

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КОПАКСОНА, *ENTEROCOCCUS FAECIUM* L3 И МЕМАНТИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ У КРЫС

Абдурасулова И.Н.^{1,2}, Тарасова Е.А.¹,
Мацулевич А.В.¹, Людыно В.И.¹, Кудрявцев И.В.^{1,3},
Серебрякова М.К.^{1,4}, Житнухин Ю.Л.¹, Ермоленко
Е.И.¹, Клименко В.М.¹

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет

³Школа биомедицины, Дальневосточный федеральный
университет, Владивосток

⁴Национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики,
Санкт-Петербург, Россия

Рассеянный склероз (РС) — хроническое демиелинизирующее заболевание ЦНС с присутствием аутоиммунного компонента. Это заболевание поражает людей трудоспособного возраста, а эффективных способов лечения до настоящего времени не существует. Одним из широко используемых в клинике препаратов является копаксон — смесь синтетических полипептидов 4-х аминокислот. Однако данный препарат имеет недостаточную эффективность. Доказанная гибель нейронов при РС указывает на необходимость использования нейротрофических факторов. С другой стороны, в последнее время кишечная микробиота рассматривается в качестве этиологического фактора РС, так как стимулирует образование большого количества Th17, играющих ключевую роль в патогенезе РС. Общепринятой моделью РС является экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), поскольку воспроизводит клинические симптомы и имеет сходные с РС патогенетические механизмы. Исходя из вышеизложенного следует, что для лечения РС необходима комплексная терапия.

Цель исследования — оценить фенотипы циркулирующих в крови клеток у крыс с ЭАЭ на фоне применения копаксона, пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3 и мемантина.

Методы. ЭАЭ индуцировали у самок крысоднократной подкожной инъекцией гомогената спинного мозга в ПАФ. Лечение начинали через сутки после индукции ЭАЭ. Копаксон вводили подкожно в дозе 4 мг/кг, пробиотик — внутримышечно в дозе $2,5 \times 10^8$ КОЕ/крысу/день, мемантин — в дозе 30 мг/кг внутривентрикулярно. Крысы контрольных групп вместо препаратов получали апиогенный физиологический раствор (ФР) соответствующим способом. Эффективность препаратов оценивали по снижению тяжести заболевания, увеличению

латентного периода и сокращению длительности заболевания по сравнению с контрольными группами. На 0, 7, 14 и 28 дни после индукции (д.п.и.) в крови определяли фенотипы клеток методом проточной цитофлуориметрии. Использовали набор антител — CD3, CD4, CD8, CD161, CD25, FoxP3, CD45RA (Biolegend). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном двумя диодными лазерами 488 и 638 нм.

Результаты. У 97% крыс контрольных групп, получавших ФР после индукции ЭАЭ развивался ЭАЭ, после лечения копаксоном или пробиотиком — у 77,4% и 77,8%, соответственно, то есть, оба препарата снижали заболеваемость на 20 %. Копаксон и пробиотик также увеличивали латентный период (на 4 дня) и сокращали длительность заболевания (на 8 и 7,5 дней, соответственно). То есть копаксон и пробиотик оказывали сходное протективное действие. Мемантин не влиял на заболеваемость, латентный период и длительность заболевания, но сокращал тяжесть заболевания. Интересно, что при совместном использовании копаксона с пробиотиком и пробиотика с мемантином протективный эффект сильно ослабевал, причем сильнее в первом случае.

При анализе клеточного состава оказалось, что копаксон и пробиотик на одинаковой фазе ЭАЭ стимулируют разные типы клеток. При лечении копаксоном на 7-ой день (латентный период) доля клеток с фенотипом CD3+CD4+ Т-клеток уменьшалась, а при использовании пробиотика — увеличивалась, а уменьшалась на 14 и 28 день. Противоположное действие наблюдалось для CD3+CD8+ Т-клеток. Интересно, что копаксон увеличивал число регуляторных клеток CD4+CD25+FoxP3+ в течение всего периода ЭАЭ. Пробиотик увеличивал другую популяцию клеток CD4+CD25+FoxP3-. Следует отметить, что иммуномодулирующее действие мемантина в основном наблюдалось на 28 день, но такие же изменения отмечались в контрольной группе. Исключение составляют клетки с фенотипом CD3+CD4+CD8+ которые увеличивались на 7-ой день только в этой группе. На 14 день, как и под действием а, мемантин увеличивал число CD4+CD25+FoxP3+ Т-клеток и уменьшал число CD4+CD25+FoxP3-.

На основании полученных результатов можно сделать **выводы:**

1. Копаксон и пробиотический штамм *Enterococcus faecium* L3 обладают сопоставимым протективным действием, однако достигают этого через антагонистические регуляторные пути.

2. Протективное действие мемантина реализуется, вероятно, в ЦНС, а на периферии опосредуется CD4+CD25+FoxP3+ Т-клетками и CD3+CD4+CD8+.

3. Для комплексного использования препаратов необходимо проверять их иммунорегуляторный потенциал

и подбирать схемы с учетом естественного развития патологического процесса и модулирующих свойств препаратов.

СПОСОБНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ К ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ НА ФОНЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Акулова С.С., Семикина Е.Л., Филянская Е.Г.,
Закиров Р.Ш., Маянский Н.А., Валиева С.И.,
Бзарова Т.М.

ФГБНУ Научный центр здоровья детей, Москва, Россия

Введение: В современной детской ревматологии ведущее место в лечении ювенильного идиопатического артрита (ЮИА) занимает использование генно-инженерных биологических препаратов, позволяющих точно воздействовать на ключевые звенья патогенеза. Изучение функциональных резервов иммунной системы при длительном применении такой терапии является актуальной задачей для оценки возможностей противoinфекционной защиты.

Материалы и методы: В исследование было включено 18 пациентов с ЮИА (8 девочек и 10 мальчиков) в возрасте от 2 до 12 лет. В лечении всех детей использовались генно-инженерные биологические препараты (ингибиторы TNF- α (инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт), абатацепт, ритуксимаб и тоцилизумаб) в комбинации с метотрексатом. Средняя длительность терапии биологическими агентами составила 3,8 лет. Все пациенты обследованы в состоянии ремиссии. Контрольную группу составили 12 здоровых детей; группы были сопоставимы по возрасту и полу. В культуре клеток цельной крови определялась концентрация цитокинов методом мультиплексного анализа по технологии Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США, программа Bio-Plex Manager, тест-системы Bio-Plex Human Cytokine). Оценивалась спонтанная и стимулированная выработка цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, G-CSF, IFN- γ , TNF- α , а также индекс стимуляции (отношение уровня продукции цитокинов после стимуляции ФГА к уровню их спонтанной выработки). Анализ результатов проводили в пакете программ «Statistica 6.0.» (StatSoft Inc., Tulsa, Ok, USA). Статистический анализ различия независимых переменных, неподчиняющихся закону нормального распределения, осуществляли с использованием критерия Манн-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты: Спонтанный уровень IL-2 не имел статистически значимых различий у пациентов с ЮИА, по сравнению со здоровыми; продукция IL-2 после стимуляции была выше, чем у здоровых детей (медиана 132,2 пг/мл (1 и 3 квартили 104,8 и 266,8) против 68,5 пг/мл (57,7; 80,8) соответственно ($p=0,002$). Индекс стимуляции для IL-2 также был достоверно выше у детей с ЮИА (150,5 (19,2; 168,4) и 8,3 (6,0; 12,0) соответственно ($p=0,006$). Уровень спонтанного синтеза IL-4 был выше у здоровых (1,0 (0,4; 1,65) пг/мл и 2,5 (2,1; 2,8) пг/мл соответственно ($p=0,0006$), стимулированная продукция практически не отличалась в обеих группах, а индекс стимуляции продукции IL-4 был выше у детей с ЮИА (21,3 (6,0; 31,5) и 4,6 (3,8; 5,2) соответственно ($p=0,006$). Спонтанный синтез IL-6 и IL-8 был выше у здоровых детей (1077,1 (262,2; 2174,1) пг/мл и 356,4 (34,1; 303,7) пг/мл соответственно ($p=0,01$) и 8036,8 (56,43; 19420,1) пг/мл и 2426,7 (1346,2; 5543,2) пг/мл соответственно ($p=0,006$).

Статистически значимых различий стимулированной продукции для данных цитокинов обнаружено не было. Индексы стимуляции для IL-6 и IL-8 также не различались у детей обеих групп. Уровень спонтанного синтеза IL-10 не отличался у пациентов с ЮИА и детей контрольной группы, стимулированный синтез и индекс стимуляции IL-10 был значительно выше у здоровых детей (23,8 (16,9; 65) пг/мл и 119,1 (76,1; 276,9) пг/мл соответственно ($p=0,002$) и 11,3 (6,6; 15,9) пг/мл и 72,0 (27,6; 117,7) пг/мл соответственно ($p=0,01$). Спонтанная продукция G-CSF и IFN- γ у пациентов с ЮИА была значительно ниже, чем в контрольной группе (10,5 (7,81; 14,1) пг/мл и 15,1 (12,5; 193,3) пг/мл соответственно ($p=0,03$) и (42,08 (16,6; 66,1) пг/мл и 83,7 (57,2; 112,3) пг/мл ($p=0,01$) соответственно. Стимулированный синтез данных цитокинов не отличался у детей в обеих группах. Индекс стимуляции G-CSF также не имел значимых различий у здоровых и больных ЮИА детей. В свою очередь, индекс стимуляции IFN- γ был значительно выше у пациентов с ЮИА (39,1 (15,6; 111,8) и 8,7 (6,3; 18,0) соответственно ($p=0,002$). Спонтанная продукция TNF- α была выше у детей контрольной группы (33,0 (67,4; 142,1) пг/мл и 111,0 (67,4; 142,1) пг/мл соответственно ($p=0,01$). Различий в стимулированной выработке данного цитокина выявлено не было, также как и различий индекса стимуляции.

Заключение: Проведенное сопоставление спонтанной и стимулированной продукции цитокинов свидетельствует об относительно сохранной функции лимфоцитов у обследованных больных ЮИА. Для G-CSF и IFN- γ отмечена высокая стимулированная продукция, компенсирующая изначально низкие их уровни, что может говорить о повышенной реактивности организма. Отсутствие статистически значимых различий уровней стимулированной продукции цитокинов у больных ЮИА и здоровых детей свидетельствует о том, что иммуносупрессивная терапия биологическими препаратами, проводимая в строгом соответствии с современными протоколами, позволяет поддерживать сохранную реактивность системы клеточного иммунитета даже при длительном проведении терапии.

К ВОПРОСУ О ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АУТОИММУННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПЕЧЕНИ

Базарный В.В., Партылова Е.А., Михайлова Е.Ю.,
Гаренских Н.В.

ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия

В диагностике аутоиммунных заболеваний печени (АИЗП) «золотым стандартом» принято считать патоморфологическое исследование гепатобиоптата. К другим диагностическим тестам относят детекцию аутоантител, прежде всего — антиядерных (ANA), антимитохондриальных (AMA) и некоторых других (Лапин С.В., Тотолян А.А., 2010; Bowlus C.L. et al., 2014; Liberal R., et al., 2014). В частности, обсуждается целесообразность использования в лабораторной практике определения антител к асиалогликопротеиновым рецепторам (anti-ASGPR).

Цель работы — оценить диагностическую значимость определения аутоантител при аутоиммунном поражении печени.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 15 пациентов с АИЗП — аутоиммунным гепатитом и первичным билиарным циррозом, 28 паци-

ентов с холестатическим и алкогольным циррозом печени (ЦП). Диагноз был установлен на основании стандартных клинико-лабораторных критериев и верифицирован морфологически. Группа сравнения состояла из 36 человек, у которых диагноз аутоиммунного заболевания, а также активная стадия хронических воспалительных процессов были исключены.

Всем обследованным наряду со стандартными лабораторными тестами выполняли определение сывороточных иммуноглобулинов иммунотурбидиметрическим методом, а также исследовали уровень антител (иммуноглобулинов G) к экстрагируемым ядерным антигенам (anti-ENA), AMA и anti-ASGPR методом твердофазного иммуноферментного анализа на полуавтоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal Lab» с использованием тест-систем «Orgentic ENA-combi», «Orgentic AMA-M2» и «anti-ASGPR» (Medipan). Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Biostat (версия 4.03). Диагностическую информативность тестов определяли на основе ROC-анализа (программа AtteStat, версия 12.0.5).

Результаты и их обсуждение. У пациентов с АИЗП содержание AMA и ANA было повышено при сопоставлении с группой сравнения, где данные показатели не выходили за пределы нормальных значений. В нашем исследовании мы не установили существенного повышения уровня anti-ASGPR при аутоиммунной патологии печени, как это было сделано другими авторами (Hausford G et al., 2009; Rigopoulou E et al., 2012).

При оценке диагностической ценности изучаемых показателей наиболее информативным оказался уровень AMA-M2 (диагностическая чувствительность = 73%, диагностическая специфичность = 100%). Для anti-ASGPR эти показатели составили 60% и 70% соответственно.

Содержание сывороточных иммуноглобулинов существенно не изменялось в крови у пациентов с АИЗП и не может расцениваться в качестве диагностического теста. Однако, при ЦП аутоиммунной этиологии в стадии компенсации (классы А и В по Чайльд-Пью) уровень иммуноглобулина М был ниже, чем при алкогольном циррозе, а в стадии декомпенсации он повышался. При этом титр органоспецифических аутоантител падал. Возможно, указанные данные могут быть использованы при мониторинге пациентов.

Таким образом, в проведенном исследовании мы не обнаружили преимуществ теста на наличие anti-ASGPR при АИЗП перед уже существующими, и целесообразность его использования в клинической практике требует уточнения.

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЦИТАРНОГО ТИРЕОИДИТА

Биктагирова Э.М.¹, Саттарова Л.И.¹, Вагапова Г.Р.², Скибо Ю.В.¹, Кравцова О.А.¹, Абрамова З.И.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия

² Казанская государственная медицинская академия «Росздрава», Казань, Россия

На модели заболевания хронический лимфоцитарный тиреоидит изучена корреляционная зависимость между биохимическими и иммунологическими маркерами программируемой клеточной гибели (апоптоза) и функциональным состоянием щитовидной железы

(гипер, эу-, гипотиреоз). В качестве основных маркеров были выбраны аннексин V, TRAIL и TNF- α , а также ДНК-гидролизующие антитела. Материалом для исследования служили образцы сыворотки венозной крови 298 женщин: группа больных с диагнозом ХЛТ составила 161 женщина в возрасте от 20 до 60 лет, группа контроля — 137 условно здоровых доноров без аутоиммунной патологии.

