

# ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

## ИММУНОЛОГИЯ ИНФЕКЦИЙ

### НАРУШЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГРИБАМИ РОДА КАНДИДА

Агафонова Е.В., Велижинская Т.А.

Казанский государственный медицинский университет,  
Казань, Россия

В последние годы в клинической иммунологии и педиатрии возрастает интерес к роли грибковой флоры в патологии детского возраста. Персистенция грибов своеобразный маркер иммунодефицитного состояния, дифференцированные особенности которого являются недостаточно изученными.

**Материалы и методы.** Обследованы дети с хроническими соматическими заболеваниями, ассоциированными с грибами рода кандиды (ХЗАГРК) — хроническими пиелонефритами и заболеваниями верхних отделов ЖКТ — хроническими гастроуденитами и язвенной болезнью, осложненными формированием кандидоза (N=98). Диагностика кандидоза включала культуральные микологические исследования (посевы мочи на ГРС, исследование биоптатов слизистой желудка и duodenum) и определение в сыворотке крови маннанового антигена *Candida albicans* (метод иммуносенсоров, Казанский НИИЭМ). В контроле обследована группа здоровых детей (сопоставимые по возрасту, N=26). Изучали субпопуляционный профиль и фенотипические характеристики лимфоцитов (CD3+19-, CD3+4+, CD3+8+, CD3-19+, CD16/56+3-, CD3-8+, CD5+19+, CD3+CD16/56+, CD3+4-8-, CD4+8+, CD4+CD25+hi, CD3+HLADR+, CD3+CD25+, CD4+CD45R0+CD4+CD45RA+CD3+95+) и моноцитов (CD14+CD11b, CD14+HLADR+, CD14+CD16+, CD14+16-). Определение содержания ИЛ (ФНО- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12, ИЛ 8) в сыворотке крови проводили методом ИФА. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы «Statistica 6.0».

Кандидозная инвазия вызывает модуляции в иммунной системе, связанные со снижением популяций Т-лимфоцитов (CD3+19, CD3+CD4+), изменением их функциональной активности за счет инверсии активационных маркеров (HLADR, 25) в сторону негативной активации (CD3+95+,  $p < 0,05$ ). Персистенция грибов связана с дифференцированными изменениями в структуре регуляторных субпопуляций с преимущественным нарастанием лимфоцитов с иммуносупрессорной активностью (CD4+CD25+hi, CD3+CD16/56+, CD3-CD8+, CD3+4-8-). Маннановый антиген *Candida albicans*, индуцируя повышение содержания минорных субпопуляций лимфоцитов с супрессорной активностью способствует угнетению Th1 (вызывает угнетение выработки IFN-гамма) и активации Th2 профиля иммунного ответа, индуцируя повышение

синтеза ИЛ-4. Выявлено снижение CD45R0+ ( $p < 0,05$ ), что ассоциируется с неэффективностью иммунного ответа на антигены ГРС и развитием Т-клеточной анергии. Выявлено изменение баланса субпопуляций CD4+62L-/CD4+62L+ в сторону нарастания CD4+62L+ ( $p < 0,05$ ). При ХСЗАГРК у детей имели место дифференцированные особенности субпопуляционного профиля моноцитов периферической крови. Снижение субпопуляции CD14+CD16- ( $p < 0,05$ ) является важным патогенетическим фактором персистенции грибов при ХЗАГРК у детей. Выявлено нарастание CD14+CD16+ ( $p < 0,05$ )-субпопуляции моноцитов с супрессорной/регуляторной активностью на фоне снижения субпопуляции антигенпредставляющих (CD14+HLADR+) клеток, ассоциированных с Th1 профилем иммунного ответа.

### РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ CD95 И DR3 В АПОПТОЗЕ НАИВНЫХ CD8+ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ

Анисенкова Е.В.<sup>1</sup>, Преснякова Н.Б.<sup>1</sup>, Сычева Т.Д.<sup>2</sup>,  
Краснов В.В.<sup>2</sup>, Филатова Е.Н.<sup>1</sup>, Уткин О.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной  
Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Нижегородская государственная  
медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

**Введение.** Острый инфекционный мононуклеоз (ОИМ) — вирусное заболевание, вызываемое некоторыми представителями семейства герпесвирусов. Наиболее часто ОИМ выявляется у детей. Одним из проявлений ОИМ является снижение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа вследствие анергии Т-лимфоцитов и усиления их апоптоза. В инициации апоптоза и пролиферации разных типов клеток, в том числе лимфоцитов крови, принимают участие трансмембранные рецепторы CD95 и DR3. В норме активированные Т-лимфоциты после стимуляции CD95 погибают путем апоптоза, а наивные Т-клетки начинают пролиферировать. Стимуляция DR3 сопровождается усилением, как пролиферации, так и апоптоза активированных Т-лимфоцитов. При этом наивные Т-клетки характеризуются резистентностью к апоптозу, опосредованному DR3. Известно, что ОИМ сопровождается повышением экспрессии CD95 на мембране суммарной фракции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Данные об экспрессии DR3 на мембране субпопуляций наивных и активированных Т-лимфоцитов крови и его роли в инициации их апоптоза при ОИМ отсутствуют.

**Целью данной работы** явилась оценка восприимчивости наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов к апоптозу после стимуляции рецепторов CD95 и DR3 у детей при ОИМ.

**Материалом для исследования** явились образцы периферической крови здоровых детей и детей с диагнозом ОИМ в возрасте от 10 до 16 лет. Выделение субпопуляций наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (нЦТЛ) проводили методом магнитной иммуносепарации (чистота выделения составила более 98%). нЦТЛ культивировали в течение 20 часов. Специфическую активацию рецепторов проводили МКА анти-CD95 либо МКА анти-DR3 в концентрации 200 нг/мл. Процент апоптотических клеток, % CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup>, % CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup>, % CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток и плотность экспрессии CD95 и DR3 оценивали с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

**Результаты.** По экспрессии рецепторов CD95 и DR3 нЦТЛ были разделены на три фенотипа: CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup>, CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup>. У здоровых детей при стимуляции анти-CD95 и анти-DR3 антителами наблюдалось снижение процента только CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток и плотности экспрессии мембранного CD95 по сравнению со свежеизолированными нЦТЛ. При этом возрастал процент суммарного пула апоптотирующих нЦТЛ. У детей с ОИМ процент CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток, а также плотность экспрессии мембранного CD95 снижались только при стимуляции анти-DR3 антителами. При этом возрастания процента суммарного пула апоптотирующих нЦТЛ не наблюдалось. Следует отметить, что у детей с ОИМ процент свежеизолированных апоптотирующих клеток прямо коррелировал с процентом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток и плотностью экспрессии мембранного CD95. У здоровых детей процент свежеизолированных апоптотирующих нЦТЛ обратно коррелировал с процентом CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток.

При ОИМ по сравнению со здоровыми детьми снижался процент свежеизолированных CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток, а также плотность экспрессии мембранного DR3 на их поверхности. Стимуляция нЦТЛ детей с ОИМ анти-CD95 антителами приводила к нормализации данных показателей. При стимуляции анти-DR3 антителами процент CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> нЦТЛ у детей с ОИМ оставался пониженным по сравнению со здоровыми детьми, однако плотность экспрессии мембранного DR3 достигала значений нормы. Кроме того, стимуляция нЦТЛ детей с ОИМ анти-DR3 антителами приводила к снижению плотности экспрессии CD95 на поверхности CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> клеток. У больных детей после стимуляции нЦТЛ анти-DR3 антителами выявлена положительная корреляция процента CD95<sup>-</sup>DR3<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> с процентом суммарного пула апоптотирующих клеток, а у здоровых детей отрицательная корреляция с плотностью экспрессии CD95 на мембране CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> нЦТЛ.

