часто — в 69% случаев, из них 50% приходилось на гомогенный тип свечения, 19% — на гранулярный тип. В группе с п/аЮА выявление диагностических титров АНФ составило 65%, гомогенный и гранулярный типы флюоресценции присутствовали в равной пропорции, в 18% случаев гранулярный тип свечения сочетался с цитоплазматическим. У детей с ЮСА АНФ обнаруживался в 55% случаев и чаще имел гомогенный тип свечения. При РеА выявление АНФ составило 39%, из которых по 13% приходилось на гомогенный и гранулярный типы флюоресценции, в 9% наблюдалось сочетание гранулярного и нуклеолярного свечения, у одного ребенка выявлена флюоресценция комплекса Гольджи.

По уровню АНА-скрининга и концентрации АМЦВ различий между выборками не выявлено, что свидетельствует о низкой информативности этих лабораторных тестов. Концентрация сывороточных иммуноглобулинов IgM и IgG в группе с п/аЮА превышала значения этих параметров, как у здоровых детей, так и больных с о/аЮА и ЮСА ($p < 0,05$).

Общее количество лейкоцитов и лейкоцитарная формула в исследованных группах не различались, за исключением увеличения количества моноцитов у детей с о/аЮА по сравнению с контролем (6,4% и 4,5% соответственно, $p < 0,05$). Доля CD8⁺ лимфоцитов была наибольшей в группе с ЮСА (28%) и значительно превышала значения этого параметра в других выборках (контроль: 24%, $p < 0,05$; о/аЮА: 21%, $p < 0,001$; п/аЮА: 21%, $p < 0,001$). Возможно, это отражает большее участие цитотоксических механизмов в патогенезе ЮСА. Число CD19⁺ лимфоцитов у детей с п/аЮА было ниже контрольного (11,1% и 14,4% соответственно, $p < 0,05$). При этом, как указано выше, уровень сывороточных иммуноглобулинов у этих больных был наибольшим.

При оценке корреляционных связей между иммунологическими параметрами у детей с ЮА обнаружена прямая зависимость между титром АНФ и количеством CD19⁺ ($r = 0,44$, $p < 0,001$). Уровень АМЦВ был взаимосвязан с концентрацией иммуноглобулинов IgG ($r = 0,34$, $p < 0,05$), также как и уровень АНА-скрининга ($r = 0,26$, $p < 0,05$).

Таким образом, выявлены различия между группами детей с артритом различной этиологии по частоте встречаемости АНФ и параметрам иммунограммы. Прослежена взаимосвязь между уровнем различных аутоантител и количеством В-клеток и уровнем сывороточных иммуноглобулинов.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Потапова М.В., Савченко А.А., Гринштейн Ю.И.

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН,

г. Красноярск, Россия

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

Ревматоидный артрит (РА) — одно из наиболее распространенных и тяжелых хронических воспалительных заболеваний, которое в краткие сроки приводит к инва-

лидации человека, к высокому проценту нетрудоспособности и сокращению продолжительности жизни пациентов. РА занимает первое место по распространенности среди воспалительных заболеваний суставов и составляет 10% от всех ревматических болезней. Согласно схеме, предложенной Firestein G.S. (2003), патологические процессы при развитии РА протекают в 3 этапа: 1) этап «врожденного иммунитета» — активируются генетически обусловленные иммунные механизмы путем стимуляции дендритных клеток, макрофагов, фибробластов, тучных клеток; 2) этап «адаптивного иммунитета» — происходит генерализация процесса с включением про- и противовоспалительных механизмов; 3) этап деструкции — провоспалительные стимулы побеждают, происходит активация остеокластов с резорбцией костной ткани и внедрение пролиферирующих синовиальных клеток в хрящ. Причем, активность патологических иммунных процессов во многом определяет длительность этапов заболевания и характеризует тип течения РА.

Целью исследования явилось изучение особенности состояния иммунного статуса у женщин с РА в зависимости от типа течения заболевания.

Материалы и методы. Обследованы 115 пациенток в возрасте от 30 до 60 лет, больных РА (суставная форма, активность II-III стадии, средняя длительность заболевания — 9,6 года). Верификация диагноза РА проводилась на основании критериев АРА (1987 г.) и АРР (2007 г.). Были выделены следующие типы течения РА: медленно прогрессирующий (МПРА) — 29 больных, умеренно прогрессирующий (УПРА) — 46 больных, быстро прогрессирующий (БПРА) — 40 больных. В качестве контроля обследовано 118 здоровых женщин аналогичного возрастного диапазона.

Лимфоциты выделяли из гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фиколл-верографина. Методом непрямой иммунофлуоресценции, используя соответствующие FITC-меченые моноклональные антитела фирмы ТОО «Сорбент» (Москва), определяли содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD19⁺ клеток. Дополнительно производили подсчет дифференцировочного индекса (CD4⁺/CD8⁺). Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови изучали методом селективной преципитации в полиэтиленгликоле.

Основные результаты. Установлено, что независимо от типа течения заболевания у больных РА в периферической крови снижено процентное содержание лимфоцитов и CD3⁺ клеток и повышается относительное количество CD19⁺ клеток. Также независимо от типа заболевания в крови больных РА понижено процентное и абсолютное количество CD4⁺ лимфоцитов. Только у больных УПРА повышено абсолютный уровень CD19⁺ клеток. Только у больных БПРА в периферической крови снижены уровни абсолютного количества лимфоцитов, CD3⁺ и CD9⁺ клеток. У больных УПРА и БПРА понижение величины иммунодифференцировочного индекса.

Со стороны гуморального звена иммунной системы у больных РА характерных особенностей в зависимости от типа течения заболевания не обнаружено. При всех типах заболевания у больных РА повышены уровни концентрации IgA, М и G, а также ЦИК.

Заключение. Таким образом, у больных РА наблюдаются нарушения в клеточном звене иммунной системы при повышении параметров гуморального. Состояние клеточного звена при РА определяется снижением содержания Т-лимфоцитов (за счет фракции CD4⁺ клеток), но при повышении количества В-лимфоцитов.

Наиболее выраженные нарушения в клеточном звене наблюдаются у больных с БПРА. У больных данной группы снижение количества Т-лимфоцитов в периферической крови связано также и с фракцией цитотоксических Т-лимфоцитов. При этом, состояние гуморального звена иммунной системы не зависит от типа течения РА.