Определение уровня аннексина V, TNF- α , и TRAIL в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов согласно инструкции фирмы-производителя («BenderMedSystem», Vienna, Austria). Определение уровня антител к нативной (АТ к нДНК) и к денатурированной ДНК (АТ к дДНК) проводили методом ИФА, используя геномную ДНК (Human Genomic DNA, Promega, США). Определение ДНКазной активности антител к ДНК проводили в реакции *in vitro*, используя в качестве субстрата коммерческий препарат ДНК плазмиды pBR322 штамма *E.coliXL-1Blue* (ООО «СибЭнзим», г. Москва). ДНК-гидролизующую активность в препаратах АТ анализировали путем слежения за превращением сверхспирализованной плазмидной ДНК в релаксированную кольцевую или линейную форму. Дополнительным критерием при постановке диагноза служили данные по иммунофенотипированию лимфоцитов (определение на поверхности лимфоцитов венозной крови маркеров дифференциации (CD4⁺/CD8⁺)), полученные методом проточной цитофлюориметрии на проточном цитометре «FACSCalibur» («BectonDickinson», США) с применением пакетного анализа «MultiSetTM» и коммерческого набора «MultitestIMKKit» («BectonDickinson», США). Для статистического анализа полученных данных применяли дисперсионный анализ, используя критерии Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса, с поправкой Бонферрони. Взаимосвязь между параметрами оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

В ходе анализа показано достоверное увеличение доли субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов в группе больных ХЛТ на фоне значительного снижения доли субпопуляции Т-супрессоров по сравнению со здоровыми ($p < 0,05$). Среднее соотношение Т-лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺ у больных было в два раза выше (Ме 2,05, ДИ 1,22–0,89) по сравнению с группой здоровых лиц (Ме 0,99, ДИ 0,009–0,01). Установлено повышение уровня TRAIL в сыворотке крови у больных ХЛТ (гипертиреоз > гипотиреоз > эутиреоз) с по сравнению со здоровыми. Установлено достоверное увеличение АТ к дДНК у 97% больных ХЛТ по сравнению с контролем ($P = 0,001$, 95%ДИ 0,34–0,41). Из них у 75% при гипертиреозе, 84,7% — эутиреозе и 85% при гипотиреозе. В общей выборке больных ХЛТ обнаружена тенденция к увеличению АТ к нДНК, не достигшая уровня достоверности. Активность АТ с гидролизующей активностью обнаруживает корреляционную зависимость с явлениями дисфункции ЩЖ.

ФОСФОЛИПИДЫ ЭРИТРОЦИТОВ, ПЛАЗМЫ КРОВИ, СУРФАКТАНТА И КОАГУЛЯЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ

Брындина И.Г., Уракова М.А., Лебедева Н.В.

«Ижевская государственная медицинская академия» МЗ РФ, Ижевск, Россия

Антифосфолипидный синдром (АФС) представляет собой аутоиммунную патологию, связанную с форми-

рованием антител против фосфолипидных клеточных детерминант. При этом среди клинических проявлений АФС наряду с артериальными и венозными тромбозами, привычным невынашиванием беременности наблюдаются признаки поражения висцеральных органов, в том числе дыхательной системы (Stojanovich L., 2006). Учитывая тот факт, что основным компонентом легочного сурфактанта, определяющим его поверхностно-активные свойства, являются фосфолипиды, а также участие легких в регуляции коагуляционного потенциала крови, целью исследования стало изучение фракционного состава фосфолипидов эритроцитарных мембран, плазмы крови, сурфактанта, а также гипокоагуляционной активности легких при экспериментальном АФС. В связи с целью определены следующие задачи: 1) изучить поверхностно-активные свойства и состав фосфолипидов сурфактанта легких; 2) исследовать изменения фракционного состава фосфолипидов в притекающей и оттекающей от легких крови; 3) выявить изменения фосфолипидного спектра мембран эритроцитов; 4) изучить изменения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) в притекающей и оттекающей от легких крови.

Эксперименты выполнены на 18 белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. АФС моделировали ($n=9$) путем подкожного введения кардиолипинового антигена в суммарной дозе 0,2–0,4 мг на крысу через день в течение трех недель (H. Nomura et. al., 1997). В качестве контроля использовали животных ($n=9$), которым вводили изотонический раствор NaCl по той же схеме. Спустя 3 недели у всех крыс определяли фракционный состав фосфолипидов и АЧТВ в притекающей к легким (венозной) и оттекающей от них (артериальной) крови. В эти же сроки путем трехкратного лаважа 0,9% раствором NaCl получали бронхо-альвеолярные смывы (БАС), в которых определяли содержание общих фосфолипидов (Комаров Ф.И., 1981). Фосфолипидный спектр артериальной (арт) и венозной (вен) крови, эритроцитов, легочного сурфактанта — фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидная кислота (ФК), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ) определяли с помощью тонкослойной хроматографии (Кондрахин И.П., 2004). Для изучения поверхностно-активных свойств легких измеряли статическое, минимальное, максимальное поверхностное натяжение (ПН) БАС.

Было выявлено, что АФС сопровождался характерным для данной патологии увеличением АЧТВ как артериальной, так и венозной крови на 455 и 654 % соответственно по сравнению с контролем ($p<0,05$), при этом коэффициент АЧТВ арт/АЧТВ вен снижался на 36 % ($p<0,05$). Можно предположить, что снижение гипокоагуляционной активности легких, в норме оказываемое на кровь при прохождении ею малого круга кровообращения, связано с образованием антител как к компонентам системы гемостаза, так и к клеткам эндотелия. Исследование фосфолипидного спектра плазмы крови показало увеличение в артериальной крови (после легких) по сравнению с венозной (до легких) фракции ЛФХ ($p<0,05$). Наряду с этим, в артериальной крови происходило уменьшение доли СМ и ФИ на фоне уменьшения фракции ФЭА в эритроцитах ($p<0,05$). Изучение сурфактанта легких выявило уменьшение фракции ФХ на 26% и увеличение ЛФХ на 400% на фоне снижения общего количества альвеолярных фосфолипидов по сравнению с контрольными значениями ($p<0,05$). При этом наблю-

далось повышение статического, минимального, максимального поверхностного натяжения БАС на 14%, 33% и 10% соответственно ($p<0,05$).

Таким образом, экспериментальный АФС сопровождается нарушением гипокоагуляционной активности легких на фоне изменения фракционного состава фосфолипидов в артериальной и венозной крови, а также в мембранах эритроцитов. Наблюдаются нарушения количественного и качественного состава альвеолярных фосфолипидов, что приводит к ухудшению поверхностно-активных свойств легких.

ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Валеева А.Р., Абдулхаков Р.А., Абдулхаков С.Р., Валеева И.Х., Скороходкина О.В.

ГБОУ ВПО Казанский ГМУ, Казань, Россия

Введение: К аутоиммунным заболеваниям, поражающим желудочно-кишечный тракт человека, относятся язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК). Данные нозологии составляют группу воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). ВЗК занимают одно из ведущих мест в мире в структуре болезней желудочно-кишечного тракта по тяжести течения, частоте осложнений и летальности. В настоящий момент, аутоантигены, на которые развивается иммунный ответ при ВЗК, остаются неизвестными. Несмотря на многолетнюю историю изучения, патогенез ВЗК раскрыт недостаточно.

Цель: Оценить уровень некоторых цитокинов в сыворотке крови у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

Материалы и методы: В сыворотке крови 52 пациентов ($m=21$, $ж=31$, средний возраст — 37,5 лет, средний возраст начала заболевания — 31 год) с ВЗК, изучено содержание фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа), интерлейкинов 10 и 23 (ИЛ-10, ИЛ-23).

Результаты: Содержание в сыворотке крови ФНО-альфа оказалось повышенным у 24 из 52 (47%) больных (у 15 пациентов (62,5%) с ЯК и у 9 (37%) пациентов с БК), нормальным — у 28 (53%) пациентов, уровень ИЛ-10 — повышенным у 45 (86,5%), нормальным — у 7 (13,5%) пациентов, содержание ИЛ-23 было повышено у 90,7% пациентов с ВЗК.

Выводы: У большинства пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона наблюдается повышенное содержание в сыворотке крови ФНО-альфа, ИЛ-10, ИЛ-23, причем, эти изменения выявляются чаще при язвенном колите, чем при болезни Крона.

СЕКРЕЦИЯ IL-1 β И ФАКТОРОВ РОСТА ФИБРОБЛАСТАМИ ДЕТЕЙ С ВЗК

Васильева Е.А., Толкачева Н.И., Тутина О.А., Рожденкин Е.А.

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

Введение. Для воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) — болезнь Крона и язвенный колит — характерно неконтролируемое воспаление слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, приводящее к развитию осложнений в виде стенозов, свищей, перфорации ки-

шечника, кровотечения и малигнизации. Патогенез ВЗК до конца неясен, в развитие болезни вовлечено множество факторов, в том числе гены, иммунная система, микрофлора кишечника. Направление течения заболевания (фистулизирующая или стенозирующая форма, репарация пораженного участка) во многом зависит от основных элементов соединительной ткани, участвующих в регенерации ткани — фибробластов. Они активно секретируют факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса, обладают сильнодействующим иммуномодулирующим эффектом.

Цель исследования: провести сравнительный анализ секрета фибробластов, полученного от детей с ВЗК и условно здоровых детей.

Пациенты и методы. В исследовании использованы дермальные фибробласты, выделенные от четырех детей с болезнью Крона, четырех детей с язвенным колитом и трех условно здоровых детей (контрольная группа) в возрасте 12-17 лет. От всех участников и их родителей было получено письменное информированное согласие, исследование одобрено этическим комитетом и ученым советом института. Критериями включения пациентов были возраст, отсутствие других аутоиммунных заболеваний и педиатрический индекс активности болезни Крона и язвенного колита (PCDAI/PUCAI = 10-20 баллов). Первичные культуры дермальных фибробластов получали из биоптатов кожи предплечья путем ферментативной обработки по стандартной методике. Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% ЭТС (ПанЭко, Россия), 0,33 мг/мл L-глутамина (ПанЭко, Россия), 55 Ед/мл пенициллина и 55 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Замену среды проводили каждые 3-4 дня, пассировали до 6 пассажа. Иммунофенотипирование фибробластов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS CantoII (Becton Dickinson, США). Использован набор моноклональных антител для определения мезенхимальных стромальных клеток — CD73, CD105, CD90, гемопоэтических клеток — CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR (BD Bioscience, США). Оценку уровня цитокинов в культуральной среде проводили методом Elisa тест-системами Bender Medsystems (Австрия), R&S (США) согласно инструкции производителя.

Результаты. Культуры клеток, полученные от здоровых детей, детей с болезнью Крона и язвенным колитом, имели сходную фибробластоподобную морфологию. Жизнеспособность культур клеток составила ≥97%. Результаты иммунофенотипирования свидетельствовали о наличии поверхностных CD-кластеров, характерных для мезенхимальных стромальных клеток: CD90+, CD73+, CD105+, экспрессия маркеров гемопоэтических клеток — CD45-, CD34-, CD11b-, CD19-, HLA-DR — отсутствовала. В ходе исследования установлено, что фибробласты детей с болезнью Крона и язвенным колитом по сравнению с контрольной группой значительно выше и статистически значимо секретируют IL-1β, IL-1RA, средние значения концентраций которых составили соответственно: 1,43 пг/мл, 184,05 пг/мл; 1,24 пг/мл, 251,95 и 0,59 пг/мл, 97,13 пг/мл (p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,0001). Уровень PDGF-BB в культуральной среде составил: язвенный колит — 20,42±3,36 пг/мл; болезнь Крона — 18,19±2,97 пг/мл; контрольная группа — 15,07±3,45 пг/мл. Физиологический уровень IL-1β, секретируемый фибробластами здоровых детей, находится в прямой корреляционной зависимости с факторами роста — TGF-β, EGF, G-CSF,

FGFb, PDGF-BB (R = 0,62, R = 0,67, R = 0,57, R = 0,63, R = 0,58, p < 0,05, соответственно). В группе детей с язвенным колитом также выявлена прямая корреляционная зависимость для IL-1β и TGF-β, VEGF, PDGF-BB (R = 0,65, R = 0,44, R = 0,58, p < 0,05, соответственно). Напротив, обратная корреляционная связь между IL-1β и факторами роста выявлена для фибробластов детей с болезнью Крона — EGF, G-CSF, VEGF (R = -0,52, R = -0,42, R = -0,44, p < 0,05, соответственно).

Заключение. В ходе исследования выявили статистически значимое увеличение уровня секреции фибробластами ангиогенных факторов PDGF-BB в обеих группах пациентов и VEGF в группе детей с болезнью Крона в сравнении с условно здоровыми детьми. В пределах нашей выборки статистически значимых различий для показателей TGF-β, SCF в группах сравнения не обнаружено. Полученные данные свидетельствуют о наличии регенераторного потенциала фибробластов детей с болезнью Крона и язвенного колита сопоставимого с фибробластами условно здоровых детей и дают возможность рассматривать их в качестве кандидатов для клеточной терапии.

ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АНТИТЕЛ К ГЛИКОПРОТЕИНУ 2 У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Волкова М.В.¹, Роггенбук Д.²

¹ Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

² Бранденбургский технический университет, Германия

Актуальность. Аутоиммунные заболевания характеризуются повреждением тканей и потерей функции вследствие иммунного ответа, направленного против собственных органов. Широко обсуждается роль поврежденного кишечного барьера в индукции аутоиммунных процессов. Эпителиальный барьер кишечника, совместно с кишечной-ассоциированной лимфоидной тканью и нейроэндокринной системой обеспечивает равновесие между толерантностью к собственным тканям и иммунным ответом к чужеродным антигенам.

Гликопротеин 2 (ГП2) является протеином зимогенных гранул поджелудочной железы и был идентифицирован как главный аутоантигенная цель для так называемых панкреатических антител. В недавних исследованиях продемонстрировано, что ГП2 экспрессируется на апикальной поверхности эпителиальных клеток тонкого кишечника и играет значительную роль во взаимодействии хозяин-микроорганизм и формировании специфического иммунного ответа на поверхности слизистой оболочки. Антитела в ГП2 продемонстрировали диагностическую значимость при болезни Крона. Анти-ГП антитела выявлены у 25-30% пациентов с болезнью Крона и у 5-12% пациентов с язвенным колитом. Данные антитела могут продуцироваться у пациентов с ревматическими заболеваниями и быть одним из звеньев, связывающих кишечное воспаление и развитие системного аутоиммунного процесса.

Цель исследования: определить частоту встречаемости антител к гликопротеину 2 классов А и G у пациентов с ревматическими заболеваниями.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 163 пациента с ревматическими заболеваниями. Группа пациентов со спондилоартропатиями состояла из 87 человек и включала 64 пациента с анкилозирующим спондилитом (АС) и 23 пациента с псориатическим артритом

(ПсА). В группу пациентов с воспалительными артритом из 66 человек были включены 47 пациентов с ревматоидным артритом (РА) и 19 пациентов с неклассифицированным артритом (НА). Все пациенты соответствовали соответствующим современным классификационным критериям. Контрольную группу составили 160 здоровых доноров.

Уровни анти-ГП антител (иммуноглобулины классов А и G) определяли методом иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного человеческого ГП2 ((Medipan GmbH, Германия). Положительными результатами считали уровень ≥ 20 единиц в миллилитре, согласно инструкции производителя.

Результаты. Частота встречаемости анти-ГП 2 IgA была выше у пациентов со спондилоартритами (39/87, 44.82%) чем у пациентов с воспалительными артритом (11/66, 22.72%) ($p=0.009$) и в контрольной группе (6/160, 3.75%) ($p < 0.001$). При сравнении уровней антител в подгруппах оказалось, что при ПсА наблюдалась более высокая частота встречаемости анти-ГП 2 IgA (13/23, 56.52%) по сравнению с РА (12/47, 25.53%, $p=0.02$) и НА (3/19, 15.78%, $p=0.02$). Однако частота встречаемости анти-ГП 2 IgA при ПсА не отличалась от частоты встречаемости этих антител при АС (26/64, 40.65%, $p>0.05$).

Анти ГП 2 IgG чаще встречались у пациентов со спондилоартритами (17/87, 19.54%) и воспалительными артритом (9/66, 13.63%) по сравнению с контрольной группой (4/160, 2.5%) ($p<0.001$). В подгруппах при ПсА установлена более высокая частота встречаемости анти-ГП 2 IgG (9/23, 37.5%) по сравнению с АС (8/64, 12.5%, $p=0.019$). В то же время частота встречаемости анти-ГП 2 IgG, тогда как при РА и НА не отличалась от данного показателя в других подгруппах (7/47, 14.89%; 2/19, 10.52%, $p>0.05$ соответственно).