**Заключение.** У здоровых детей наиболее восприимчивыми к апоптозу являются нЦТЛ фенотипа CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup>. Мы полагаем, что в данном типе клеток рецептор CD95 участвует в инициации апоптоза. У больных детей, ОИМ сопровождается снижением чувствительности нЦТЛ к апоптозу преимущественно за счет субпопуляции CD95<sup>+</sup>DR3<sup>-</sup> клеток вследствие уменьшения числа молекул CD95 на их мембране. ОИМ у детей сопровождается снижением содержания DR3-экспрессирующих нЦТЛ в крови. Мы полагаем, что гибель этих клеток осуществляется по DR3-зависимому сигнальному пути. Вероятно, что в популяции CD95<sup>+</sup>DR3<sup>+</sup> нЦТЛ у здоровых и больных детей рецептор CD95 является функциональным антагонистом DR3.

## ПАРВОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ. ЗНАЧИМОСТЬ И ВОЗМОЖНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

Антипова А.Ю.<sup>1</sup>, Хамитова И.В.<sup>1</sup>, Никишов О.Н.<sup>2</sup>, Лаврентьева И.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург, Россия

Парвовирусная инфекция (ПВИ) вызывается парвовирусом В19 (PV В19, *Primate Erythrovirus 1*), реплицирующимся преимущественно в клетках-предшественниках эритроцитов. Значимость ПВИ обусловлена широким её распространением, разнообразием клинических проявлений, тератогенным действием вируса, а также его способностью вызывать апластические кризы у больных гематологического профиля. В связи с этим во многих странах проводится обязательное тестирование препаратов крови на ДНК PV В19.

Ранее на примере Северо-Западного Федерального округа (СЗФО) РФ нами было установлено, что в 2009–2013 гг. ПВИ широко распространена, выявлялась на 9 из 11 территорий округа; характеризовалась очаговой и вспышечной заболеваемостью. Был выявлен случай врожденной ПВИ.

**Цель работы:** выявление маркеров ПВИ в группах риска.

**Задачи:** исследовать сыворотки крови беременных женщин и доноров на наличие IgG-АТ к PV В19, как показателя ранее перенесённой инфекции; образцы доноров на ДНК PV В19.

**Материалы и методы.** Исследованы 184 сыворотки крови от беременных женщин; и образцы плазмы крови 100 доноров из Центра (крови и тканей) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. IgG-АТ к PV В19 определяли с помощью ИФА тест-системы «gesomWELL Parvovirus В19 IgG» (MICROGEN GmbH, Германия). Образцы доноров исследовали на наличие ДНК PV В19 с помощью наборов реагентов «ДНК-сорб-АМ» AmpliSens и «АмплиСенс®Parvovirus В19-FL» производства ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва). Все тест-системы и наборы реагентов использовались в соответствии с инструкцией по применению.

**Результаты.** У 99 из 184 (53,8%) обследованных женщин были выявлены IgG-АТ к PV В19. Наибольшую долю восприимчивых к ПВИ лиц выявили среди женщин наиболее активного репродуктивного возраста – 18–25 лет (56,7%).

У 78 из 100 (78%) обследованных доноров образцы плазмы крови содержали IgG-АТ к PV В19. В 19 из 76 IgG-положительных образцов (25% случаев) обнаружена ДНК парвовируса В19, причём в одном случае вирусная нагрузка составила 1,5x10<sup>6</sup> копий ДНК/мл. Показатель существенно превышал «порог безопасности» (<10<sup>5</sup> копий/мл) донации для реципиента, что указывает на реальную опасность инфицирования парвовирусом В19 при переливании препаратов крови.

Проведенное исследование и анализ специальной литературы указывают на целесообразность включения надзора за ПВИ в действующую систему надзора за корью и краснухой, ключевой частью которой является специфическая профилактика инфекций.