ПАТОГЕНЕЗ АУТОИММУННОЙ ПУЗЫРЧАТКИ

Свищевская Е.В.

ИБХ РАН, Москва, Россия

Аутоиммунная пузырчатка вызывается формированием аутоантител к молекулам адгезии, экспрессируемых клетками многослойного ороговевающего (кожа) и неороговевающего (слизистая полости рта, пищевод) эпителия. Различают две основные формы аутоиммунной пузырчатки: вульгарную пузырчатку (ВП) и листовидную пузырчатку (ЛП). На долю ВП в России приходится 90% случаев. На начальной стадии заболевания при ВП выявляют аутоантитела к десмосомальному кадгерину десмоглеину 3 (ДСГ3), а при ЛП – к ДСГ1. По мере прогрессирования заболевания появляются антитела, перекрестно реагирующие с ДСГ1 и ДСГ3, соответственно. Белки кадгеринового семейства ДСГ1 и 3 наряду с десмоколлинами (ДСК) 1 и 3 составляют внеклеточную часть десмосомы многослойного эпителия. Прочие белки этой группы (ДСГ2, 4 и ДСК2) экспрессированы в многослойном эпителии на низком уровне. ДСГ и ДСК формируют контакт между соседними клетками многослойного эпителия кожи и слизистых оболочек и могут компенсировать потерю одного из белков, хотя при этом прочность клеточного слоя снижается. В неороговевающем эпителии в базальном слое отсутствует экспрессия ДСГ1/ДСК1, в отличие от эпидермиса, где ДСГ1/ДСК1 присутствуют во всех слоях. Появление аутоантител только к ДСГ3, как это наблюдается на ранних стадиях ВП, приводит к отслоению слизистой оболочки от базальной мембраны и возникновению внутриэпителиальных пузырей. При этом процесса на коже не наблюдается. При наличии аутоантител к ДСГ3 и ДСГ1, наблюдаемом при прогрессировании ВП, возникает расслоение эпидермиса кожи, называемое акантолизом. Антитела к ДСК1 и 3 выявляют редко. Для изучения патогенеза ВП используют эксплантаты кожи неонатальных мышей, в которой ВП антитела вызывают расслоение эпидермального слоя. На эксплантатах кожи взрослых мышей или человека эффект аутоантител не проявляется. Это, по-видимому, связано с явлением гиперадгезии, наблюдаемом во взрослом многослойном эпителии. Ранее нами было показано, что при активации эпителия бактериями ВП антитела вызывают акантолиз во взрослой коже. Целью данной работы было оценить состояние гиперадгезии при активации эпителия, а также определить влияние антител к ДСК1-3 на прочность эпидермиса. Эксплантаты кожи человека, полученные после пластической операции, разрезали на фрагменты 1 см², помещали их в лунки планшета дермой в культуральную среду, эпидермисом вверх в воздушную среду. К эксплантатам добавляли очищенные антитела больных ВП (ВПIgG) или доноров (NhlIgG);

смесь моноклональных мышинных антител к ДСГ1,2,3,4 (аДСГ), к ДСК1,2,3 (аДСК), или нормальные IgG мыши (NmIgG). В ряд лунок добавляли инактивированные бактерии *Micrococcus Lyzodeiktikus* (ML). Кожу инкубировали 24 ч, фиксировали, и получали парафиновые срезы. В Таблице результаты гистологий приведены в баллах от 0 (нет изменений) до 4+ (полное отслоение эпидермиса от базальной мембраны). Для анализа наличия или потери гиперадгезии криосрезы образцов окрашивали антителами к ДСГ3 и анализировали локализацию десмосом с помощью конфокальной микроскопии. В результате эксперимента показали, что акантолиз наблюдается только в образцах с ВПИgG, а также в образцах с аДСГ и аДСК и только в присутствии бактерий ML (табл.).

Для анализа состояния гиперадгезии оценивали локализацию десмосом. Для изучения внутриклеточного трафика десмосом использовали метчик ранних эндосом трансферрин. Показали, что в культурах с ВПИgG, аДСГ и аДСК наблюдается интернализация десмосом и их попадание в ранние десмосомы, что характерно для потери состояния гиперадгезии. Таким образом, мы показали, что антитела больных ВП вызывают акантолиз взрослой кожи только в случае активации клеток эпидермиса, например, ассоциированными с патогенными молекулами. При этом антитела не только к десмоглеинам 1 и 3 могут быть патогенными, но и антитела к десмоколлинам. Механизмом акантолиза является потеря состояния гиперадгезии и интернализация десмосом без их разборки на полудесмосомы. Нами показано, что активация эпидермиса молекулами, ассоциированными с бактериями ML (вероятно, и с другими патогенами тоже), приводит к потере состояния гиперадгезии.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМ ГЕПАТИТОМ

Семикина Е.Л., Ходунова Т.В., Копыльцова Е.А., Пахомовская Н.Л.

Научный центр здоровья детей РАМН, Москва, Россия

Введение. Центральным звеном в патогенезе аутоиммунного гепатита (АИГ) является дефект иммунорегуляции – потеря толерантности к собственным антигенам. Под воздействием разрешающих факторов появляются «запрещенные» клоны лимфоцитов, сенсibilизированные к аутоантигенам печени и осуществляющие повреждение гепатоцитов.

Цель и задачи: изучение субпопуляционного состава лимфоцитов крови у детей с АИГ и сравнение его с референтными показателями.

Материалы и методы. Обследованы 20 детей с АИГ в возрасте старше 7 лет (7-15 лет). Определены субпопуляции лимфоцитов крови и ряд мембранных рецепторов к цитокинам. В качестве групп сравнения (референтных данных) использованы данные литературы о нормальном составе циркулирующих лимфоцитов и показатели собственной группы сравнения 35 здоровых детей того же возраста. Исследование проведено методом проточной цитофлуориметрии в реакции 2-3 цветного флуоресцентного окрашивания (прибор и реагенты

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ СВИЩЕВСКОЙ Е.В.)

	Среда	NhlIgG	ВПIgG	аДСГ	аДСК	NmIgG
Среда	-	-	-	-	-	-
Бактерии ML	-	-	4+	4+	4+	-

BD Biosciences, США). Определен уровень субпопуляций лимфоцитов в процентном соотношении от всех лимфоцитов (лимфоидный регион CD45^{hi+}).