Выводы. Анти-ГП2 антитела являются новыми маркерами, которые специфичны для болезни Крона. Данные антитела были обнаружены приблизительно у 35% пациентов с ревматическими заболеваниями. Наиболее высокая частота встречаемости анти-ГП 2 антител установлена при псориатическом артрите.

Полученные результаты раскрывают новые взаимосвязи между кишечным воспалением и развитием аутоиммунных заболеваний. Для уточнения данных закономерностей необходимо продолжить работу в данном направлении.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ С КЛИНИЧЕСКИ ИЗОЛИРОВАННЫМ СИНДРОМОМ

Гончарова З.А., Беловолова Р.А., Харитонов М.В., Ярош Н.М., Мегерян В.А.

ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Введение: Рассеянный склероз (РС) — аутоиммунное заболевание, характеризующееся многоочаговой демиелинизацией центральной нервной системы. Течение заболевания весьма вариабельно, различные особенности клинической картины и МРТ картины могут иметь разное прогностическое значение. Неблагоприятным для прогноза является полисистемное начало, в меньшей степени — двигательные нарушения с симптоматикой поражения проводников мозжечка и ствола мозга, тазовые нарушения, ранние нейропсихологические из-

менения. Благоприятный прогноз наблюдается в случаях с длительной первой ремиссией (более 1 года) с моносимптомным началом при дебюте с чувствительных нарушений или оптического неврита. МРТ предикторы течения РС — наличие большого количества очагов, а также локальная и диффузная атрофия вещества головного мозга коррелируют с неблагоприятным прогнозом. Развитию клинически достоверного РС предшествует первая атака, что расценивается как клинически изолированный синдром (КИС) моно- или полифокальный вариант. Диагностика на ранних этапах, когда отсутствует «диссеминация во времени», затруднена, поэтому определенное значение с учетом аутоиммунной природы заболевания могут иметь иммунологические тесты.

Цель и задачи: изучение иммунологического статуса и его особенностей у больных с КИС с целью улучшения диагностики и оптимизации терапии.

Материалы и методы: обследовано 30 больных с диагнозом КИС на базе клиники РостГМУ за период 09.2014 по 03.2015. Были исключены состояния, вызывающие изменение иммунного статуса (воспалительные и инфекционные заболевания, антифосфолипидный синдром, аутоиммунные заболевания). Клинический осмотр и лабораторные обследования больных проводили в период обострения до начала терапии. Больным выполнено определение относительного количества популяции и субпопуляции лимфоцитов (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD16+, CD3+CD19+) периферической крови по степени экспрессии кластеров дифференцировки (CD) с помощью реакции непрямой иммунофлуоресценции, с учетом результатов на проточном лазерном цитофлуориметре марки «FC 500», производитель Becton Coulter (США), с использованием соответствующих моноклональных антител производство Becton Coulter (США). Определение НСТ-теста интенсивности кислородзависимого метаболизма в нейтрофилах. Определение сывороточных иммуноглобулинов методом радиальной иммуннодиффузии. Определение циркулирующих иммунных комплексов методом преципитации в 4,16% растворе ПЭГ.

Результаты: иммунологические изменения характеризовались дисбалансом факторов врожденного и приобретенного иммунитета. Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов проявлялись увеличением общего количества Т-лимфоцитов за счет лимфоцитов с маркерами CD3+CD4+, увеличением общего количества В-лимфоцитов (CD3-CD19+) и их аутореактивного клона (CD19+CD5+). Реакция со стороны врожденного иммунитета проявлялась снижением экспрессии HLA DR, Toll 2 и увеличением Toll 9- рецепторов на моноцитах. Существенных изменений в содержании сывороточных иммуноглобулинов и метаболической активности нейтрофилов не выявлено. Уровень циркулирующих иммунных комплексов в пределах 70.0 ± 3.5 Ед.

Выводы: у больных с КИС изменение иммунологических параметров свидетельствует о заинтересованности клеточного звена иммунитета и формировании аутоиммунного компонента. Клинические предикторы течения РС, в сочетании с лабораторными данными могут быть не только динамическими критериями лечения рассеянного склероза, а также являться доступными прогностическими маркерами течения РС. Для разработки тактики лечения больных необходимо дальнейшее изучение патогенетических, иммунологических, клинических особенностей течения заболевания.

ДИНАМИКА ИММУННОГО СТАТУСА НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ДИСКРЕТНЫМ ПЛАЗМАФЕРЕЗОМ У ПАЦИЕНТОВ С МИАСТЕНИЕЙ

Дударев И.В., Гончарова З.А., Милованова О.В.

ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Миастения является аутоиммунным заболеванием, которое характеризуется нарушением нервно-мышечной передачи, развитием патологической мышечной утомляемости. Миастения приводит к частой инвалидизации. В патогенезе ведущую роль играет образование антител (АТ). Наиболее изучены антитела к ацетилхолиновым рецепторам (АХР). Однако наряду с появлением аутоантител, в иммунном статусе происходят значительные изменения как в гуморальном, так и в клеточном звене.

В настоящее время активно изучаются и выявляются других аутоантител, помимо АТ к АХР, АТ к постсинаптическому белку миелину, цитокинам, мышечной тирозинкиназе, риаинодиновым рецепторам скелетной мускулатуры. Эффективным методом в структуре лечения миастении является терапевтический аферез (категория ASFA 2010-1, уровень доказательности — I).

Целью исследования является изучить особенности изменения в иммунном статусе у пациентом после проведения процедуры дискретного плазмафереза, определить наличие корреляционной связи между изменением в иммунном статусе, уровнем антител к ацетилхолиновым рецепторам (АХР), АТ к ганглиозидам и состоянием пациентов.

Материал и методы. С 2012 по 2014 год в неврологическом отделении клиники РостГМУ проходило стационарное лечение 43 пациента в период обострения заболевания, в возрасте от 18 до 76 лет (средний возраст $47,1 \pm 13,1$). Количество женщин преобладало — 29 (67,5%). Диагноз был подтвержден на догоспитальном этапе инструментальными методами исследования (ЭНМГ, СКТ средостения), фармакологическими тестами. Оценка тяжести состояния проводилась по шкалам QMGs (R.J. Varohn, 2000 г.). MGFA (Jaretzki A., 2000 г.). Все пациенты получали антихолинэстеразные препараты, 39 получали глюкокортикостероиды. До начала курса стационарного лечения пациентам проводилось исследование общего иммунного статуса, определение концентрации АТ к АХР, MAG, ганглиозидам в сыворотке крови. Аналогичное исследование проводилось при завершении курса терапии. Всем пациентам проводился дискретный плазмаферез. Курс составлял 4-5 процедур с интервалом 2-3 дня и общим объемом плазмозамещения 2-2,5 объема циркулирующей плазмы.

Результаты и обсуждение. У 38 человек была генерализованная форма миастении, у 5 (11,6%) глазная форма. Согласно шкале MGFA до курса лечения пациенты по тяжести распределились следующим образом: 1 — 2 (4,6%) пациента, 2а — 2 (4,6%), 2в — 5 (11,7%), 3а — 5 (11,7%), 3в — 13 (30,2%), 4а — 8 (18,6%), 4в — 7 (16,3%), 5 — 1 (2,3%). После проведенного лечения регресс бульбарной симптоматики отмечался у 19 пациентов, дыхательных нарушений у 5, уменьшение слабости мышц шеи у 9. Согласно шкале MGFA после лечения преобладало количество пациентов в группе с 2а баллами — 9 (20,9%), 2в — 11 (25,6%), 3а — 8 (18,6%). У 42 пациентов до начала лечения АТ к АХР были повышены, их уровень варьировался от 1,986 до 16,85 (норма $<0,5$ нмоль/л). Уровень ганглиозидов до начала лечения в среднем составил

GA1 — 31,8%, GM1 — 8,68%, GM 2 — 29,3%, GD1a — 10,4%, GD1b — 9,6%, GQ1b — 6%. уровень ЦИК повышен у 82% и составил $89 \pm 8,2$ у.е. Отмечалось увеличение CD3 Т-лимфоцитов (82% пациентов), тенденция к повышению уровня CD4 Т-хелперов (у 67%). После проведенного курса плазмафереза значительно снизился средний показатель GM1 (6,2%) у пациентов, уровень остальных ганглиозидов не претерпел значимых изменений. Отмечалась тенденция к снижению уровне АТ к АХР, однако у некоторых пациентов уровень аутоантител остался примерно прежним при наличии клинически положительной динамики. Показатель ЦИК снизился у всех пациентов, однако отмечалась тенденция к увеличению показателя CD4 больше начального значения (у 76%).

Таким образом при проведении обследования пациентов в период обострения определяется изменения в иммунитете, соответствующие аутоиммунному процессу. На фоне проводимого курса дискретного плазмафереза достигнута значительная положительная динамика, определяются тенденции к снижению общего количества аутоантител. Показатель АТ к АХР может являться одним из диагностических критериев для установки диагноза, однако не всегда его значение соответствует клиническому проявлению заболевания. Достоверной корреляционной связи между уровнем аутоантител к ганглиозидам и тяжестью заболевания не выявлено, но увеличение показателя GM2 и значительного колебания GM1 на фоне лечения определяет необходимость дальнейшего более узкого исследования данных ганглиозидов у пациентов с миастенией.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ И РАСТВОРИМЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ФАКТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУНОГО ТИРЕОТОКСИКОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Здор В.В., Маркелова Е.В.

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», Владивосток, Россия

Патогенез аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (АИЗЩЖ) реализуется с помощью иммунных механизмов, в роли аутоантигенов выступают в основном тиреоидная пероксидаза, тиреоглобулин, рецептор тиреотропного гормона [Дедов И.И., 2000; Effraimidis G., 2014]. До сих пор не ясна регуляторная роль тиреоидных гормонов и цитокинов в иммунопатогенезе АИЗЩЖ, при которых всегда фиксируются изменениями в тиреоидном статусе и дисбаланс в уровне цитокинов. **Цели и задачи:** определение взаимосвязи тиреоидного и цитокинового статуса животных при экспериментальном тиреотоксикозе для уточнения иммуногенных и иммунорегуляторных свойств тиреоидных гормонов. **Материалы и методы:** исследование выполнено на 30 взрослых крысах Вистар с массой тела 245 ± 15 грамм. Оценивались сывороточные и органые уровни (супернатант щитовидных желез) цитокинов: ИЛ-1 β , ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-10 методом твердофазного ИФА (видоспецифичные диагностические наборы “R&D Diagnostics Inc.”); показатели уровня свободных Т3, Т4. Методы обезболивания, декапитации проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Статистический анализ результатов проводился при помощи программы SPSS v.16. Результаты: в контрольной группе свободные Т3 ($5,25 \pm 1,65$ пмоль/л) и Т4 ($15,73 \pm 2,29$ пмоль/л) достоверно отличались от группы с тирео-

токсикозом ($7,25 \pm 1,05$ пмоль/л и $52,43 \pm 12,17$ пмоль/л соответственно) $p < 0,05$. Сывороточный ИЛ-1 β при тиреотоксикозе достоверно превышал показатели здоровых крыс (Ме 15,42 (0,80 – 38,20) пг/мл против 1,90 (0,01 – 8,98) пг/мл, U-критерий равен 46; $p < 0,05$). ИФН- γ был достоверно высок в опытной группе по сравнению с контролем (Ме = 19,58 (10,06 – 68,32) пг/мл против 5,96 (4,41 – 10,06) пг/мл; U-критерий равен 34; $p < 0,01$). При тиреотоксикозе отмечалось достоверное превышение сывороточного ИЛ-10 над показателями в контрольной группе: 16,59 (11,80 – 28,08) пг/мл против 5,62 (2,68 – 18,20) пг/мл, критерий Манна-Уитни 22,5 ($p < 0,01$). Уровень ФНО- α в контрольной и опытной группах достоверно не отличался. При сравнении уровней цитокинов в супернатантах достоверной разницы между опытной и контрольной группами выявлено не было, но содержание ИЛ-1 β , ИФН- γ , ИЛ-10, ФНО- α в супернатанте было достоверно более высоким, чем в сыворотке крови ($p < 0,01$). Коэффициент ИФН- γ / ИЛ-10 в сыворотке и в супернатантах у здоровых крыс составил: в сыворотке 1,1 и в супернатанте 0,7; при тиреотоксикозе коэффициент резко изменялся в сторону увеличения: 1,2 и 11,35 (соответственно), более достоверно он увеличился в супернатанте, что является крайне интересным и свидетельствует о локальной активации Th1-лимфоцитов. **Заключение:** 1. Достоверное увеличение уровня оппозитных цитокинов при непродолжительном тиреотоксикозе свидетельствует о высокой иммуногенности тиреоидных гормонов, и вторичности изменений в системе иммунитета. 2. Равнозначное в норме соотношение Th1/Th2 цитокинов при экспериментальном тиреотоксикозе достоверно менялось в сторону Th1- цитокинов, и наиболее выражено в органе-продуценте тиреоидных гормонов.

ЦИТОКИНЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ В ПРОЦЕССЕ Т-КЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

Иванова И.П., Селедцова Г.В., Шишков А.А.

НИИФКИ, Новосибирск, Россия

Целью настоящего исследования стало изучение иммунологических механизмов, лежащих в основе Т-клеточной вакцинации при аутоиммунных заболеваниях.

Работа была выполнена в рамках протокола клинических испытаний, утвержденного Ученым советом и одобренного Этическим комитетом НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Иммунотерапевтическое лечение было проведено 39 больным церебро-спинальной формой и вторично-прогрессирующим течением РС в воз-

расте от 23 до 54 лет. Индуцирующий курс иммунотерапии состоял из 4 еженедельных подкожных Т-клеточных вакцинаций. Поддерживающее лечение включало в себя вакцинации с интервалом в один месяц. Таким образом, пациенты получали поликлональную Т-клеточную вакцину в течение 2 лет. Концентрацию цитокинов (IFN γ , IL-4, IL-17, IL-18, IL-10) в образцах сыворотки крови определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем компании «Вектор-Бест» (Кольцово, Новосибирская область).

Согласно данным, представленным в таблице, через два года после начала иммунотерапии у 19 обследованных пациентов наблюдалось снижение сывороточного уровня IFN γ и увеличение уровня IL-4. В то же время данные настоящего исследования свидетельствуют, что поликлональная Т-клеточная вакцинация не оказывала существенного влияния на уровень сывороточного IL-17 и IL-18, однако в группе вакцинированных больных было отмечено достоверное увеличение уровня сывороточного IL-10.

Эти данные указывают на перестройку Т-клеточного ответа в сторону доминирования Th2-иммунных реакций. Можно предполагать, что системная хелперная перестройка является необходимым условием для формирования идиотип-специфического иммунного ответа. С другой стороны, индуцируемая Т-клеточной вакцинацией Т-хелперная перестройка, по-видимому, не затрагивает существенным образом продукцию IL-17 и IL-18, которые, согласно литературным данным, могут играть важную роль в развитии аутоиммунного воспаления. В целом, наши данные указывают на важность системных иммунологических сдвигов у вакцинированных больных РС, общий вектор действия которых направлен на сдерживание патологических воспалительных процессов в организме.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К МОДИФИЦИРОВАННОМУ ЦЕТУРИНИРОВАННОМУ ВИМЕНТИНУ ПРИ ЮВЕНИЛЬНОМ АРТРИТЕ

Исмаилова А.З., Кайлина А.Н., Шмаров В.А., Малащенко В.В., Меньяло М.Е., Газатова Н.Д., Тодосенко Н.М., Мельников А.Е., Мелашенко О.Б.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия
ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск, Россия

Введение: ювенильный артрит (ЮА) — обобщающее понятие, объединяющее гетерогенную группу хрониче-

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ В ПРОЦЕССЕ Т-КЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНАЦИИ (N=19) (К ТЕЗИСАМ ИВАНОВОЙ И.П. И ДР.)