Необходима разработка препаратов специфической профилактики инфекции. Исследования по созданию вакцинных препаратов ведутся в США. В частности, существует рекомбинантная вакцина, экспрессирующая поверхностные белки PV B19 VP1 и VP2 в бакуловирусном векторе, изучаются возможности использования плазмиды (*Saccharomyces cerevisiae*) или получения пептидной вакцины, содержащей поверхностные белки вируса. Однако препараты либо обладают повышенной реактогенностью (вакцина на основе бакуловируса), либо не достаточно иммуногенны. Получение безопасной и высоко иммуногенной вакцины для профилактики ИЭ остается актуальной задачей здравоохранения разных стран.

#### АНТИГЕННАЯ АКТИВАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗНЫХ ВИДАХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Бляхер М.С., Федорова И.М., Котелева С.И., Капустин И.В., Лопатина Т.К., Кукушкина Е.А., Тульская Е.А.

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского  
Роспотребнадзора, Москва, Россия

Целью настоящего исследования было создание системы оценки антиген-специфической активации Т-клеток у больных с разными видами инфекционной патологии.

**Материалы и методы.** Обследованы больные коклюшем, лабиальным герпесом ВПГ1 этиологии и инфекционным мононуклеозом. Дизайн исследования был следующим: клетки периферической крови больного (цельная кровь, лимфоциты или лейкоциты) подвергались активации в культуральных полистироловых планшетах с антигеном возбудителя соответствующего заболевания. Срок культивации — от 20 до 120 часов в зависимости от метода выявления активированных Т-клеток. Об активирующем влиянии антигена на Т-клетки судили по ряду показателей — увеличению % CD8+ CD69+ клеток не менее, чем на 2% (метод проточной цитофлуориметрии), увеличению продукции ИФН $\gamma$  не менее, чем до 50 мкг/мл (иммуноферментный анализ), повышении пролиферативной активности лимфоцитов по увеличению количества делений больше, чем на 2 по сравнению со спонтанной пролиферацией (метод проточной цитофлуориметрии с использованием витального красителя CFSE), увеличению подавления миграции лейкоцитов — уменьшение диаметра зоны миграции не менее, чем на 20% (микроскопия с использованием инвертированного микроскопа).

**Основные результаты.** При обследовании 62 больных коклюшем детей (контроль — 40 взрослых и 13 детей) продемонстрировано, что антигениндуцированная коклюшным токсином РБТЛ происходит только у больных коклюшем; ни у здоровых взрослых, ни у детей с длительным сухим кашлем некоклюшной этиологии она не наблюдалась. Проведено сопоставление пролиферативного ответа лимфоцитов больных коклюшем детей с уровнем специфических антител в сыворотке их крови и с прививочным анамнезом больных. У детей, не привитых от коклюша, на раннем сроке заболевания отмечался высокий уровень антигенспецифической РБТЛ. Это происходило на фоне минимального уровня специфических антител к коклюшному микробу. На более позднем сроке заболевания на фоне повышения количества специфических антител в крови пролиферативная активность лимфоцитов несколько снижалась. Видимо, это соответствует переходу от клеточной реакции на коклюш к гуморальному ответу на данную инфекцию. Таким образом, регистра-

ция антигенспецифической РБТЛ является объективным подтверждением диагноза «коклюш», что важно для непривитых детей в возрасте до 1 года, т.е. в период, когда титр специфических антител у них ниже диагностического уровня.

Изучение состояния Т-клеток у 42 больных рецидивирующим лабиальным герпесом на разных сроках заболевания (обострение и через 1 месяц) и контрольной группы (7 человек серонегативных по антителам к ВПГ1) позволило выявить существенную разницу в антигенспецифической стимуляции клеток больных *herpes labialis* в зависимости от частоты рецидивов и сроков после последнего высыпания. У больных с редкими рецидивами реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) в первые дни заболевания была существенно ниже, чем у больных с частыми рецидивами. Однако через 1 месяц после начала заболевания уровень РТМЛ в первой группе значимо повышался и уравнивался с таковым у пациентов второй группы, у которых он был одинаков на обоих этапах исследования. В контрольной группе здоровых людей, не имевших в анамнезе проявлений герпетической инфекции никакой локализации, процент Т-лимфоцитов, с маркером активации CD69 не увеличивался в результате стимуляции антигенами ВПГ1 и не отличался от фонового. В период обострения количество CD3+CD69+ у редко болеющих было выше, чем у больных с частыми рецидивами. После стимуляции лейкоцитов периферической крови ВПГ *in vitro* продукция ИФН $\gamma$  была существенно выше у больных *herpes labialis*, чем у здоровых людей, несколько выше у больных с редкими рецидивами, чем у больных с частыми обострениями и не зависела от срока наблюдения.