Основные результаты. Абсолютное число лимфоцитов у детей с АИГ колебалось от 1330 до 8140, в среднем $3093,5 \pm 1584,2$, что укладывалось в пределы нормы. Для большинства субпопуляций лимфоцитов у детей с АИГ получены данные, не выходящие за пределы известных нормативов CD3⁺CD4⁺ $44,7 \pm 9,8\%$; CD3⁺CD8⁺ $25,2 \pm 7,8\%$; CD3⁺CD4⁺:CD3⁺CD8⁺ $1,8 \pm 0,5$; CD19⁺ $17,2 \pm 13,2\%$; CD20⁺ $18,4 \pm 14,2\%$. Достоверные различия получены для популяции CD16⁺CD56⁺ у детей с АИГ они составили $5,3 \pm 3,5\%$, (у большинства больных они были ниже 4%), у здоровых детей — $13,8 \pm 4,1\%$ соответственно. При анализе субпопуляционного состава В-лимфоцитов у больных АИГ уровень В1-лимфоцитов и В-лимфоцитов с фенотипом CD19⁺CD10⁺ не отличались от показателей здоровых детей того же возраста. Доля В-лимфоцитов с фенотипом CD19⁺CD10⁺CD5⁺ у больных ($0,4 \pm 0,6\%$) была существенно ниже уровня здоровых детей ($1,2 \pm 1,2\%$), что вероятно связано с проводимой у большинства больных иммуносупрессивной терапией. Уровень В-лимфоцитов с фенотипом клеток памяти (CD29^{hi+}CD27⁺) составил $3,8 \pm 2,4\%$, или $26,0 \pm 13,4\%$ от всех В-клеток — достоверных различий с группами сравнения нет. При определении экспрессии рецепторов (Rc) к цитокинам в качестве группы сравнения использованы собственные данные. В основном экспрессия Rc (Rc гамма-интерферона CD119⁺, фактора некроза опухолей CD120⁺, Rc IL-6 CD126, Rc IL-8 CD128⁺, Rc IL-10 CD210⁺) не отличалась от показателей группы сравнения. Экспрессия Rc IL-2 CD25⁺ у больных отмечена в среднем на $11,7 \pm 4,1\%$ лимфоцитов крови, что статистически достоверно выше, чем у детей группы сравнения $6,3 \pm 4,1\%$.

Заключение. Отсутствие отчетливых различий в субпопуляционном составе лимфоцитов крови у детей с АИГ по сравнению со здоровыми детьми возможно связано с различиями в активности патологического процесса и особенностями проводимой терапии, что требует дальнейшего изучения.

ГИСТАМИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР 4 ТИПА ПРИ СИНДРОМЕ ШЕГРЕНА

Стегаев В.В.¹, Порола П.¹, Хяннинен А.²,
Макиевич З.³, Штарк Х.⁴, Щезот Л.П.⁵,
Конттинен Ю.Т.¹

¹ Институт Клинической Медицины, Университет Хельсинки, Хельсинки, Финляндия

² Университет Турку, Турку, Финляндия

³ Государственный Исследовательский Институт, Центр Инновационной Медицины, Вильнюс, Литва

⁴ Университет И.В. Гёте, Институт Фармацевтической Химии, Франкфурт-на-Майне, Германия

⁵ Центр Интегративной Неврологии, Школа Биологических и Биомедицинских Наук, Университет Дурхама, Дурхам, Великобритания

Введение. Синдром Шегрена (СШ) является аутоиммунным заболеванием с неизвестной этиологией и неясным патогенезом, характеризующимся повреждением и развитием лимфоцитарной инфильтрации главных экзокринных желез, ведущих к симптомам сухого глаза и рта. Одним из явлений этого синдрома является его позднее начало и преобладание женского пола среди па-

циентов (1:9), чья выработка андрогенов существенно снижена по сравнению со здоровыми индивидами. Недавно открытый гистаминовый рецептор 4 типа (H4R) был показан в связи с аутоиммунными процессами. В частности, он был обнаружен во многих гематопоетических клетках, включая антиген-презентирующие дендритные клетки и Т-лимфоциты. При СШ, оснащенные главными комплексами гистосовместимости I, II и ко-стимулирующими молекулами, тубулоэпителиальные клетки могут служить источником аутоантигенов (SS-A/Ro и hY-PHK) в составе микрочастиц и апоптотических тел. Кроме того, в опытах *in vitro* было показано, что синтез андрогенов в мышинных гистамин-дефицитных нокаут моделях нарушен, что указывает на зависимость синтеза половых гормонов от гистамин-опосредованных процессов.

Цель и задачи. Изучить H4R в слюнных железах (СЖ) на мРНК, белковом, а также функциональном уровнях, с целью установления вовлеченности рецептора в физиологические и возможные патогенетические процессы при СШ.

Материалы и методы. В исследование были взяты образцы СЖ контрольной здоровой группы и больных СШ. Кроме того, в работе использовался материал от BALB/c и NOD мышей. Уровни мРНК были измерены при помощи метода количественной ПЦР реального времени. Клеточная экспрессия белка-рецептора была показана путем гистохимического и иммунофлуоресцентного окрашивания. Функциональность рецептора была продемонстрирована скринингом уровней 39 цитокинов в стимулированной H4R-агонистом клеточной культуре поднижнечелюстных желез человека при помощи Multiplex метода, с последующим подтверждением путем ИФА.

Основные результаты. Здоровые СЖ и СЖ от BALB/c содержали мРНК H4R. Рецептор был локализован в клетках ацинусов, вставочных протоков а также в бокаловидных клетках других протоков. Стимулированные H4-агонистом клетки продуцировали набор цитокинов, включая интерлейкин-8 и эндотелиальный фактор роста сосудов. СЖ больных СШ и NOD мышей показали низкую экспрессию H4R по сравнению с контрольными.

Заключение. Несмотря на отсутствие эффективности H1- и H2-антагонистов в лечении аутоиммунных заболеваний, наличие нового высокочувствительного H4 рецептора, как в лимфоцитарных инфильтратах, так и в тубуло-ацинарных клетках, способствует дальнейшему изучению роли гистамина в СШ, а также аутоиммунных заболеваниях в целом.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОЛИГоклонального IgG И СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЛИКВОРА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Суркова Е.А., Лапин С.В., Евдошенко Е.П.