Цитокины	До лечения	Т-клеточная вакцинация (месяцы)		
		6 мес	12 мес	24 мес
IFN γ , пг/мл	144,0 $\pm$ 46,7	182,6 $\pm$ 82,2	44,09 $\pm$ 29,7**	25,18 $\pm$ 13,0**
IL-4, пг/мл	11,7 $\pm$ 2,98	16,6 $\pm$ 4,26	26,18 $\pm$ 11,15*	77,1 $\pm$ 33,8**
IL-17, пг/мл	8,3 $\pm$ 3,7	7,2 $\pm$ 1,6	5,6 $\pm$ 2,3	6,2 $\pm$ 2,0
IL-18, пг/мл	91,6 $\pm$ 11,2	66,8 $\pm$ 8,6	112,2 $\pm$ 23,8	95,8 $\pm$ 9,4
IL-10, пг/мл	4,4 $\pm$ 1,2	3,7 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 1,3	11,66 $\pm$ 4,0*

* — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$ — статистическая значимость различий по сравнению с исходным уровнем, критерий U

ских заболеваний суставов, имеющих различный этиопатогенез и иммуногенетическое происхождение, различную нозологическую принадлежность и неоднозначный прогноз дебютировавших в возрасте до 16 лет, длительностью более 6 недель. Постановка верифицированного диагноза, характера и тяжести поражения суставов определяет тактику ведения пациентов, поскольку для реактивного (РеА) и ювенильного идиопатического артрита (ЮИА) патогенетическая терапия принципиально различна.

Цель: определить диагностическую ценность выявления антител к модифицированному цитруллиннированному виментину (АМЦВ) при ЮИА и РеА.

Материалы и методы: в исследование вошли 102 ребёнка с ЮА, из них с ЮИА 78, с РеА 24. Диагноз ЮИА сформулирован на основании критериев ILAR (Эдмонтон, 2001 год). Диагноз РеА выставлен в соответствии с классификационными критериями, принятыми на IV Международном совещании по диагностике РеА (Берлин, 1999 год). Определение клинико-лабораторных анализов (суммарный РФ, АМЦВ, DAS 28) проходили по стандартной методике.

Результаты: в обследованной группе с ЮА выявлено 11,8% пациентов с повышенным суммарным РФ, 23,5% пациентов серопозитивных по АМЦВ, количество дабл-позитивных по этим показателям составило 5 детей. В группе пациентов с повышенным значением АМЦВ, были выявлены более высокие значения DAS 28 и длительная утренняя скованность, по сравнению с серонегативными пациентами по данному показателю. АМЦВ коррелирует с показателями клинико-лабораторной активности ($r=0,69$, $p<0,05$).

Заключение: таким образом, определение АМЦВ позволяет на ранних стадиях ювенильного артрита прогнозировать полиартикулярное поражение суставов и более тяжелое клиническое течение заболевания.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ К ГИСТОНЫМ БЕЛКАМ И ОСНОВНОМУ БЕЛКУ МИЕЛИНА В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Кляус Н.А., Седых С.Е., Невинский Г.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Введение: Выявление специфических аутоантител (ААТ) на ранних стадиях развития аутоиммунных заболеваний не всегда обладает достаточной диагностической точностью в связи с тем, что возможна их продукция и у людей без аутоиммунных заболеваний. В последние годы обнаружено, что ААТ могут обладать каталитической активностью, оценка уровня которой может рассматриваться как перспективный метод диагностики аутоиммунных заболеваний.

Цель и задачи: анализ относительного содержания ААТ к ОБМ и ГБ в крови больных РС и здоровых доноров, получение поликлональных ААТ из крови исследуемых лиц и исследование относительной активности гидролиза ОБМ и ГБ абзимами.

Материал и методы: Исследованы препараты плазмы крови 6 пациентов с подтвержденным ранее диагнозом РС и 6 здоровых доноров. Для определения содержания АТ к ОБМ и ГБ использовался метод прямого иммуноферментного анализа. Методом аффинной хроматогра-

фии на Protein G-Sepharose у исследованных лиц были получены IgG, из которых выделены фракции IgG, обладающие высоким сродством к ОБМ и ГБ, используя гистон-сефарозу и ОБМ-сефарозу. Полученными абзимами проведен гидролиз ОБМ и ГБ, активность которого оценивалась при помощи определения белковых фракций на электрофорезе. Для расчета достоверности различий использовались методы непараметрической статистики.

Результаты: Содержание АТ к ГБ у здоровых доноров — $0,59 \pm 0,09 A_{450}$ в сравнении с пациентами с РС — $0,77 \pm 0,10 A_{450}$ ($p<0,05$). Содержание АТ к ОБМ у группы исследованных здоровых доноров $0,56 \pm 0,19 A_{450}$ значительно не отличалось в сравнении с больными РС — $0,6 \pm 0,12 A_{450}$ ($p<0,05$). Выделенные из плазмы крови здоровых доноров АТ, не продемонстрировали значимой гидролитической активности. Фракции IgG из плазмы крови больных РС, связывающие ГБ, в 28 раз более активны в гидролизе ГБ, чем ОБМ. Фракции, не связывающие ГБ, но имеющие сродство к ОБМ в 62 раза более активны в гидролизе ГБ, чем ОБМ. Фракции IgG из плазмы крови больных РС, связывающие ОБМ, в 1,3 раза более активны в гидролизе ОБМ, чем ГБ. Фракции, не связывающие ОБМ, но имеющие сродство к гистон-сефарозе более активны как в гидролизе ОБМ, так и ГБ; гидролиз ГБ этими фракциями в 1,1–2,4 раза более эффективен, чем ОБМ.

Заключение: Впервые показано, что плазма крови больных РС и здоровых доноров содержит АТ к ГБ и ОБМ, обладающие каталитической активностью. Выделенные препараты АТ из крови больных РС, но не здоровых доноров, эффективно гидролизуют ГБ. АТ, взаимодействующие с иммобилизованными ОБМ и ГБ, гидролизуют как ОБМ, так и ГБ. Эффективность гидролиза ГБ существенно выше, чем ОБМ.

КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ С УЧЕТОМ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТА

Корниенко Е.А.¹, Крупина А.Н.¹, Чиненова Л.В.²

¹ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Нередко воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) развиваются на фоне различных нарушений иммунологической регуляции. Поскольку такие пациенты зачастую нуждаются в иммуносупрессивной терапии, определение иммунологического статуса у детей с данной патологией является важным методом обследования.

Целью исследования является изучение иммунологического статуса пациента с ВЗК в зависимости от возраста, нозологической формы, тяжести, осложнений, внекишечных проявлений и ответа на терапию.

Материал и методы. У 24 детей от 0 до 17 лет с проявлениями ВЗК (16 детей — с БК (4 — до 5 лет, 12 — старше 5 лет), 4 — с ЯК (все старше 5 лет), 4 — с недеференцированным колитом (НДК) (все младше 5 лет)), была проведена оценка иммунологического статуса: субпопуляция лимфоцитов, параметры цитокинового звена — IL-10, TNF- α и функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов.

Результаты. У детей, с подтвержденным диагнозом болезнь Крона были отмечены следующие нарушения иммунорегуляции: у 9 детей (56%) было обнаружено снижение общего количества NK-клеток (1 ребенок (25%) в группе до 5 лет, 8 детей (67%) старше 5 лет). При оценке параметров цитокинового звена иммунитета — у 4 детей (25%) отмечено снижение индуцированной продукции IL-10 (1 ребенок младше 5 лет (25%), 3 — старше 5 лет (25%)), при нормальном или повышенном содержании в сыворотке у остальной части группы пациентов. Так же отмечалось снижение индуцированной продукции TNF- α у 10 детей (62,5%) (2 из них — дети младше 5 лет (50%), 8 — дети старше 5 лет (67%)), при нормальной продукции у остальной части исследуемой группы. Требовалась биологическая терапия (инфликсимаб) 5 детям (31%) (2 детей до 5 лет (50%), 3 — старше 5 лет (25%)), с хорошим терапевтическим ответом — 3 пациентов, 1 — с переводом на «Хумиру», 1 — введение стволовых клеток. У 7 пациентов (44%) фагоцитоз страдает незавершенностью (из них 2 — дети младше 5 лет — 50%, 5 — старше 5 лет — 42%). При оценке детей с язвенным колитом (все дети старше 5 лет): те же параметры соответственно: у 2 детей (50%) — снижение NK-клеток, снижение индуцированной продукции IL-10 отмечено не было. Снижение индуцированной продукции TNF- α отмечалось у 3 детей (75%) — все дети без биологической терапии, а незавершенный фагоцитоз отмечается у 2 пациентов — 50%, соответственно.

Заключение. Полученные данные могут помочь в дальнейшем ведении и лечении ВЗК, путем необходимой иммунологической коррекции, а так же прогнозировать дальнейшее течение заболевания.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ ПУЗЫРЧАТКИ МЕТОДОМ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНФОКАЛЬНОГО ЛАЗЕРНОГО СКАНИРУЮЩЕГО МИКРОСКОПА

Кубанов А.А.^{1,2}, Абрамова Т.В.², Смольяникова В.А.³

¹ ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва, Россия

² ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, Москва, Россия

³ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Москва, Россия

Введение. Пузырчатка — аутоиммунное заболевание, характеризующееся образованием пузырей и эрозий на коже и/или слизистых оболочках. Диагностика пузырчатки основана на оценке клинических признаков, результатов цитологического, гистологического исследований, иммунологических тестов. Существующие методы диагностики имеют свои преимущества и недостатки, но ни один из них в отдельности не обладает 100% чувствительностью и специфичностью. В ряде случаев патологический процесс имеет паранеопластический характер, что обуславливает необходимость дополнительного обследования и, при необходимости, соответствующего лечения пациента. Поиск новых диагностических критериев пузырчатки является актуальной задачей дерматологии.

Цель. Совершенствование диагностики пузырчатки методом реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа.

Материал и методы. Обследовано 45 больных с пузырчаткой, в том числе с вульгарной — 34, листовидной — 10, паранеопластической — 1 больной, а также 10

здоровых добровольцев. Диагноз устанавливали на основании анамнеза, клинической картины, результатов цитологического и патоморфологического исследований. Проведено изучение биоптатов видимо непораженной кожи с применением реакции непрямой иммунофлюоресценции (нРИФ); учет результатов проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) в сравнении с флуоресцентным микроскопом. С целью усовершенствования качества изображений, полученных методом КЛСМ, применены различные виды антител: антитела, меченные красителем Alexa 488 (максимум эмиссии в зеленой части спектра) и антитела, меченные красителем Alexa 546 (максимум эмиссии в красной области спектра).

Основные результаты. В ходе проведения исследования разработан метод диагностики пузырчатки методом нРИФ с использованием КЛСМ. Определены оптимальные условия для проведения реакции: 24-часовая инкубация срезов кожи при 4°C с первичными антителами и 2-часовая инкубация при комнатной температуре со вторичными антителами. Установлено, что оптимальная визуализация отложений IgG в эпидермисе и дерме у больных пузырчаткой достигается при использовании антител, меченных красителем Alexa 546 с максимумом эмиссии в красной области спектра; при окрашивании биоптатов антителами, меченными красителем Alexa 488 с максимумом эмиссии в зеленой части спектра наблюдается выраженная аутофлюоресценция срезов, что затрудняет интерпретацию полученных данных.

При исследовании биоптатов, полученных от больных вульгарной и листовидной пузырчаткой, обоими методами выявлено характерное отложение иммуноглобулина G в межклеточном пространстве шиповатого слоя эпидермиса сразу над базальным слоем; дермальные отложения иммуноглобулина G отсутствовали. В коже больного паранеопластической пузырчаткой выявлено отложение иммуноглобулина G в верхних слоях дермы. Отложения иммуноглобулина G в эпидермисе отсутствовали. При окрашивании биоптатов кожи здоровых добровольцев отложения IgG обнаружены не были.

Метод нРИФ с использованием КЛСМ позволил получить более четкий и контрастный сигнал от флуоресцирующих антител в биоптатах по сравнению с флуоресцентной микроскопией.

Заключение. При диагностике аутоиммунной пузырчатки методом нРИФ для подтверждения наличия и определения локализации аутоантител целесообразно использование КЛСМ. При проведении исследований на КЛСМ предпочтительнее применение антител, меченных красителем Alexa 546 с максимумом эмиссии в красной области спектра.

Метод непрямой иммунофлюоресценции с микроскопией препаратов с использованием КЛСМ позволяет получать изображения с большей четкостью и контрастностью в сравнении с флуоресцентным микроскопом. Это преимущество метода обеспечивает высокую надежность выявления и определения характерной для заболевания локализации IgG в эпидермисе и дерме, в том числе при дифференциальной диагностике вульгарной и листовидной пузырчатки с паранеопластической пузырчаткой.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИФН α ИНДУЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Курочкина Ю.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А.,
Тихонова М.А., Сизиков А.Э.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
Новосибирск, Россия

Введение: ревматоидный артрит (РА) представляет хроническое системное аутоиммунное заболевание, приводящее к деструкции хрящевой и костной ткани, и, как следствие, потери трудоспособности и ранней инвалидизации. Использование для лечения РА цитостатических препаратов и генно-инженерных биологических агентов далеко не всегда позволяет достичь ремиссии и имеет ограничение в связи с их токсическими и иммуносупрессивными эффектами. В этой связи, существует необходимость внедрения в клиническую практику новых методов лечения, среди которых использование толерогенных дендритных клеток (тДК) представляет большой интерес.

Цели и задачи: оценить возможность генерации тДК у больных РА и охарактеризовать их свойства по сравнению с тДК здоровых доноров.

Материал и методы: тДК генерировали из прилипающей фракции моноцитов периферической крови здоровых доноров и пациентов с РА в присутствии GM-CSF, ИФН- α и дексаметазона. Контролем служили иммуностимуляторные ДК, культивируемые без дексаметазона (кДК). Фенотипические свойства ДК оценивались по уровню экспрессии CD14, CD83, CD86, B7H1, HLA-DR, TLR2 с использованием соответствующих моноклональных антител методом проточной цитофлуориметрии. Функциональные свойства ДК оценивались по уровню продуцируемых цитокинов (27-plex assay) и уровню аллостимуляторной активности в смешанной культуре лимфоцитов.

Результаты: внесение дексаметазона в культуру ДК доноров приводило к значимому снижению аллостимуляторной активности в СКЛ (снижение индекса стимуляции (ИС) с 80 ± 22 до 30 ± 12 ; $p < 0,01$), уменьшению продукции IL-1 β ($p = 0,01$); MIP1 α ($p = 0,03$), TNF- α , Eotaxin, IFN- γ и возрастанию клеток, экспрессирующих TLR2 (с 46 ± 30 до $74 \pm 28\%$; $p < 0,05$). Культуры кДК у больных РА исходно отличались сниженной аллостимуляторной активностью (ИС- 56 ± 27 против 80 ± 22). Добавление дексаметазона характеризовалось тенденцией к дальнейшему снижению аллостимуляторной активности (ИС снижался с 56 ± 27 до 22 ± 11). тДК больных РА характеризовались также достоверно более низкой продукцией IL-1 β и MIP1 α и тенденцией к более низкой продукции IL-2, IL-17 и большим содержанием TLR2+ клеток (60 ± 23 против 40 ± 26 до %).

Заключение: добавление дексаметазона в культуры ИФН- α ДК доноров приводит к индукции толерогенных свойств ДК. ДК больных РА исходно обладают более выраженными «толерогенными» признаками, которые усиливаются при культивировании ДК с дексаметазоном.

СЫВОРОТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ РАСТВОРИМЫХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ И ИХ ГЕТЕРОКОМПЛЕКСОВ ПРИ ПСОРИАЗЕ

Кхедри Ф.¹, Курников Г.Ю.², Варшавская Л.В.²,
Новиков В.В.¹

¹Нижегородский государственный университет им.
Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, Россия

²Нижегородская государственная медицинская
академия, Н. Новгород, Россия

Введение. Дифференцировочные молекулы иммунной системы существуют не только в мембранной форме, но и в растворимой, образующейся в результате шеддинга (протеолитического отщепления) или альтернативного сплайсинга мРНК. Установлено, что их сывороточный пул включает множество растворимых дифференцировочных молекул, в частности, молекул адгезии, таких как CD54, CD18, CD50. Молекулы адгезии играют важную роль в иммунном ответе, обеспечивая межклеточные взаимодействия, участвуя в передаче сигналов и выполняя многие другие функции. Известно, что растворимые дифференцировочные молекулы, сохраняя способность к взаимодействию с лигандами, образуют растворимые гомо- и гетеро-олигомерные комплексы (ассоциаты). В крови здоровых и больных лиц недавно обнаружены растворимые олигомерные комплексы, в состав которых входят такие дифференцировочные молекулы адгезии как CD54 (ICAM-1), CD50 (ICAM-3), CD18, CD11b. В частности, показано наличие в крови гетерокомплексов CD54-CD18, CD54-CD11b, CD50-CD11b, CD50-CD18, отражающих картину рецептор-лигандных взаимодействий при взаимодействии клеток, участвующих в иммунных реакциях. Содержание таких гетерокомплексов в сыворотке крови может меняться при различных иммуно-опосредованных заболеваниях, что приводит к изменению общей структурно-функциональной картины пула растворимых дифференцировочных молекул.

Псориаз является одним из самых распространенных кожных заболеваний. В патогенезе заболевания, наряду с нарушениями клеточного цикла кератиноцитов на уровне эпидермиса, выявлено усиление иммунного ответа в пораженных участках кожи, в механизмах которого принимают участие молекулы адгезии.

Целью исследования явилась оценка сывороточного содержания растворимых молекул адгезии CD18, CD50, CD54 в сопоставлении с уровнем гетерокомплексов CD54-CD18, CD54-CD11b, CD50-CD11b, CD50-CD18.

Материалы и методы. Исследовано 50 образцов сыворотки крови, полученных от больных псориазом, проходящих амбулаторное обследование в ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 13» г. Нижнего Новгорода и 55 образцов сыворотки крови здоровых доноров. Сывороточное содержание растворимых молекул CD18, CD50, CD54 и растворимых комплексов CD54-CD18, CD54-CD11b, CD50-CD11b, CD50-CD18 определяли с помощью разработанных ранее авторами методов с применением отечественных моноклональных антител серии ИКО. Результаты выражали в условных единицах (U/ml). Математическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.

Основные результаты. Полученные результаты показали достоверное увеличение содержания сывороточных растворимых молекул CD18 при псориазе по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). В сыворотке больных

псориазом наблюдалось также достоверное увеличение уровня растворимых молекул CD50 по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). Статистически значимых различий в содержании растворимых молекул CD54 и сывороточных гетеродимерных комплексов CD54-CD18, CD54-CD11b, CD50-CD11b, CD50-CD18 в сыворотке больных в сравнении со здоровыми донорами не обнаружено.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение сывороточного содержания растворимых молекул адгезии в сыворотке крови больных псориазом не ассоциировано с изменениями в содержании их растворимых ассоциатов. То есть, появляющиеся в крови в более высоких концентрациях молекулы адгезии не ассоциированы через свои активные центры с лигандами и способны выполнять эффекторные функции, связанные с регуляцией (вероятно, торможением) иммунного ответа путем взаимодействия с лигандами на мембране клеток.

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Мелашенко О.Б., Шмаров В.А., Мелашенко В.В., Меньяло М.Е., Газатова Н.Д., Тодосенко Н.М., Мельников А.Е., Исмаилова А.З.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия

Введение. Аутоиммунные заболевания (АИЗ) можно отнести к группе сложно диагностируемых болезней. Определение аутоантител, рекомендуемое в качестве стандартной диагностики АИЗ, не всегда информативно, особенно на начальном этапе заболевания. Известно, что при АИЗ содержание в крови некоторых белков коррелирует с активностью патологического процесса, и, следовательно, их определение может иметь диагностическую значимость.

Цель исследования. Провести сравнительный анализ белкового состава крови больных АИЗ и здоровых доноров полуколичественным методом электрофореза.

Материалы и методы. Была исследована кровь 4 больных болезнью Бехтерева (4пациента), 3 рассеянным склерозом, 5 ревматоидным артритом и 2 системной красной волчанкой. Контрольные пробы были получены от 6 здоровых доноров. Из плазменных образцов удаляли фибрин центрифугированием, далее пробы нагревали до 100°C в течение 35 минут и обрабатывали меркаптоэтанолом. Вертикальный электрофорез проводился в электрофоретической камере Sub-GellGT в стандартных условиях на полиакриламидном геле в течение 5 часов. Гелевые пластинки окрашивали красителем Coomassie G-250 и отмывали по стандартной методике. Гели анализировали с помощью системы GelDoc, USA.

Результаты. В сравнении с контрольными образцами, повышенное содержания белков в крови АИЗ было отмечено в диапазоне 65-70 кДа. Визуально эта область была более выражено окрашена, была шире и объемней. Наибольшее количество белка в этом диапазоне была отмечена в пробах больных системной красной волчанкой. Вертикальный электрофорез с использованием стандартного агарозного геля не позволил разделить белки крови на фракции. Более перспективным в диагностическом

отношении может быть использование горизонтального агарозного электрофореза с тест-системой «Белки сыворотки-24».

Выводы. Полуколичественное определение белкового состава плазмы методом электрофореза может быть использовано в комплексе с другими диагностическими анализами для постановки диагноза АИЗ.

КОЛИЧЕСТВО CD25-ПОЗИТИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ IN VITRO У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

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

¹ Областная детская клиническая больница №1

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Уровень экспрессии активационных маркеров лимфоцитов является чувствительным индикатором функционального состояния клеток. Стимуляция поликлональными активаторами in vitro позволяет оценить общую реактивность иммунокомпетентных клеток, и может быть использована как универсальный метод для исследования различных патологических процессов. Одной из наиболее изученных молекул «ранней активации» лимфоцитов является CD25 — α -цепь высокоаффинного рецептора IL-2, которая экспрессируется на мембране Т-лимфоцитов уже через сутки после индукции. Целью нашего исследования явилась оценка экспрессии CD25 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках у детей с аутоиммунной патологией соединительной ткани при стимуляции in vitro.

Обследованы дети и подростки 6-17 лет с аутоиммунными заболеваниями в стадии активности: с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, $n=75$), с ювенильной склеродермией (ЮСД, локализованная форма, $n=16$), с системной красной волчанкой (СКВ, $n=15$), а также 32 условно здоровых ребенка. Для оценки спонтанной и индуцированной экспрессии CD25 образцы цельной периферической крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия) в соотношении 1:9 и инкубировали в течение 24-х часов (37°C, 5% CO₂) без стимулятора и при стимуляции фитогемагглютинином (ФГА, Sigma) в конечной концентрации 20 мкг/мл. Определение количества CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и CD3⁺CD8⁺CD25⁺ проведено методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США). Для статистического анализа данных использовали унифицированный аппарат теории общих линейных моделей.

В результате проведенного исследования установлено, что количество CD25-позитивных Т-хелперов у клинически здоровых детей в среднем составило 12,01% от общего количества CD3⁺CD4⁺лимфоцитов. У больных с СКВ число этих клеток не отличалось от контрольных значений, а у детей с ЮИА и ЮСД количество CD3⁺CD4⁺CD25⁺ было статистически значимо ниже контрольного уровня ($p < 0,001$).

После инкубации с ФГА содержание CD25-позитивных Т-хелперов во всех исследованных группах возросло по сравнению со спонтанным уровнем ($p < 0,001$). В группе условно здоровых детей количество

CD3⁺CD4⁺CD25⁺ было максимальным (60,0%) и превышало соответствующие значения в группах с аутоиммунными заболеваниями ($p < 0,05$). Следует отметить, что при стимуляции ФГА у больных с СКВ, как и в других группах с аутоиммунной патологией, число CD25-позитивных Т-хелперов было ниже контрольного уровня. То есть, стимуляция митогеном позволила выявить скрытый «дефицит активации» Т-хелперов у больных с СКВ.

Спонтанное количество цитотоксических Т-клеток, экспрессировавших CD25, у всех исследованных детей было значительно меньше, чем число CD25-позитивных Т-хелперов (в среднем не более 4% от общего количества CD3⁺CD8⁺). При стимуляции ФГА число CD3⁺CD8⁺CD25⁺ во всех группах возросло по сравнению со спонтанным уровнем в 1,2–2,0 раза ($p < 0,05$). Статистически значимых различий по спонтанному и стимулированному количеству этих клеток между больными с аутоиммунной патологией соединительной ткани и клинически здоровыми детьми не выявлено.

Таким образом, спонтанное и стимулированное количество CD25-позитивных цитотоксических Т-клеток у детей с аутоиммунной патологией не отличалось от соответствующих значений в группе условно здоровых детей, тогда как стимулированное ФГА число Т-хелперов, экспрессировавших CD25, во всех группах больных было снижено. Отсутствие параллелизма между изменениями экспрессии CD25 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках при стимуляции *in vitro* обуславливает необходимость отдельного определения этих параметров. Учитывая, что CD25-позитивные Т-хелперы в основном представляют собой регуляторные Т-клетки, выявленное снижение их спонтанного и стимулированного количества свидетельствует о дисбалансе регуляторных механизмов при аутоиммунной патологии у детей.

ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЁННОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЁГКИХ И ПРОТЕИНАЗА-3 ПОЗИТИВНЫМ ВАСКУЛИТОМ

Первакова М.Ю., Шумилов А.А., Титова О.Н., Чудинов А.Л., Беляева И.Б., Лапин С.В.

НМЦ по молекулярной медицине, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Введение: дефицит альфа-1-антитрипсина (А1АТ), возникающий вследствие мутаций в гене *Pi*, является фактором наследственной предрасположенности к хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ), а также ассоциирован с протеиназа-3-позитивным васкулитом (ПЗПВ).

Целью данного исследования является оценка распространённости мутантных фенотипов А1АТ у больных с хронической лёгочной патологией: ХОБЛ, гранулёматозом Вегенера

Задачи: 1. Адаптировать метод изоэлектрофокусирования для определения фенотипов А1АТ в условиях практической лаборатории; 2. Произвести сбор клинического материала у следующих категорий больных: больные ХОБЛ II и III стадии, больные с ПЗПВ, здоровые доноры; 3. Произвести в набранных группах определение фенотипов А1АТ, определить концентрации А1АТ турбидиметрическим методом; 4. Проследить взаимосвязь патологических фенотипов А1АТ с особенностями клинической

картины заболеваний; 5. Оценить распространённость фенотипов в данных группах больных и сделать заключение о роли мутантных форм А1АТ в патогенезе названных заболеваний.

Материалы и методы: были собраны три группы больных: ХОБЛ II и III стадии: 27 человек, больные ПЗПВ: 30 человек, здоровые доноры: 30 человек. Для фенотипирования А1АТ использовался метод изоэлектрофокусирования с иммуноблоттингом с помощью оборудования для горизонтального электрофореза (Pharmacia, Швеция). Для создания градиента pH были использованы амфолиты pH 4.2–4.9 (GE healthcare, Швеция) Селективная окраска А1АТ достигалась с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антител (Bethyl laboratories, Швеция). Количественное измерение содержания А1АТ проводилось на биохимическом анализаторе А15 (Biosystems, Испания) методом иммунотурбидиметрии (Sentinel Diagnostics, Италия).

Основные результаты: среди 27 больных ХОБЛ было выявлено 18,5% (5/27) мутантных фенотипов А1АТ: 3PiMZ, 1PiMS и 1PiSS. Из 30 больных с ПЗПВ 20% (6/30) оказались носителями мутантных фенотипов: 1PiZZ, 3PiMZ, 2PiMF. При этом мутантные фенотипы А1АТ были обнаружены только при тех формах ПЗПВ, которые сопровождались поражением лёгких. Среди 20 здоровых доноров было выявлено 2 носителя гетерозиготных мутантных фенотипов (6,5%). Из всех вышеперечисленных больных только у двух обладателей мутантных фенотипов А1АТ: PiZZ и PiMZ, оба с ПЗПВ, концентрация А1АТ была ниже предела референсных значений, указанных производителем.

Заключение: у значительного числа пациентов с ХОБЛ и ПЗПВ были обнаружены мутантные формы А1АТ, при этом, их появление в большей части случаев не сопровождалось снижением концентрации А1АТ в сыворотке крови, что свидетельствует о том, что на патогенез ХОБЛ и ПЗПВ оказывает существенное влияние не сниженная концентрация молекул А1АТ, а их нарушенная функциональная активность, что делает необходимым использование качественного теста для выявления дефицита А1АТ. Большой процент фенотипов (20%) среди больных ПЗПВ свидетельствует о том, что роль дефицита А1АТ в развитии аутоиммунного воспаления при ПЗПВ недооценена, а среди пациентов с ПЗПВ целесообразно проводить скрининг на дефицит А1АТ для выявления лиц с показаниями к заместительной терапии.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Петричук С.В., Курбатова О.В., Самохина И.В., Семенова Г.Ф., Измайлова Т.Д., Мирошкина Л.В., Глоба О.В., Быкова О.В., Кузнецова Л.М.

ФГБНУ «Научный центр здоровья детей», Москва, Россия

Введение. Рассеянный склероз (РС) — хроническое нейродегенеративное мультифакторное заболевание. Ведущими этиопатогенетическими теориями РС являются иммунопатологическая и митохондриальная. С точки зрения митохондриальной теории высказываются предположения, что основой этого заболевания является генетический, структурный или биохимический дефект митохондриального аппарата. В рамках иммунопатоло-

гической теории предполагается активация макрофагов и Т-хелперов, повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера, образование противомиелиновых антител с формированием очага хронической демиелинизации.

Цель: исследование популяционного состава и митохондриальной активности основных и малых популяций лимфоцитов у детей с РС.

Материалы и методы: обследовано 37 детей с РС в возрасте от 12 до 18 лет. Контрольную группу составили 48 условно здоровых ребенка. Всем детям было проведено иммуноцитохимическое исследование лимфоцитов периферической крови с помощью проточной цитофлуориметрии (FC500 BC, США). Оценивали следующие популяции лимфоцитов: Т-лф (CD3+CD45+), Т-хелперы (CD3+CD4+CD45+), цитотоксические Т-лф (CD3+CD8+CD45+), Th17-лимфоциты (CD3+CD4+CD161+CD45+), регуляторные Т-клетки (CD4+CD127^{low}CD25+CD45), активированные Т-хелперы (CD4+CD127^{high}CD25+CD45+), В-лф (CD3-CD19+CD45+), включая В1-популяцию (CD45+CD3-CD19+CD5+) и В2-популяцию (CD45+CD3-CD19+CD5-), NK-клетки (CD3-CD16/56+CD45+). Определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (основной фермент цикла Кребса и II этап дыхательной цепи митохондрий) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) (фермент, отражающий сопряженность гликолиза и цикла Кребса и интенсивность поступления электрон-эквивалентов с гликолиза на дыхательную цепь митохондрий). Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с помощью пакета Statistica 6.0. Достоверность полученных результатов оценивали непараметрическим критерием Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде медианы (Me) и [верхняя - нижняя квартиль]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Показатели иммунного статуса и активности ферментов энергетического обмена в популяциях лимфоцитов у пациентов с РС значимо отличались от показателей контрольной группы (табл. 1). Выявлено достоверное снижение количества NK-клеток, причем степень снижения более выражена в обострении, чем в ремиссии заболевания, при этом активность СДГ в этой популяции существенно повышена по сравнению с контрольной группой. Количество Т-лимфоцитов не отличалось от контрольной группы, активность СДГ в Т-лимфоцитах была повышена за счет увеличения активности в регуляторных Т-лимфоцитах и активированных Т-хелперах. Увеличено относительное количество (% от лимфоидного региона) Th17-лимфоцитов, при этом активность СДГ в этой популяции достоверно выше только в стадии обострения. Общее количество В-лимфоцитов не отличалось от контрольной группы, но в стадии обострения выявлено достоверное повышение количества клеток в популяции В1 относительно стадии ремиссии. Активность СДГ в В-лимфоцитах повышена как за счет популяции В1, так и за счет популяции В2-лимфоцитов и в обострении и в ремиссии, в обострении РС активность СДГ выше, чем в стадии ремиссии.

Анализ активность ГФДГ в различных популяциях лимфоцитов показал, что уровень этого фермента составляет 40% от активности СДГ для Т-лимфоцитов и NK-клеток и 50-55% — для В-лимфоцитов у здоровых детей, что указывает на преобладание аэробных процес-

сов образования энергии над анаэробными процессами. Анализ активность ГФДГ у пациентов с РС показал, что в Т-лимфоцитах и NK-клетках соотношение ГФДГ/СДГ сохраняется на уровне контрольной группы. Образование энергии в В-лимфоцитах при РС смещено в сторону более интенсивной работы гликолиза (уровень ГФДГ составляет 80-85% от активности СДГ).

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показывают, что патологический процесс при РС затрагивает количественные характеристики популяций лимфоцитов и их функциональную активность. Выраженность изменений зависит от стадии заболевания (обострение-ремиссия). Увеличением численности популяций Th17-лимфоцитов и рост активности СДГ в Th17-лимфоцитах и в активированных Т-хелперах у детей с РС являются прогностически неблагоприятными признаками в отношении течения заболевания. Рост численности популяции В1-лимфоцитов и увеличение активности СДГ и ГФДГ в них свидетельствуют об активном воспалительном процессе в органе-мишени и значительном аутоиммунном повреждении тканей. Максимальная диагностическая значимость иммуноцитохимического исследования достигается только при комплексной оценке количественных характеристик основных и малых популяций и показателей их энергетического обмена.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ HLA II КЛАССА DQ ЛОКУСА ПРИ ВЫСОКИХ И НИЗКИХ УРОВНЯХ АНТИТЕЛ К ТКАНЕВОЙ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЕ У ДЕТЕЙ С ЦЕЛИАКИЕЙ

Ревнова М.О.¹, Новикова В.П.², Шаповалова Н.С.¹, Калинина Е.Ю.³, Лапин С.В.⁴, Холопова И.В.⁴

¹ ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный первый медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Введение: на современном этапе серологическое исследование при целиакии выполняет не только диагностическую, но и прогностическую задачи. Тканевая трансглутаминаза признана маркером кишечной атрофии.

Цель и задачи: определить существуют ли генетические отличия у детей с целиакией с высокими и низкими уровнями антител к тканевой трансглутаминазе. Установить взаимосвязь степени серологической активности с гаплотипом HLA DQ.

Материалы и методы: проведено обследование 50 детей с различными клиническими формами целиакии. Диагноз был подтвержден гистологическим, морфометрическим исследованием биоптатов тонкого кишечника, с использованием классификации Marsh. Серологическое исследование IgA и IgG к глиадину и тканевой трансглутаминазе (tTG) проводилось методом иммуноферментного анализа (ELISA), а также IgG к деамидированным

пептидам глиаина непрямо́й реакцией иммунофлюоресценции (IFA). Генетическое типирование HLA системы DQ локуса выполнялось полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Группы пациентов разделили по уровню tTG: >100 МЕ/мл и < 50 МЕ/мл, соответственно.

Результаты: в ходе изучения вариабельности HLA-DQA1 DQB1 был проведен сравнительный анализ как гаплотипов DQ, так и отдельных аллелей у детей с целиакией. Больные с HLA-DQ8, кодирующую HLA-DQA1*03:01 DQB1*03:02 составили 16%, с различными вариантами DQ2 (HLA-DQA1*05:01 DQB1*02:01, DQA1*05:05 DQB1*03:01, DQA1*02:01 DQB1*02:02) 84%. В группе с низкими титрами антител DQ8 составил 20.6%, в сравнении с 0% в группе с высокими титрами $p < 0,001$.

Группа с высоким уровнем повышения tTG составила 10% исследованных (пять больных). В данной группе сочетания гаплотипов DQ2 выявлялись чаще, 80% в сравнении с остальными: изолированный DQ2 у одного ребенка 20% $p < 0,001$. Таким образом, аллель 0201 встречалась в 54.1%. В группе больных со значительной серологической активностью и атрофией кишечника аллель 0201 встречалась статистически значимо чаще 54.1% в сравнении с другой наиболее распространенной аллелью 0501 в 25% случаев, $p < 0,005$. А в группе с низким уровнем антител 0201 встречалась в 28.4%, сравнивая с 54.1% в группе с высоким уровнем, $p < 0,005$.

Таким образом, аллель 0201 встречалась чаще в группе с высоким уровнем антител, и была наиболее распространенной аллелью у данных больных.

Заключение: дети, страдающие целиакией с высокими и низкими уровнями антител к тканевой трансглутаминазе генетически отличаются. Преобладающей аллелью в группе с высокими титрами антител является 0201. Необходимо дальнейшее исследование с большим числом пациентов.

МАРКЕРЫ АПОПТОЗА МОНОЦИТОВ И ИХ СВЯЗЬ С ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЦИТОКИНАМИ У БОЛЬНЫХ ДИСКОИДНОЙ И СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Романов В.А., Ерыгина Е.Н., Романова Н.В., Капрельянц Е.Ю.

ГБОУ ВПО «ЯГМУ» Минздрава РФ, Ярославль, Россия

Введение. Данные литературы о состоянии маркеров апоптоза моноцитов и их связи с цитокинами у больных кожными и системными формами красной волчанки многочисленны и достаточно противоречивы. Исследование данного вопроса представляется целесообразным как с теоретической точки зрения в плане выяснения иммунопатологических механизмов развития указанных заболеваний, так и в практическом аспекте с точки зрения совершенствования лабораторных методов дифференциальной диагностики и разработки подходов к профилактике и лечению кожных и системных форм красной волчанки.

Цель и задачи: изучение маркеров апоптоза моноцитов (Мн) и их связей с провоспалительными цитокинами у больных дискоидной красной волчанкой (ДКВ) и системной красной волчанкой (СКВ).

Материалы и методы. Обследован 121 человек в возрасте от 20 до 60 лет (54 больных СКВ, 34 — ДКВ, 33 здоровых лица). Исследовали экспрессию CD95 антигена

на Мн с помощью метода непрямо́й иммунофлюоресценции, ДНК клеток — микроцитотестометрическим методом с красителем акридиновым оранжевым, провоспалительные цитокины (IL-1 β , IL-6, TNF- α) в сыворотке крови пациентов — иммуноферментным методом. Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.); для исследования взаимосвязи изученных показателей применен корреляционный анализ по Спирмену.

Основные результаты. Установлено, что при СКВ экспрессия CD95⁺ на Мн была статистически достоверно выше — 64(48-72)%, чем у здоровых лиц — 52(42-56)%, ($p < 0,05$), в то время как у больных ДКВ этот показатель 55(51-62)% существенно не отличался от результатов исследования здоровых лиц ($p > 0,05$). Только у больных СКВ установлено существенное снижение ДНК в Мн ($5,56 \pm 2,45$ mV) по сравнению с данными пациентов с ДКВ ($8,36 \pm 1,55$ mV, $p < 0,05$) и доноров ($8,85 \pm 2,42$ mV). Разница между показателями ДНК Мн при ДКВ и здоровых лиц статистически недостоверна ($p > 0,05$). С нарастанием активности СКВ установлено уменьшение содержания ДНК в Мн (с $5,28 \pm 1,67$ до $4,25 \pm 2,2$ mV, $p < 0,05$). У больных ДКВ по сравнению с данными здоровых лиц констатировано достоверное увеличение уровней IL-1 β — 68(2,4-87,7) и TNF- α — 2,45(0,00-6,2), у больных СКВ — IL-1 β — 67(1,3-173), IL-6 — 15,1 (0,0-35,52), TNF- α — 45,68 (3,63-136,84), а в контроле соответственно IL-1 β — 5,45(0,00-17,4), IL-6 — 4,45(0,00-5,87), TNF- α — 1,71(0,00-8,45) пкг/мл, $p < 0,05$. Анализ взаимозависимостей исследованных показателей показал, что при ДКВ между исследованными показателями имелась две корреляционные связи — между CD95 Мн и ДНК Мн, а также между IL1 и IL6. У больных СКВ корреляционные взаимосвязи констатированы между IL1 и TNF, CD95 Мн и ДНК Мн.

Заключение. Полученные данные указывают на серьезные отклонения в генетическом аппарате и программируемой гибели исключительно при СКВ, что может играть важную роль в патогенезе этого заболевания. Вместе с тем, факт существования взаимосвязей между CD95 Мн и ДНК Мн и между провоспалительными цитокинами с увеличением их уровней как при ДКВ, так и при СКВ, может свидетельствовать о наличии общих механизмов развития иммунопатологических процессов при обоих заболеваниях, связанных с апоптозом моноцитов и функционированием системы провоспалительных цитокинов. Важную роль в развертывании системного патологического процесса, по-видимому, играет IL6, существенно повышенный у больных СКВ. С практической точки зрения исследование величин экспрессии CD95 и ДНК моноцитов, а также уровня IL6 может быть использовано в качестве дополнительных лабораторных тестов для дифференциации ДКВ и СКВ.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПСОРИАЗА И ПСОРИАТИЧЕСКОГО АРТРИТА

Смирнова С.В., Смольникова М.В., Барило А.А.

НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия

Введение. В патогенезе псориаза (ПС) и псориатического артрита (ПсА) приоритетная роль отводится иммунологическим нарушениям, которые, прежде всего,

связаны с Th17/Th1-зависимыми аутоиммунными механизмами. В развитии воспалительного процесса при ПС и ПсА существенное место принадлежит дисбалансу провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Сведения о цитокиновой регуляции межклеточных взаимодействий у больных ПС противоречивы. Отсутствуют данные, касающиеся маркеров прогнозирования развития тяжелых форм ПС, в частности псориатического артрита (ПсА).

Цель. На основании изучения основных показателей гуморального и клеточного звеньев иммунитета, уровня цитокинов Th1 и Th2-профиля в периферической крови выявить приоритетный характер иммунного реагирования при ПС и ПсА и установить маркеры, имеющие прогностическое значение.

Материалы и методы. Обследовано 97 больных ПС в возрасте от 18 до 66 лет. Выделено 3 группы: 1 группа – больные ПС (n=49), 2 группа – больные ПсА (n=48), 3 группа – практически здоровые доноры крови (n=45), сопоставимые по полу и возрасту. Всем больным проводился развернутый анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, определением абсолютного числа клеток. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19. Концентрация IgA, IgM, IgG и цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ) в сыворотке крови определялась путем твердофазного иммуноферментного анализа. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием прикладных программ «Statistica 6.0». Полученные результаты представлены в виде: М (25%; 75%).

Основные результаты. В обеих группах больных ПС независимо от степени тяжести заболевания выявлены однотипные статистически значимые изменения основных показателей гуморального и клеточного звеньев иммунитета в сравнении с контрольной группой: увеличение содержания субпопуляций CD3⁺, CD8⁺, CD16⁺-лимфоцитов, наряду со снижением концентрации IgA, IgM, IgG. Так, относительная концентрация CD3⁺-клеток при ПС составила 78% (74; 83), при ПсА – 76% (74; 80), в группе контроля – 72,94% (68,45; 78,31), $p_{1,2}=0,2$, $p_{1,3}=0,001$, $p_{2,3}=0,03$. Относительная концентрация CD8⁺-клеток при ПС составила 33% (28; 38), при ПсА – 29% (25; 35), в группе контроля – 24,5% (19,5; 30,3), $p_{1,2}=0,2$, $p_{1,3}=0,00001$, $p_{2,3}=0,001$. У больных ПС и ПсА концентрация цитокина Th2-профиля (IL-4) в сыворотке крови достоверно выше в сравнении с группой контроля: 3,3 пг/мл (2,1; 16,2), 5,25 пг/мл (2,55; 10,4), 2,9 пг/мл (0,6; 6,2), соответственно, $p_{1,2}=0,5$, $p_{1,3}=0,006$, $p_{2,3}=0,001$. Достоверных различий в уровне других цитокинов в сыворотке крови между группами больных и группой контроля не выявлено. При сравнении больных ПсА и ПС отмечено, что концентрация TNF- α и IFN- γ при ПсА достоверно выше, чем при ПС: 13,6 пг/мл (6,75; 32) против 8,1 пг/мл (3,4; 18,6), и 20,2 и 0 пг/мл, соответственно, $p_{1,2}=0,005$, $p_{1,2}=0,0005$. При ПсА отмечаются лейкоцитоз и ускоренная СОЭ, в сравнении с группой больных ПС: 15 мм/ч (7; 20,5)

против 7 мм/ч (3; 14) и $7,7 \cdot 10^9$ клеток/л (5,9-9,8) против $7,05 \cdot 10^9$ клеток/л (5,8-8,5), соответственно, $p_{1,2}=0,0006$, $p_{1,2}=0,05$.

Заключение. В иммунопатогенезе ПС и ПсА ведущую роль играют клеточные механизмы. Установлены иммунологические маркеры ПС: увеличение содержания субпопуляций CD3⁺, CD8⁺, CD16⁺-лимфоцитов с девиацией в сторону Th2-профиля (увеличение уровня IL-4), наряду со снижением концентрации IgA, IgM, IgG в сыворотке крови. Повышение концентрации TNF- α и IFN- γ в сыворотке крови, лейкоцитоз и ускоренная СОЭ у больных ПС может служить маркером формирования ПсА.

ПОЛИМОРФНЫЕ ГЕНЫ ЦИТОКИНОВ IL5, TGFB И IFNG КАК МАРКЕРЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ПСОРИАЗУ И ПСОРИАТИЧЕСКОМУ АРТРИТУ

Смольникова М.В., Смирнова С.В.

НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия

Введение. Преимущественная роль в патогенезе псориаза (ПС) и псориатического артрита (ПсА) принадлежит генетическим компонентам, в том числе генам цитокинов – медиаторам иммунного ответа. Среди генов цитокинов основные маркеры, предрасполагающие к развитию более тяжелого процесса, пока не найдены.

Цель. Изучить распределение аллельных вариантов генов цитокинов IL5 C-703T (rs 2069812), TGFB C-509T (rs 1800469), IFNG C-1616T (rs 2069705) у больных ПС и ПсА с целью выявления маркеров тяжелого течения заболевания.

Материалы и методы. Обследовано 78 больных ПС, у 51 из них был диагностирован псориатический артрит. Все больные были европеоидами, проживающими в г. Красноярск. В качестве контроля использовались данные распределения указанных полиморфизмов у относительно здоровых лиц. Выделение ДНК проводилось из периферической крови. Генотипирование осуществляли с помощью ПЦР и рестриктного анализа продуктов амплификации. Для сравнения распределения между группами использовали точный тест Фишера.