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

В основе патогенеза рассеянного склероза (РС) лежит формирование аутоиммунного воспаления, протекающего за гематоэнцефалическим барьером. Хроническое воспаление характеризуется стимуляцией В-клеток в очаге воспаления, которое приводит к активации синтеза иммуноглобулинов и сопровождается появлением олигоклонального IgG. Сужение спектра иммуноглобулинов

(нарастание олигоклонального синтеза IgG вместо поликлонального) связано с наличием аутоантигенной стимуляции на фоне аутоиммунного хронического воспаления. Выявление олигоклонального синтеза IgG в цереброспинальной жидкости методом изофокусирования в настоящее время рассматривают как «золотой стандарт» диагностики РС. Количественное определение фрагментов иммуноглобулинов (легких цепей) в ликворе, отражающим усиление местного синтеза IgG может служить дополнительным тестом диагностики РС.

В данной работе был проведен сравнительный анализ содержания свободных κ и λ легких цепей в ликворе и сыворотке крови у пациентов с наличием и отсутствием олигоклонального синтеза IgG, а также оценка чувствительности и специфичности данного теста для диагностики РС. В работе были использованы диагностические системы фирмы «Полигност» (Санкт-Петербург, Россия). Обследовано 108 пациентов с олигоклональным синтезом IgG (РС+) и 87 пациентов с отсутствием олигоклонального синтеза IgG в ликворе (РС-). Проведенный ROC-анализ показал, что у РС+ пациентов содержание κ легких цепей в ликворе было достоверно выше ($p < 0,0001$), чем у РС- пациентов. Чувствительность и специфичность теста составляла 83,9 % и 87,1% соответственно. Соотношение содержания κ -цепи сыворотка / κ -цепи ликвор у РС+ пациентов было достоверно ниже ($p < 0,0001$) этого соотношения у РС- пациентов, что подтверждает усиление местного синтеза легких цепей IgG.

Полученные результаты позволяют рекомендовать применять совместное определение олигоклональных IgG и количественное измерение свободных легких цепей каппа типа в ликворе для диагностики РС.

АУТОИММУННЫЙ КОМПОНЕНТ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА И ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Трубицына И.Е., Винокурова Л.В., Чикунова Б.З.

ЦНИИ Гастроэнтерологии, Москва, Россия

Воспаление локальная реакция, которая при увеличении зоны повреждения или частых обострениях хронического заболевания создает условия накопления продуктов распада обладающих антигенными свойствами и иммунных комплексов (ИК). Нарушение фагоцитоза и вывода ИК способствует тому, что воспалительное повреждение тканей сопровождается аутоиммунным компонентом. Происходит дублирование и перекрытие патогенетических связей.

Цель исследования: установить особенности воспалительной реакции в органах, где происходит синтез и секреция протеолитических ферментов, которые способствуют некрозу собственной ткани.

Материал и методы. Экспериментальные исследования проведены на белых крысах (40) весом 180-220 г. У животных воспроизводили острый (ОП) и хронический панкреатит (ХП), язвенное поражение (ЯП) слизистой оболочки (СО) желудка (Ж). Инструментальные и биохимические методы исследования проводили у больных хроническим панкреатитом (67) (ХП), которые находились на лечении в клинике ЦНИИГ.

Результаты и обсуждение. При воспроизведении ЯП Ж и ОП происходит внутритканевая активация протеолитических ферментов, которые становятся агрессив-

ными по отношению к собственной ткани, «расплавляя» ее, увеличивая зону повреждения. В подслизистом слое СО при ЯП площадь и индекс повреждений больше, чем при визуальном осмотре СО. В ткани поджелудочной железы (ПЖ) в период хронизации патологического процесса сохраняются очаги острого воспаления. Повторное повреждение ткани ПЖ вызывает образование антител к ацинарным и париетальным клеткам. Острая язва желудка — антитела к париетальным и ацинарным клеткам. Установлена прямая и обратная связь между поджелудочной железой и слизистой оболочкой желудка. Содержание IFN γ повышено в сыворотке крови $145,6 \pm 7,8$ пг/мл и экстрактах слизистой оболочки желудка и ткани ПЖ $186,7 \pm 8,3$, пг/г ткани контроль $30,2 \pm 2,5$ пг/мл и $50,6 \pm 5,1$ пг/г ткани ($p < 0,05$).

У больных ХП повышено содержание провоспалительных цитокинов (IL-1 β 186 ± 21 , TNF α 279 ± 28 , IFN γ 367 ± 34 , контроль 50 ± 6 пг/мл) в период ремиссии на фоне фиброзных изменений в ткани ПЖ. Антитела к ацинарным и париетальным клеткам.

Заключение. Наличие «собственных» протеолитических ферментов является дополнительным повреждающим фактором для деструкции окружающих тканей, не происходит полного «выздоровления», идет накопление ИК, которые поддерживают иммунное воспаление в поврежденных тканях и органах расположенных рядом.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ДЕТЕЙ

Хайруллина Р.М., Кальметьева Л.Р., Сираева Т.А.

ГУЗ Республиканская детская клиническая больница, г. Уфа, Россия

Одним из перспективных направлений современной нефрологии является определение роли провоспалительных молекулярных медиаторов тканевого повреждения в процессах клеточной пролиферации и патогенезе фиброзно-склеротических изменений почечной ткани. Установлено, что любое повреждение клеток паренхимы почек приводит к продукции моноцитарного хемоаттрактантного протеина 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), который обеспечивает приток лейкоцитов и моноцитов в область повреждения и формирование воспалительного инфильтрата. В настоящее время имеются единичные клинические работы, посвященные особенностям динамики уровня MCP-1 в моче при хронических заболеваниях почек и определению взаимосвязей хемокина с другими маркерами активности процесса.

Целью данного исследования явилось изучение диагностических и прогностических возможностей определения концентраций MCP-1 в моче у детей с нефротическим синдромом.

Материалы и методы. Нами обследовано 83 ребенка в возрасте от 6 до 17 лет. Из них — 25 здоровых детей, составивших контрольную группу и 22 пациента с нефротическим синдромом (НС). Среди обследованных детей с НС в 15 случаях отмечался стероидзависимый (СЗНС) и в 7 — стероидрезистентный (СРНС) варианты. Всем пациентам проводили адекватную иммуносупрессивную терапию (ИСТ) гормональными и/или цитостатическими препаратами (циклоспорин А, азатиоприн, циклофосфан). Уровень MCP-1 определяли в средней порции утренней мочи методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «MCP-

1-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Обследование включало определение концентрации сывороточных иммуноглобулинов (Ig) классов М, G, А, уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК); иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии. Все полученные экспериментальные данные подвергали корреляционно-регрессионному анализу. Статистический анализ проводился с использованием пакета компьютерных программ «Statistica-7», «Excel 8,0», применялись непараметрические методы анализа (ранговый коэффициент корреляции Спирмена и Mann–Whitney Test).

Результаты. При обследовании здоровых детей было установлено, что медиана концентрации МСР-1 в моче составляет 178 пг/мл, 25-75 перцентили 150-210 пг/мл.

У пациентов со СЗНС при сравнении с контролем выявлена достоверно более низкая экскреция МСР-1 — медиана составила 95 (56-158) пг/мл, уровень МСР-1 в моче колебался от 15 до 385 пг/мл. При этом, у 60% детей, получающих длительную ИСТ, концентрация хемокина была в 2 раза меньше нормальных значений. Однако при обострении НС отмечалось умеренное повышение показателя. В ходе корреляционного анализа при обострении СЗНС выявлена зависимость между повышением уровня МСР-1 и выраженностью протеинурии (0,52; $p < 0,05$), позволяющая предположить, что основным патогенетическим механизмом формирования тубулоинтерстициального компонента при СЗНС является протеинурия. Установлены также положительные связи МСР-1 с СОЭ (0,52; $p < 0,05$) и микрогематурией (0,57; $p < 0,05$). Нарастание гипопроотеинемии сопровождалось повышением концентрации острофазного IgM (-0,59; $p < 0,05$). Выявлена отрицательная связь между длительностью приема гормональных препаратов и уровнем ЦИК (-0,50; $p < 0,05$).

У детей со СРНС выявлено достоверное по сравнению с контролем повышение медианы и перцентилей (25-75) значений МСР-1 в моче: 671 и (530-1320) пг/мл соответственно, $p < 0,005$. При повторном обследовании через 1 месяц после начала ИСТ сохранялось стойкое повышение или незначительное снижение экскреции МСР-1 с мочой. Корреляционный анализ выявил положительную взаимосвязь МСР-1 с билирубином (0,785; $p < 0,05$). При этом повышение уровня билирубина коррелировало с иммунологическими маркерами гепатобилиарной дисфункции (гипоиммуноглобулинемией М). Особого внимания заслуживает появление у больных со СРНС системы взаимосвязей, свидетельствующей о снижении функциональной активности почек при нарастании маркеров активности процесса, что в целом было расценено нами как неблагоприятный прогностический признак.

В результате проведенных исследований показано, что концентрация МСР-1 в моче детей с НС коррелирует с активностью воспалительного процесса. Степень и длительность повышения уровня этого хемокина в моче могут быть использованы в качестве прогностических критериев прогрессирования заболеваний, а изменение его концентрации в процессе и по завершению лечения — для оценки эффективности проводимой терапии.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АНТИТЕЛ К ТИРЕОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЕ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С УРОВНЕМ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ У ЖИТЕЛЕЙ Г. АРХАНГЕЛЬСКА

Чуркина Т. С., Лютфалиева Г. Т., Дубинин Ю. А.

Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН, г. Архангельск, Россия

В последние годы интенсивное развитие получило новое научное направление, касающееся изучения аутоантител. Количественное определение антител к собственным антигенам организма широко применяется для диагностики аутоиммунных заболеваний, однако уровень концентрации аутоантител у практически здоровых людей до сих пор остается предметом всесторонних исследований.

Цель исследования: оценить распространенность антител к тиреоидной пероксидазе у жителей г. Архангельска.

Обследовано 182 практически здоровых жителей г. Архангельска от 20 до 80 лет. Выделены возрастные группы 20-39 лет (48 человек), 40-59 лет (43 человека), 60-69 лет (42 человека) и 70-80 лет (49 человек). Методом иммуноферментного анализа определено содержание антител к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО), общего тироксина (tT4) и трийодтиронина (tT3), тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ).

Анализ лабораторных исследований выявил, что уровень содержания циркулирующих IgG антител к ТПО составляет 5,27 (2,65013,51) МЕ/мл с частотой повышенных концентраций в 8,99% случаев, в 15,17% случаев — ниже детектируемых значений. Пределы колебания значений имеют размах от 0,03 МЕ/мл до аномально высоких — 748,33 МЕ/мл. Уровни антител к ТПО в выделенных группах не превышают границы физиологического предела. Установлено увеличение содержания аутоантител с возрастом ($r = 0,23$, $p < 0,01$). Достоверные изменения в содержании антител к ТПО наблюдали при сравнении уровня в возрастной группе 20-39 лет по отношению к уровню антител в группах 60-69 лет ($p < 0,001$) и 70-80 лет ($p < 0,05$); в группе 40-59 лет к группе 60-69 лет ($p < 0,05$). Максимальные концентрации аутоантител регистрируются в 60-69 (8,17 (4,08-19,36) МЕ/мл) и 70-80 лет (8,17 (4,08-13,51) МЕ/мл).

В возрастных группах на фоне максимальных для нашего исследования концентраций антител к ТПО зарегистрирован максимальный уровень tT4. Концентрации tT4 выше в 60-69 лет ($8,64 \pm 0,42$ мкг/дл) и 70-80 лет ($8,33 \pm 0,41$ мкг/дл) при сравнении с возрастной группой 20-39 ($5,21 \pm 0,35$ мкг/дл) и 40-59 лет ($5,14 \pm 0,37$ мкг/дл; $p < 0,001$). Максимальная концентрация tT3 зарегистрирована в возрастной группе 70-80 лет (1,51 (1,34-1,84) нг/мл) и достоверно отличается от других исследуемых групп ($p < 0,05$).

В результате проведенного корреляционного анализа установлены положительные взаимосвязи между антителами к ТПО и tT4 ($r = 0,44$; $p < 0,01$), tT3 ($r = 0,16$; $p < 0,05$), и ТТГ ($r = 0,30$; $p < 0,01$).