Основные результаты. Аллельный вариант -1616C гена IFNG чаще встречается у больных ПС по сравнению со здоровыми, $0,60 \pm 0,04$ и $0,46 \pm 0,03$, соответственно (OR [95% CI]=1.74 [1.15-2.64], $p=0,009$). Статистически достоверных отличий в распределении полиморфных вариантов генов IL5 и TGFB показано не было ($p=0,597$ и $0,429$, соответственно).

Заключение. Генетические факторы, приводящие к иммунным изменениям, являются факторами риска развития воспаления при ПС и ПсА. Различия в распределении аллельных вариантов полиморфных генов цитокинов, приводящих к изменению уровня соответствующих белковых продуктов, являются потенциальными маркерами развития псориаза, как одного из многофакторных заболеваний. Мы полагаем, что мутация IFNG C-1616T является маркером развития ПС, а аллельный вариант -1616C – предрасполагающим к развитию псориаза и его тяжелых форм, в том числе псориатического артрита.

ГИСТАМИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР H4 И ТЕОРИЯ НЕПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ ГИСТАМИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК В ПАТОГЕНЕЗЕ СИНДРОМА ШЕГРЕНА

Стегаев В.В.¹, Нис А.Т.², Штарк Х.³, Нурдстрём Д.К.¹, Конттинен Ю.Т.¹

¹ Институт клинической медицины, Университет Хельсинки, Хельсинки, Финляндия

² Институт клинической фармакологии им. доктора М. Фишер-Бош и Университет Тюбингена, Штутгарт, Германия

³ Институт фармакологии и медицинской химии, Университет им. Генриха Гейне, Дюссельдорф, Германия

Введение. На сегодняшний день синдром Шегрена (СШ) считается заболеванием с неизвестной этиологией и неясным патогенезом. Многие аутоиммунные заболевания, включая СШ, характеризуются повышенным содержанием тучных клеток и повышенной концентрацией гистамина в тканях. В связи с тем, что H1- и H2-антигистаминные препараты оказались неэффективными в лечении аутоиммунных заболеваний, то этот факт до недавнего времени оставался без внимания. В 2000 г. был открыт новый H4-гистаминовый рецептор (H4R), аффинность которого к гистамину примерно в 10 000 раз выше по сравнению с классическими H1- и H2-рецепторами. Открытие H4R дало новый толчок в исследованиях ранее обнаруженного явления постоянного синтеза и секреции гистамина наномолярных концентрациях в межклеточное пространство без запасаения его в специализированных гранулах многими непрофессиональными гистамин-продуцирующими клетками, в том числе Т- и дендритными клетками. В нашей предыдущей работе было продемонстрировано, что экспрессия H4R на уровне мРНК и белка в ацинарных эпителиальных клетках биоптатов слюнных желез пациентов с СШ значительно снижена по сравнению с образцами слюнных желез, полученных от здоровых доноров контрольной группы.

Цели исследования. В настоящей работе была поставлена цель исследовать метаболизм и транспорт гистамина в культуре эпителиальных клеток слюнных желез человека (HSG) и в биоптатах слюнных желез, полученных от больных СШ, а также исследовать влияние активации H4R в культуре клеток иммортализованного ацинарного эпителия (NS-SV-AC) слюнных желез человека при Fas-индуцированном апоптозе, который, как считается, играет центральную роль в патогенезе СШ.

Материалы и методы. Основные ферменты и мембранные транспортеры, вовлеченные в метаболизм гистамина, в культуре HSG и в тканевых срезах были исследованы методами количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR) и иммуноцитохимии. Захват [³H]-гистамина в культуре HSG был исследован методом радиометрических индикаторов на жидкостном сцинтилляционном счетчике в присутствии и без специфического ингибитора (ММР) транспортера органических катионов-3 (ОСТ-3). Fas-индуцированный апоптоз в культуре клеток NS-SV-AC был инициирован комбинацией человеческого TNF-α и ингибитора NF-κB IMD-0354 в присутствии и без агониста H4R HST-10. Методы RT-PCR, Вестерн-блоттинга, проточной цитофлуориметрии и фазово-контрастной микроскопии были использованы для подтверждения и анализа активации Fas-опосредованного механизма апоптоза.

Основные результаты. Экспрессия основных ферментов метаболизма гистамина, гистидиндекарбоксилазы и гистамин-N-метилтрансферазы, на уровне мРНК и белка была сравнительно одинаковой как в биоптатах слюнных желез, полученных от пациентов с СШ, так и в биоптатах слюнных желез здоровых доноров контрольной группы. Фермент диаминооксидаза не был выявлен в слюнных железах ни в одной из исследуемых групп. ОСТ-3-опосредованный транспорт [³H]-гистамина в клетках HSG ингибировался при действии ММР. Экспрессия ОСТ-3 в биоптатах больных СШ была значительно снижена по сравнению с биоптатами контрольной группы.

Методом проточной цитофлуориметрии было показано дозозависимое H4R-опосредованное ингибирование апоптоза. В дальнейших экспериментах была установлена концентрация агониста, при которой наблюдался максимальный противоапоптотический эффект. Исследование методом фазово-контрастной микроскопии выявило морфологические признаки ингибирования апоптоза. При этом стимуляция H4R ингибировала апоптоз через сигнальный путь, контролируемый c-Jun N-терминальной киназой и активацию противоапоптотического белка Bcl-xL.

Заключение. Установлено, что ацинарный эпителий слюнных желез обладает полноценными механизмами синтеза, транспорта и внутриклеточной деградации гистамина. При СШ транспорт гистамина нарушен, что делает невозможным аутокринную активацию H4R, а также физиологический эффект паракринно высвобождаемого гистамина, в том числе из профессиональных гистамин-продуцирующих клеток, таких как тучные клетки и базофилы. Активация высокочувствительного к гистамину H4R защищает ацинарный эпителий слюнных желез от Fas-индуцированного апоптоза. Недостаточность гистамина, синтезируемого непрофессиональными гистамин-продуцирующими эпителиальными клетками, может способствовать развитию и прогрессии СШ. Таким образом, стабилизаторы тучных клеток и/или синтетические низкомолекулярные аналоги гистамина могут служить новым сравнительно недорогим способом иммунологической коррекции СШ и других ревматологических заболеваний.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНФОРМАТИВНОСТИ ТЕСТ-СИСТЕМ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА

Ткаченко О.Ю.¹, Лапин С.В.¹, Лазарева Н.М.¹, Шмонин А.А.², Соловьева Л.Н.², Бондарева Е.А.², Сельков С.А.³, Чепанов С.В.³

¹ НМЦ по Молекулярной Медицине, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

² ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Тесты для определения антикардиолипидных антител (аКла) класса G (IgG) и класса M (IgM) в среднем или высоком титре (>40 GPL/MPL) и антител к бета-2 гликопротеину 1 (аБ2ГП1) являются лаборатор-

ным стандартом в диагностике антифосфолипидного синдрома.

Все вышеперечисленные тесты имеют методологические несовершенства, ведущие к ложноположительным и ложноотрицательным результатам. В связи с недостаточной стандартизацией тест-системы разных производителей для определения антител не всегда согласуются между собой.

Целью нашего исследования явилась оценка диагностическую ценности тестов. Для этого нами был проведен сравнительный анализ тестов между собой и определена степень сопоставимости наиболее часто используемых тест-систем различных производителей.

Материалы и методы. Нами была собрана коллекция сывороток из 47 пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 20 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и 50 пациентов с акушерской патологией. В данных сыворотках были измерены аКл IgG, аКл IgM, аБ2ГП1 антитела методом ИФА с помощью немецких тест-систем фирм Euroimmun и Orgentec, образцы с наиболее высоким титром — методом иммуноблоттинга на тест-системе фирмы Medipan. Проанализированы частота обнаружения аКл IgG, аКл IgM, аБ2ГП1, а также сходимость тестов в разных группах пациентов.

Результаты: сходимость тестов ИФА для определения аБ2ГП1 (Euroimmun) и аБ2ГП1 (Orgentec) составила 70%, тестов ИФА для определения аКл IgG (Euroimmune) и аКл IgG (Orgentec) — 88%, тестов ИФА для определения аКл IgM (Euroimmune) и аКл IgM (Orgentec) — 70%, тестов ИФА аБ2ГП1 screen (Euroimmune) и аБ2ГП1 IgG (Medipan) — 30%, тестов ИФА аБ2ГП1 screen (Orgentec) и аБ2ГП1 IgG (Medipan) составила 80%, тестов ИФА аБ2ГП1 screen (Euroimmune) и аБ2ГП1 IgM (Medipan) — 50%, тестов ИФА аБ2ГП1 screen (Orgentec) и аБ2ГП1 IgM (Medipan) — 80%, тестов ИФА аКл IgG screen (Euroimmune) и аКл IgG (Medipan) — 20%, тестов ИФА аКл IgG screen (Orgentec) и аКл IgG (Medipan) — 80%. Сходимость тестов ИФА аКл IgG screen (Euroimmune) и аКл IgG (Medipan) — 70%, тестов ИФА аКл IgG screen (Orgentec) и аКл IgG (Medipan) — 80%. Все тесты дали положительный результат только в одном образце (0,08%).

Выводы: Процент сходимости ИФА-тестов Euroimmun и Orgentec варьирует от 70 до 88%, Euroimmune и Medipan — от 20 до 70%, Orgentec и Medipan — в области 80%. В связи с использованием нового иммунологического принципа выявления антифосфолипидных антител методом иммуноблоттинга может быть рекомендован для подтверждения положительных результатов, полученных методом иммуноферментного анализа. Для достоверной лабораторной диагностики АФС необходимо улучшение стандартизации результатов тест-систем различных производителей между собой.

ИЗУЧЕНИЕ АДАПТИВНОГО И ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ЛОКАЛИЗОВАННОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

Филатова М.А., Юсупова Л.А.

Казанская государственная медицинская академия,
Казань, Россия

Локализованная склеродермия — хроническое заболевание соединительной ткани, характеризующееся появлением на различных участках тела очагов локального воспаления (эритемы, отёка) с последующим формирова-

нием в них склероза и/или атрофии кожи и подлежащих тканей. Заболеваемость локализованной склеродермией составляет 2,7 случаев на 100000 населения, распространенность — 2 на 1000 населения. В патогенезе заболевания основную роль отводят иммунным нарушениям, повышенному синтезу и отложению в коже и подкожной клетчатке коллагена и других компонентов соединительной ткани.

Цель. Изучение активности компонентов адаптивного, врожденного иммунитета у больных локализованной склеродермией.

Материал и методы исследования. Для достижения поставленной цели проведено клиничко-лабораторное исследование 39 пациентов локализованной склеродермией. В качестве основных методов исследования использовались: клинический, иммунологический, статистический. Клиническое обследование больного локализованной склеродермией включало оценку жалоб, изучение анализа основного заболевания, исследование состояния дерматологического статуса, применялся кожный счет. Для иммунологического исследования использовалась сыворотка крови больных локализованной склеродермией. При исследовании показателей адаптивного звена иммунитета использовались моноклональные антитела к антигенам: CD3+, CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцитов. Сывороточные иммуноглобулины (Ig) A, M, G определяли методом турбидиметрии с применением набора «Микроанализ Ig A, M, G» («Синтеко», Россия). Учет результатов проводили на биохимическом анализаторе «FP-901M» («Labsystems», Finland). Метаболическую активность нейтрофилов определяли в НСТ-тесте в спонтанном варианте по методу В.Н.Рагв в модификации М.Е. Вискмана и А.Н. Маянского. Статистическая, математическая и графическая обработка полученных данных проведена с помощью пакета статистических программ, Statistica 6.0, BIOSTAT, программ «Microsoft Office Excel 2007» и «Microsoft Office Word 2007».

Результаты исследований. Клиничко-социальная характеристика больных локализованной склеродермией показала, что в структуре заболеваемости 35,9% составили мужчины, 64,1% — женщины, 43,5% пациентов имели нервно-психическую нагрузку на работе, 66,7% больных не соблюдали режим дня, 17,9% — проживали в плохих жилищных условиях. Интерпретация показателей Т-клеточного звена иммунитета у больных локализованной склеродермией показала изменения иммунного статуса в виде достоверного снижения общего уровня Т-лимфоцитов (CD3+) до $36,3 \pm 2,7$ % ($p < 0,05$), CD8+цитотоксических лимфоцитов до $18,1 \pm 1,5$ % ($p < 0,05$), повышения Т-хелперов (CD4+) до $57,3 \pm 3,1$ ($p < 0,05$) и, как следствие, повышение иммунорегуляторного индекса (соотношение CD4/CD8) до 3,27 ($p < 0,05$). Дисбаланс иммунорегуляции у больных локализованной склеродермией обусловлен как повышенным уровнем Т-хелперов, так и иммуносупрессией за счет снижения цитотоксических Т-лимфоцитов. Изучение состояния гуморального звена адаптивного иммунитета у больных локализованной склеродермией позволило выявить, что в период обострения у этих больных наблюдалась тенденция к повышению содержания иммуноглобулинов класса М, А и достоверное снижение уровня иммуноглобулина G. При изучении функциональной активности нейтрофилов выявлено количество спонтанно активированных нейтрофилов (по методике НСТ теста) в $14,3 \pm 0,5$ %, что было достоверно выше, чем в контрольной группе ($5,2 \pm 0,7$ %, $p < 0,05$). Оценка индекса активации нейтрофилов была 1,9 раза меньше по сравнению с группой

контроля ($3,9 \pm 0,3$ и $7,5 \pm 0,2$ соответственно, $p < 0,05$). При обследовании больных локализованной склеродермией средние показатели кожного счёта составили 12 баллов, индекса активности — 3 балла, индекса фиброза — 2 балла, глубины склеродермического процесса — 2 балла.

Выводы. Результаты нашего исследования подтвердили участие иммунной системы в формировании патологического процесса при локализованной склеродермии. Индивидуально подобранный комплексный подход к лечению каждого больного в зависимости от стадии и тяжести течения заболевания, а также локализации очагов поражения и данных иммуногенеза заболевания позволит предотвратить дальнейшее развитие склерозирующего воспаления.

ИММУНОФЕНОТИП В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ СЕРОПОЗИТИВНОМ И СЕРОНЕГАТИВНОМ ВАРИАНТЕ ТЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Харитонов М.В., Сизязкина Л.П.

ГБОУ ВПО РостГМУ, Ростов-на-Дону, Россия

Ревматоидный артрит (РА) — мультифакторное аутоиммунное заболевание, в развитии которого участвует множество факторов: внешней среды, иммунных, генетических, гормональных и др. (Harris E.D. 1990; Sewell, Trentham D. 1993).

Несмотря на значительное количество исследований посвященных роли иммунокомпетентных клеток в патогенезе РА, далеко не все аспекты окончательно расшифрованы, в частности роль В-лимфоцитов в патогенезе ревматоидного артрита остаётся достаточно дискуссионным. **Цель исследования** — определение количественных и функциональных параметров В-лимфоцитов при формировании серопозитивного и серонегативного вариантов течения ревматоидного артрита.