Таким образом, анализ лабораторных исследований жителей г. Архангельска выявил большую вариабельность концентраций АТ-ТПО, что свидетельствует о напряжении иммунных механизмов регуляции в неблагоприятных климатогеографических условиях. Концентрации АТ-ТПО увеличиваются с возрастом. Установлено, что в возрастных группах максимальные концентрации АТ-ТПО регистрируются на фоне повышенных концентра-

ций тироксина, что обуславливает необходимость дальнейшего изучения роли аутоантител в регуляции метаболизма тиреоидных гормонов.

ВЛИЯНИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ АУТОАНТИТЕЛ НА ТИРЕОИДНЫЙ СТАТУС

Шашкова О.А., Руденко И.Я., Климович В.Б.

ФГУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗСР РФ, Санкт-Петербург, Россия

Одним из компонентов иммунной системы здоровых интактных животных являются естественные аутоантитела (ЕАА), большинство из которых полиреактивны, обладают низким аффинитетом и принадлежат к классу IgM. Роль ЕАА в становлении патологических процессов и их отличие от аутоантител ассоциированных с заболеваниями остаются недостаточно изученными. Четко установленным различием между естественными и выявляемыми при патологии аутоантигенами является их эпитопная специфичность. К числу аутоантигенов, с которыми взаимодействуют аутоантитела в норме и при патологии, относится тиреоглобулин (Тг). Иммунизация животных Тг является одним из способов индукции аутоиммунного тиреоидита в эксперименте. При аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы наблюдают инфильтрацию органа-мишени лимфоидными клетками, нарушение синтеза тиреоидных гормонов, содержание аутоантител против Тг возрастает по сравнению с нормой.

Для изучения биологической роли ЕАА среди полученных в лаборатории мышинных МКАТ против Тг были отобраны три реагента, обладающие свойствами ЕАА. Каждое из них распознает отдельную антигенную детерминанту Тг мыши и конкурирует с ЕАА, содержащимися в сыворотке нормальных интактных мышей.

С помощью отобранных МКАТ оценили влияние ЕАА на тиреоидный статус мышей линии генетически восприимчивой к индукции аутоиммунного тиреоидита при инъекциях Тг (SJL/j).

Было проведено три серии эксперимента. Мышам первой группы вводили по 0,02 мг МКАТ в полном адьюванте Фрейнда и через 14 суток такое же количество в неполном адьюванте. Животным второй группы вводили по 0,25 мг МКАТ в фосфатно-солевом буфере с интервалом 2-3 суток в течение двух недель, затем им вводили 0,05 мг Тг в полном адьюванте, а через две недели – в неполном. Мышам контрольной группы вводили только Тг по той же схеме, что и в группе 2. На 42 и 49 сутки от начала эксперимента получали образцы сыворотки крови и ткани щитовидной железы. Срезы железы окрашивали гематоксилином и эозином. В сыворотке крови определяли концентрацию общего тироксина (Т4) (иммуноферментная тест-система АлкорБио, Россия). Полученные данные сравнивали с показателями тиреоидного статуса интактных мышей.

Нативная структура ткани щитовидной железы сохранялась у мышей, которым вводили только МКАТ 6С12 или Тг. Во всех остальных случаях в 1 и 2 эксперименте наблюдали, главным образом, уплощение тиреоцитов и увеличение размеров фолликулов по сравнению с нативной структурой ткани. Инфильтрация ткани щитовидной железы развивалась при инъекциях МКАТ 1В1 на фоне иммунизации Тг на 49 сутки после первого введения МКАТ.

Содержание Т4 по сравнению с интактными животными: 1) снижалось при введении мышам МКАТ без Тг; 2) увеличивалось при иммунизации Тг как на фоне инъекций МКАТ, так и без них.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что ЕАА могут принимать участие в развитии тиреоидной патологии, по крайней мере, в изменении структуры органа-мишени и функциональной активности железы. Поскольку наиболее серьезное нарушение (лимфоидная инфильтрация) было выявлено при введении только одного из МКАТ в сочетании с Тг, можно предположить, что избыток ЕАА, распознающих отдельные эпитопы Тг, и самого аутоантигена приводит к нарушению толерантности за счет формирования ими иммунных комплексов, последующей презентации патогенетических антигенных детерминант и, соответственно, запуску аутоиммунной патологии.

ПОЛИМОРФИЗМ ПРОМОТОРА ГЕНА $TNF\alpha$ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИЦИТОКИНОВОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Шкаруба Н.С.¹, Силков А.Н.¹, Калашникова Т.А.², Сизязкина Л.П.², Шульман Ю.Б.³, Долгих С.В.³, Мазуров В.И.³, Горева Е.П.¹, Герцог О.А.¹, Сизиков А.Э.¹, Лопатникова Ю.А.¹, Сенников С.В.¹

¹ НИИКИ СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

² ГОУ ВПО Рост ГМУ, г. Ростов-на-Дону, Россия

³ ГОУ ДПО СПб МАПО, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Одним из механизмов влияния генетического полиморфизма на функцию генов может являться изменение структуры промотора, приводящее к изменению экспрессии гена. Индивидуальные, генетически детерминированные, особенности экспрессии цитокинов могут быть как причиной разной выраженности иммунных реакций, так и фактором предрасположенности к заболеваниям. Известно, что мощный провоспалительный цитокин – $TNF\alpha$ имеет повышенный уровень при многих системных воспалительных заболеваниях, который ассоциируется с определенными аллельными вариантами этого гена.

Задачами работы являлось изучение связи полиморфизма промоторного региона гена $TNF\alpha$ с уровнем его секреции, исследование ассоциации аллельных вариантов гена $TNF\alpha$ у больных ревматоидным артритом (РА), а также определение эффективности анти- TNF терапии РА у больных несущих разные аллельные варианты этого гена.

Материалы и методы. В исследование были включены условно здоровые доноры (n = 234), больные РА (n = 287) и больные РА, которым было проведено 6 инфузий ремикейда (n = 102). Мононуклеарные клетки (МНК) выделялись из периферической крови (150 человек) в градиенте плотности фиколл-урографина, культивировались (1 млн/мл) в присутствии или отсутствии 10 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) или конканавалина А (КонА). Определение содержания $TNF\alpha$ в полученных кондиционных средах осуществлялось методом иммуноанализа с детекцией сигнала на электрохемилюминесценции Origen Analyser (Igen Inc., USA). Генотипирование полиморфных вариантов в позициях -238, -308, -376, -857, -1031 промотора гена $TNF\alpha$ проводили используя ПДРФ-анализ продуктов ПЦР. Эффективность анти- TNF терапии оценивали по критериям EULAR у больных РА при проведении 6 инфузий анти- TNF антител. Различия частот аллелей и генотипов устанавливалось с использованием кри-

терия χ^2 и точного критерия Фишера. Связь генотипов с уровнем продукции тестировали, применяя критерии Крускала–Уоллиса (H) и Манна–Уитни (U).

Результаты. Продукция TNF α в культурах интактных МНК у носителей генотипа -238GG была сниженной в сравнении с гетерозиготами -238GA (H = 3,8; U = 540, p = 0,05), в то же время усиление продукции этого цитокина при стимуляции клеток митогеном КонА было более выраженным (H = 3,95; U = 529, p = 0,046). Носители минорного аллеля Т также характеризовались более выраженным усилением продукции TNF α при стимуляции клеток КонА (U = 1489; p = 0,047) в сравнении с гомозиготами -857CC. При анализе сочетаний генотипов выявлен генотип -238GG/-308GG/-857CC/-1031NC, отличающийся наименьшей продукцией TNF α . Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов показал, что генотип CC полиморфизма -857C>T встречается чаще у здоровых лиц ($\chi^2 = 4,1$; p = 0,04). Сравнительный анализ данных по эффективности анти-TNF терапии показал, что аллель -857C и генотип -857CC чаще выявляется у больных с отрицательным ответом на терапию ($\chi^2 = 4,4$; p = 0,03).

Заключение. Генотип -857CC ассоциирован с пониженной продукцией TNF α , реже встречается у больных РА и может быть использован в качестве маркера неэффективной терапии РА анти-TNF антителами.

Работа выполнена при поддержке: ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК № 02.740.11.0707) и РФФИ (09-04-13620 офи-ц).

РОЛЬ $\gamma\delta$ Т-ЛИМФОЦИТОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ IgA-НЕФРОПАТИИ

Юркевич М.Ю., Нижегородова Д.Б.,
Пилотович В.С., Комиссаров К.С., Багатка С.С.,
Зафранская М.М.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Беларусь

В качестве триггерного механизма развития IgA-нефропатии (IgAN) рассматривается нарушение функционирования иммунной системы слизистых, заключающееся в продукции B1 (CD19⁺CD5⁺) клетками патогенного IgA и активации Т-лимфоцитов с $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором ($\gamma\delta$ Т-лимфоциты). Являясь одной из основных клеточных субпопуляций слизистых, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты способны регулировать иммунный ответ, проявляя хелперную и цитотоксическую функции, влияя на продукцию антител и поддержание иммунологической толерантности. Данные относительно роли $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов при развитии IgAN противоречивы, с одной стороны, они рассматриваются как клеточная популяция-активатор синтеза «патогенного» IgA и, с другой стороны, как популяция иммунорегуляторных клеток.

Целью работы явилось оценка функциональной активности субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с IgA-нефропатией в присутствии и отсутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.

Методы. Мононуклеары периферической крови пациентов с IgAN культивировали в течение 6-ти дней в присутствии и отсутствии популяции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в условиях митогенной (фитогемагглютинин — ФГА, 2,5 мкг/мл) стимуляции. Удаление $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из пула мононуклеаров проводилось с использованием

метода иммуномагнитной сепарации. Оценку количества $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и уровня экспрессии субпопуляциями Т-лимфоцитов главного комплекса гистосовместимости (HLA DR) и внутриклеточного фактора некроза опухоли- α (TNF α) проводили на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter, США).

Результаты. Для пациентов с IgAN характерна тенденция к снижению в периферической крови количества $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов по сравнению со здоровыми донорами (2,3 (1,6 ÷ 3,5) % и 5,2 (1,9 ÷ 7,2) %, соответственно, (p = 0,09)) и достоверное увеличение экспрессии маркера поздней активации клеток — HLA-DR на всех субпопуляциях Т-лимфоцитов (p < 0,05).

При удалении $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из культуры МПК и последующем культивировании клеток установлено достоверное снижение экспрессии HLA-DR как на нестимулированных, так и на митоген-активированных CD3⁺Т-лимфоцитах, в основном за счет CD8⁺Т-клеток. Уровень экспрессии HLA-DR на нестимулированных CD8⁺Т-лимфоцитах в присутствии и отсутствии $\gamma\delta$ Т-клеток составлял 9,75 (7,9 ÷ 10,8) % и 5,25 (4,5 ÷ 5,8) %, соответственно (p < 0,05). При неспецифической активации клеток количество HLA-DR — экспрессирующих CD8⁺Т-лимфоцитов возрастало до 10,25 (9,2 ÷ 11,8) % и достоверно снижалось до 8,8 (7,2 ÷ 9,3) % в случае отсутствия в культуре активированных Т-клеток популяции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (p < 0,05).

Определение количества Т-лимфоцитов, продуцирующих TNF α , в присутствии и отсутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов выявило аналогичную закономерность. Количество TNF α -позитивных CD3⁺Т-лимфоцитов в присутствии $\gamma\delta$ Т-клеток составляло 94,5 (93,4 ÷ 96,3) %, при активации ФГА — 99,4 (98,8 ÷ 99,7) %, в отсутствии $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессия TNF α снижалась на нестимулированных CD3⁺Т-лимфоцитах до 81,6 (79,9 ÷ 89,2) %, (p < 0,05) и на клетках в условиях неспецифической активации до 95,4 (92,7 ÷ 96,3) % (p = 0,07).

Таким образом, при развитии IgA-нефропатии Т-лимфоциты с $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором опосредуют активацию Т-клеточного звена иммунного ответа, влияя на количество HLA-DR-позитивных субпопуляций Т-лимфоцитов и уровень экспрессии Т-клетками про-фибриногенного цитокина — TNF α , являющегося основным митогеном клеток почечных клубочков.

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ПРИ САРКОИДОЗЕ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Яздовский В.В., Чуксина Ю.Ю., Москалец О.В.,
Терпигоров С.А., Бурдакова Ю.А.

ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

С целью выявления иммунологических прогностических маркеров течения саркоидозного процесса была проведена оценка количества лимфоцитов периферической крови (ПК) (CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19⁺, CD3⁺CD16⁺CD56, CD3⁺CD16⁺CD56, CD3⁺HLA-DR⁺, CD4⁺/CD25⁺), а также уровень сывороточного неоптерина у 97 пациентов, страдающих саркоидозом органов дыхания. Методы исследования - 4-цветная проточная цитофлюориметрия, иммуноферментный анализ.

Все пациенты были распределены на группы в зависимости от фазы активности заболевания (активный и неактивный), пациенты с активным саркоидозом были распределены по характеру течения на группы с острым, стабильным и прогрессирующим заболеванием.

В группе пациентов в активной фазе саркоидоза выявлено существенное ($p < 0,05$) снижение количества $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов, снижение индекса иммунорегуляции (ИРИ), увеличение содержания естественных клеток-киллеров (ЕКК) и субпопуляции Т-NK ($p < 0,05$) и более выражено увеличение содержания активированных Т-клеток ($CD3^+HLA-DR^+$) ($p < 0,001$) по сравнению с неактивной фазой заболевания. При активном саркоидозном процессе имеется снижение Т-цитотоксической субпопуляции лимфоцитов по сравнению с нормальными значениями.

Фаза стабилизации саркоидоза характеризовалась нормализацией содержания цитотоксической субпопуляции Т-клеток, но максимально высоким уровнем $CD3^+HLA-DR^+$ лимфоцитов ПК ($13,6 \pm 4,1\%$). Уровень $CD4^+/CD25^+$ лимфоцитов $6,3 \pm 1,2\%$ не отличался от нормальных значений ($3,7 \pm 2,1\%$).

Прогрессирование саркоидоза может сопровождаться усилением процессов фиброобразования легочной ткани и развитием функциональных нарушений. При прогрессирующем саркоидозе органов дыхания независимо от наличия или отсутствия фиброзных изменений легочной паренхимы выявлено существенное ($p < 0,05$) снижение числа Т-лимфоцитов, как $CD3^+CD4^+$, так и $CD3^+CD8^+$, по сравнению с показателями у практически здоровых лиц.

Содержание популяции NK-Т лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов

$CD3^+HLA-DR^+$ было существенно повышено в обеих группах пациентов с прогрессированием, причем без развития фиброзных изменений это увеличение выражено в большей степени ($p < 0,01$), чем при фиброзировании.

Повышенный уровень неоптерина был выявлен при остром активном, а также прогрессирующем течении заболевания, со стабильным течением саркоидоза увеличения его уровня не отмечено.

Выводы: наиболее информативными показателями активности саркоидозного процесса при исследовании ПК являются: повышенный уровень ЕКК, Т-NK, $CD3^+HLA-DR^+$ лимфоцитов при низких количественных значениях иммунорегуляторных клеток. Существенное повышение уровня неоптерина, как показателя воспалительной реакции, может служить дополнительным лабораторным критерием для назначения или коррекции дозы кортикостероидов.

РОЛЬ ANCA И ASCA В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

Лазебник Л.Б., Сагынбаева В.Э.

Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии департамент здравоохранения, Москва, Россия

Для дифференциальной диагностики болезни Крона (БК) и язвенного колита (ЯК) могут быть использованы определение ANCA (антитела к цитоплазме нейтрофи-

лов) и ASCA (антитела к *Saccharomyces cerevisiae*). При БК чувствительность составляет 75% для IgG к ASCA и 60% для IgA к ASCA. При ЯК IgG к ASCA 5%, IgA к ASCA – 7%. Распространенность ANCA варьирует от 50% до 90% при ЯК, от 10% до 20% при БК.

Цель исследования: изучение роли ANCA и ASCA в дифференциальной диагностике при воспалительных заболеваниях кишечника.

Материал и методы. Обследовано 50 больных с ВЗК, из них 27 с ЯК (18 мужчин, 9 женщин) и 23 больных с БК (15 мужчин, 8 женщин). Возраст больных 16-60 лет, средний возраст – $38,0 \pm 2,6$ (М $\pm\sigma$).

Диагноз верифицирован данными клинических, лабораторных, гистологических и инструментальных методов исследования. Аутологичные антитела к цитоплазме нейтрофилов определяли в сыворотке крови больных иммуноферментным методом с применением тест-систем «Euroimmun» (Германия). Антитела (IgA и IgM) к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) определяли в сыворотке крови больных иммуноферментным методом с применением тест-систем «Orgentec» (Германия). Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерной программы «STATISTICA 6.0».

Результаты. Среди 20 больных ВЗК у 7 (35%) обнаружено увеличение содержания антител IgG к антигенам структурам нейтрофилов.

При ЯК среди 15 больных повышение содержания аутоантител к антигенам цитоплазматических структур нейтрофилов выявлены у 6 чел (40%), среди 5 больных БК обнаружены у 1 чел (20%).

Содержание аутоантител к антигенам цитоплазматических структур нейтрофилов в среднем достигало: аутоантитела к протеиназе – $3 - 2,3 \pm 0,8$, к эластазе нейтрофилов – $1,1 \pm 0,1$. Повышение содержания аутоантител к антигенам цитоплазматических структур нейтрофилов обнаружено при ВЗК с тотальным поражением и непрерывно рецидивирующим течением.

При ВЗК среди 18 больных БК антитела к *Saccharomyces cerevisiae* обнаружены у 11 чел (61,1%). Среди больных БК антитела класса IgA к *Saccharomyces cerevisiae* обнаружены (9 чел, 50%). Антитела класса IgG к *Saccharomyces cerevisiae* обнаружены у 8 чел (44,4%). У 6 больных (33,3%) одновременно обнаружены положительный титр антител класса IgA и IgG к *Saccharomyces cerevisiae*. Содержание антител класса IgA к *Saccharomyces cerevisiae* в среднем составило $49,0 \pm 13,3$, антител класса IgG к *Saccharomyces cerevisiae* – $26,1 \pm 5,4$ Ед/мл.

Выводы. 1. ЯК и БК сопровождаются повышенной циркуляцией аутоантител к антигенам цитоплазмы нейтрофилов и к *Saccharomyces cerevisiae*, что имеет важное диагностическое и прогностическое значение, а также позволяет судить об интенсивности и продолжительности аутоиммунных реакций. 2. Комбинация двух серологических тестов ANCA и ASCA помогает осуществлять быструю и неинвазивную дифференциальную диагностику БК и ЯК.