В работе было обследовано 32 пациентов в возрасте 45-60 лет, с подтвержденным диагнозом «ревматоидный артрит» (РА) в стадии обострения, находившихся на лечении в кардиоревматологическом отделении РостГМУ. Исследуемые были разделены на две группы. Первая группа пациенты с РА, суставная форма серопозитивный вариант средний возраст 53 года ($n=21$), вторая группа РА суставная форма серонегативный вариант, средний возраст 58 лет ($n=11$). Контрольную группу составили 10 практически здоровых доноров в возрасте 40-50 лет. Пациентам было проведено исследование иммунофенотипических параметров В-лимфоцитов периферической крови: CD19+CD5+, CD19+CD23+, CD19+CD25+Foxp3+, CD19+CD95+, CD19+CD40+, CD19+CD86+, CD19+IgM+, CD19+IgD+, CD19+CD5+CD27+, CD19+An+, в реакции непрямой иммунофлуоресценции, с учетом результатов на проточном лазерном цитофлуориметре марки «FC 500», производитель Becton Coulter(США), с использованием соответствующих однопараметрических моноклональных антител производства Becton Coulter(США).

Математическую обработку полученных данных проводили с применением программы «Statistica 7.0». Достоверность различий в группах оценивали с помощью непараметрических критериев, достоверным считали результаты при $p < 0,05$.

Анализ показателей субпопуляционного состава В-лимфоцитов в группе пациентов с суставной формой серопозитивный вариант течения ревматоидного артрита (РА) по сравнению с контрольной

группой выявил, увеличение относительного содержания В-лимфоцитов $9,20 \pm 1,3\%$ ($6,35 \pm 0,3\%$) в контроле, усиление экспрессии маркеров ранней активации CD19+CD23 $2,03 \pm 0,1\%$ ($1,36 \pm 0,9\%$), CD19+CD25+ $0,56 \pm 0,01\%$ ($0,1 \pm 0,01\%$), молекул адгезии CD19+CD86+ $0,79 \pm 0,03\%$ ($0,13 \pm 0,015\%$). Обнаружено снижение экспрессии маркеров апоптоза CD19+An+ $0,77 \pm 0,01\%$ ($0,9 \pm 0,02\%$). Отмечается увеличение популяции В-лимфоцитов с фенотипом CD19+CD5+ $0,55 \pm 0,01\%$ ($0,3 \pm 0,07$). Выявлено усиление экспрессии CD40L $1,38 \pm 0,01\%$ ($0,31 \pm 0,015\%$) на активированных Т-лимфоцитах.

Для фенотипа В-лимфоцитов при серонегативном варианте течения РА по сравнению с контролем характерно увеличение экспрессии маркеров ранней активации CD19+CD23+ $2,78 \pm 0,02\%$ ($1,36 \pm 0,9\%$), CD19+CD25+ $0,63 \pm 0,01\%$ ($0,1 \pm 0,01\%$), молекул адгезии CD19+CD86+ $1,63 \pm 0,03\%$ ($0,13 \pm 0,015\%$). Отмечается увеличение экспрессии ко-стимулирующих молекул CD19+CD40+ $12,5 \pm 1,1\%$ ($10,07 \pm 2,3\%$) и маркеров апоптоза CD19+An+ $1,675 \pm 0,01\%$ ($0,9 \pm 0,02\%$). Увеличена минорная субпопуляция В-лимфоцитов с фенотипом CD19+CD5+ $1,58 \pm 0,01\%$ ($0,3 \pm 0,07$). Выявлено повышение экспрессии CD40L $0,9 \pm 0,01\%$ ($0,31 \pm 0,015\%$) на активированных Т-лимфоцитах.

В обеих изучаемых группах отмечены изменения в фенотипе В-лимфоцитов, но в большей степени количество минорной субпопуляции В1-лимфоцитов, маркеров ранней активации, ко-стимулирующие, адгезивные молекулы и маркеры апоптоза выражены у пациентов с суставной формой серонегативный вариант течения РА.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА RFC-1 80A>G В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ МЕТОТРЕКСАТОМ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Ходус Е.А.¹, Хромова Е.Б.², Девальд И.В.¹, Суслова Т.А.²

¹ МБУЗ ОТКЗ Городская клиническая больница №1, Челябинск, Россия

² ОГУП Челябинская областная станция переливания крови, Челябинск, Россия

Ревматоидный артрит (РА) — одно из самых распространенных (около 1% населения земного шара) аутоиммунных ревматических заболеваний, характеризующееся симметричным эрозивным артритом, приводящим к постепенной деструкции суставов и нарушению их функционирования. Задача врача-ревматолога состоит в раннем назначении базисной противовоспалительной терапии (БПВТ) артрита для достижения клинической и лабораторной ремиссии заболевания, что в итоге предотвращает формирование активной воспалительной ткани — паннуса в синовиальной оболочке суставов и сохранению их подвижности. Основным БПВП в терапии РА является метотрексат (МТ). МТ представляет собой антиметаболит фолиевой кислоты, который у пациентов с РА применяется в средних дозах 10-15 мг/неделю. В организме человека МТ метаболизируется с участием большого количества ферментов, один из них — редуцированный носитель фолатов (RFC1), с помощью которого лекарственный препарат попадает в клетку и приводит к нарушению синтеза ДНК. Установлено, что изменения всего в одной точке гена RFC1 80A>G (rs1051266) ведут к недостаточной активности фермента, плохому проникновению МТ в клетку и, соответственно, низкой эффективности тера-

пии артрита. Определение вышеуказанного полиморфизма до начала лечения позволит ревматологу прогнозировать индивидуальный ответ пациента на нее и провести коррекцию в выборе базисного препарата.

Цель исследования: установить ассоциацию однонуклеотидного полиморфизма гена *RFC1* 80A>G с эффективностью терапии МТ в группе больных РА.

Материалы и методы. В исследование было включено 33 пациента с РА, в возрасте от 22 до 81 года, средний возраст составил 57,1 год, из них 11 мужчин (33%) и 22 женщины (67%), находившихся на лечении в ревматологических отделениях г. Челябинска в период с 2012 по 2014 годы. Набор больных проводился вне зависимости от возраста, степени активности и стадии заболевания, при условии отсутствия проводимой ранее какой-либо БПВТ не только МТ, но и другими лекарственными препаратами. Оценка эффективности терапии МТ проводилась через 6 месяцев и через 1 год на основании динамики индекса DAS28 (число болезненных и припухших суставов, уровень СОЭ или СРБ, оценка боли по визуальной аналоговой шкале). Полиморфизм гена *RFC1* 80A>G (rs1051266) определяли методом PCR-RFLP.

Результаты: сравнительный анализ частоты встречаемости аллелей гена *RFC1* 80A>G в группе больных РА и здоровых доноров показал, что частота аллеля А в группе больных РА была повышена и составила 62,12% против 44,79% контроля ($p < 0,05$ OR=2,02 95%CI 1,14-3,58). Частота аллеля G в группе больных РА составила 33,88% против 55,21% в контроле ($p < 0,05$ OR=0,49, 95%CI 0,28-0,88). На фоне проводимой терапии МТ мы смогли выделить две группы пациентов: 18 человек были включены в группу «ответчиков» на МТ (низкая активность заболевания или ремиссия) и 15 пациентов вошли в группу «неответчиков» (сохраняется высокая активность заболевания, потребность в нестероидных противовоспалительных препаратах). Сравнительный анализ частоты встречаемости аллелей *RFC1* 80A>G и генотипов AA, AG и GG в этих группах показал, что в группе «неответчиков» повышена частота встречаемости аллеля G (43,33% против 33,33%) и генотипа AG (73,33% против 44,44%), однако различия не достигают уровня статистической значимости. Для получения достоверных результатов требуется продолжить проведение исследования, что также позволит провести оценку частоты встречаемости аллелей гена *RFC1* 80A>G с проявлением токсического действия препарата.

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР РИСКА ФОРМИРОВАНИЯ STREPTOCOCCUS PYOGENES- АССОЦИИРОВАННЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ

Шабалдина Е.В., Шабалдин А.В., Рязанцев С.В.,
Симбирцев А.С.

ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» МЗ РФ, Кемерово, Россия
ФГБНУ «НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия
ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ уха горла носа и речи» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия
ФГБУП «Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА РФ, Санкт-Петербург, Россия

Streptococcus pyogenes относится к видам стрептококков, которые могут самостоятельно вызвать инфек-

ционный процесс, а также являются причиной постинфекционных осложнений, таких как ревматическая болезнь и постстрептококковый гломерулонефрит. В тоже время встречается бессимптомное носительство данного микроорганизма. Ранее проведенные исследования показали, что у детей дошкольного возраста с острыми рецидивирующими респираторными инфекциями и с сенсibilизацией к *Streptococcus pyogenes* имеют место выраженные иммунопатологические реакции, которые могут определять развития иммунокомплексного заболевания. Тем самым было показано, что наличие сенсibilизации к данному микроорганизму является предиктором ревматических заболеваний. Исходя из того, что иммунные нарушения носят конституциональный характер, необходимо определиться с возможными иммуногенетическими маркерами этой предрасположенности. Широко исследуемые полиморфизмы *IL1B* (+3953, C->T), *IL1Ra* (*VNTR*, *intron* 2, 89 bp) и *IL4* (*VNTR* *intron* 3, 70 bp) показали положительные ассоциативные связи с аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, поэтому они могли быть и маркерами нарушения иммунной толерантности к *Streptococcus pyogenes* у детей раннего и дошкольного возраста.

Исходя из этого, целью настоящего исследования было изучение полиморфизмов генов семейства интерлейкина 1 и интерлейкина 4 у детей с сенсibilизацией к *Streptococcus pyogenes*.

Проведено обследование 771 ребенка, в возрастном интервале 2-6 лет, проходивших лечение на клинических базах Кемеровской государственной медицинской академии Минздрава РФ по поводу рецидивирующих острых респираторных инфекций. Были сформированы две группы детей, имеющих иммунный ответ по IgG типу к антигенам *Streptococcus pyogenes* (основная группа, n=306) и не имеющих его (группа сравнения, n=465). Уровень антител к *Streptococcus pyogenes* определялся в сыворотке крови с помощью ИФА на коммерческих наборах ООО «Иммунотекс» (г. Ставрополь, Россия). В обеих группах проведено генетическое типирование полиморфизмов *IL1B* (+3953, C->T), *IL1Ra* (*VNTR*, *intron* 2, 89 bp) и *IL4* (*VNTR* *intron* 3, 70 bp) в лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий хи-квадрат с поправкой Йетса на непрерывность. Об ассоциации разных генотипов, с исследуемым явлением судили по величине отношения шансов (odds ratio (OR)). Рассчитывали его доверительный интервал (CI) при 95%-ном уровне значимости. Считали ассоциацию положительной, если OR был больше 2.

Выявили несколько положительных ассоциаций. У детей с сенсibilизацией к *Streptococcus pyogenes* достоверно чаще, чем у детей без этой сенсibilизации встречались: генотип *IL1B* (+3953, C->T)*C,T (52,6% в опытной группе, против 39,8% в контроле, $p=0,001$; OR=2,02; CI(99%) 0,47-5,93); генотип *IL1Ra* (*VNTR*, *intron* 2, 89 bp)*2R,5R (7,19% в опытной группе, против 1,29% в контроле, $p=0,001$; OR=5,59; CI(99%) 1,58-19,77), а также генотип *IL4* (*VNTR* *intron* 3, 70 bp)*2R,2R (6,86% в опытной группе, против 3,01% в контроле, $p=0,05$; OR=2,34; CI(99%) 0,66-8,29). В опытной группе выявлен достоверно значимый дефицит, по отношению к группе сравнения, следующих генотипов: *IL1B* (+3953, C->T)*C,C (36,6% в опытной группе, против 44,7% в контроле, $p=0,05$; OR=0,71; CI(99%) 0,21-2,56) и *IL4* (*VNTR* *intron* 3, 70 bp)*2R,3R (26,79% в опытной группе, против 36,77% в контроле, $p=0,05$; OR=0,63; CI(99%) 0,17-

2,23). Показано, что к сенсibilизации на антигены *Streptococcus pyogenes* предрасположены дети, имеющие полиморфизмы генов семейства интерлейкина 1 и интерлейкина 4, детерминирующие активный синтез этих цитокинов и их высокую функциональную активность. Можно считать, что срыв толерантности у детей раннего и дошкольного возраста к условно-патогенной микрофлоре и, в частности к *Streptococcus pyogenes*, определен генами семейства интерлейкина 1 и 4.

Учитывая ранее полученные данные о том, что в группе детей с иммунным ответом к *Streptococcus pyogenes* были высокими антитела к стрептолизину, к стрептогалактонидазе, ЦИК, СРБ и ревматоидный фактор, то можно говорить, что у них разворачивается индуцированное *Streptococcus pyogenes* системное иммунокомплексное воспаление. Соответственно иммуногенетическим маркером этого состояния будет генотип *IL1Ra* (*VNTR*, *intron 2*, 89 bp)*2R,5R, для которого получен самый высокий уровень отношения шансов (OR=5,59).

Таким образом, у детей с рецидивирующими острыми респираторными инфекциями маркером риска формирования *Streptococcus pyogenes*-ассоциированной ревматической патологии является генотип *IL1Ra* (*VNTR*, *intron 2*, 89 bp)*2R,5R.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АУТОИММУННОМУ ДИАБЕТУ И ДИАБЕТУ 2 ТИПА

Якушева М.Ю.

*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
Екатеринбург, Россия*

Ранняя диагностика предрасположенности к аутоиммунному диабету 1 типа и сахарному диабету (СД) 2 типа, диагностика которых и идентификация в ранней стадии известными методами затруднена и очень сложна. Важную роль в развитии всех форм диабета играет генетическая и конституциональная предрасположенность. Одним из информативных конституциональных маркеров является дерматоглифика, которая применяется для оценки предрасположенности к различным заболеваниям, в том числе к СД.

Целью проведенного исследования явилось изучение возможности дифференциальной диагностики индивидуальной предрасположенности к развитию аутоиммун-

ного диабета и СД 2 типа при биометрической оценке дерматоглифической картины индивидуума. Технической задачей предлагаемого способа является разработка единой методики выявления критериев предрасположенности к развитию СД 1 типа и СД 2 типа, позволяющей дифференцировать эти типы сахарного диабета.

Материалы и методы. Анализ дерматоглифической картины был проведен у 38 больных СД 1 типа и у 63 больных СД 2 типа, пациентов эндокринологического отделения городской клинической больницы. Сбор отпечатков проведен с помощью аппаратно-программного комплекса, состоящего из специально разработанного дактилоскопического сканера, позволяющего проводить съем пальцевых и ладонных отпечатков с последующей передачей изображений в компьютер, где по специальной программе Дерматоглифика производится их расшифровка согласно международной дерматоглифической классификации. Для обработки материала были использованы математические методы многофакторного анализа, основанные на теории распознавания образов.

Результаты. Анализ особенностей дерматоглифической картины больных аутоиммунным диабетом и диабетом 2 типа показал наличие существенных различий. Показано достоверное увеличение частоты встречаемости при аутоиммунном диабете петли в зоне между 3 и 4 пальцами ПР и ЛР, уменьшение количества и ширины ладонных линий, наличие завитка на 5 пальце ПР и ЛР, дуги и радиальной петли на 3 пальце ЛР, наличия завитка на 4 пальце ПР и завитка и двойной петли на ЛР, ладонного гребневого счета sd более 45 на ЛР, величина гребневого счета на 1 пальце ПР до 15, на 5 пальце ЛР от 9 до 13 и более 16, II и V тип расположения ладонных линий, петля в зоне между 1 и 2 пальцами, наличие сложных рисунков между 4 и 5 пальцами, недифференцированный рисунок на тенаре ПР и радиальной петли на гипотенаре ПР, карпальное положение осевого трирадиуса и уменьшение ладонного угла atd .

Заключение. Выявляемые особенности в характере дерматоглифической картины позволяют сделать вывод о наличии у пациента конституциональной предрасположенности к СД 1 или 2 типа. Разработанная методика выявления критериев предрасположенности к развитию СД позволит осуществлять дифференциальную диагностику СД различных типов и отбор пациентов в группу высокого риска.