Выявление Т-лимфоцитов больных, активирующихся в присутствии разных антигенов ВЭБ (капсидного и нуклеарного) проведено у 37 пациентов в возрасте 3-14 лет, госпитализированных в ИКБ №1 с серологически подтвержденным диагнозом «инфекционный мононуклеоз» (ИМ) и 7 пациентов с мононуклеозоподобными заболеваниями (лакунарная ангина, сочетанная с ОРВИ). Все больные обследованы на 5-14 день заболевания. В группе контроля были здоровые дети, проходящие профилактический осмотр перед вакцинацией (9 человек). Повышение экспрессии маркера активации CD69 после 20-часовой антигенной стимуляции выше и концентрации ИФН $\gamma$  в культуральной жидкости отличало лимфоциты детей с инфекционным мононуклеозом, что говорит об активном инфекционном процессе у данных детей.

**Выводы.** Таким образом в результате обследования больных с тремя видами инфекционных заболеваний продемонстрирована возможность их лимфоцитов активироваться *in vitro* специфическим для возбудителя данного заболевания антигеном, что возможно, позволит углубить знания о иммунопатогенезе этих болезней.

#### КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Бортникова О.Г., Зотова В.В., Пискунова С.Г., Плужникова Г.Э., Киселёва Л.В., Немальцева Т.А., Медведева Ю.А.

ГБУ РО «Областная детская больница», Ростов-на-Дону, Россия

**Введение.** Одной из ведущих причин внутриутробной гибели плода и формирования стигм дисэмбриогенеза

в настоящее время признана герпетическая инфекция (ГИ). Оказывая деструктивное действие на ткани и органы эмбриона, вирусы герпеса способствуют развитию таких синдромов, как микроцефалия, слепота, глухота, пороков сердца и др. Помимо внутриутробного инфицирования, существует угроза интранатального и постнатального заражения, причиной чего является несостоятельность иммунной системы детей раннего возраста. По данным литературы, этиологическая структура герпесвирусных инфекций у данного контингента детей представлена, преимущественно, цитомегаловирусом (ЦМВ), вирусом простого герпеса (ВПГ), вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). Нередко выявляется микст-инфекция из вышеперечисленных вирусов с другими типами вирусов герпеса, хламидий, микоплазмы и пр. В свете данной проблемы, всё больший интерес в последнее время привлекает к себе вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6). Он относится к семейству Т-лимфотропных человеческих герпесвирусов, выделен у пациентов с лимфолифферативными заболеваниями; установлена этиологическая роль ВГЧ-6 при синдроме хронической усталости и внезапной экзантемы у детей раннего возраста. Обнаружена гомологичность ВГЧ-6 с цитомегаловирусом человека — более 50%. Имеются сообщения о способности ВГЧ-6 активировать прочие герпесвирусы, персистирующие в организме в латентном состоянии, до активной репликации и развития манифестных форм инфекции. По данным Соеп D.M. и Schaffner P.A. (2003) серопозитивность здоровых детей по ВГЧ-6 составляет 80-100%. **Цель и задачи.** Верификация герпетических инфекций, в том числе ВГЧ-6 инфекции, у детей раннего возраста с поражениями ЦНС и экзантемой; выявление особенностей иммунного статуса и течения основного заболевания на фоне ВГЧ-6 инфекции, и подбор адекватной терапии.

**Материалы и методы.** В группу были включены 25 детей от 1 месяца до 1 года. Критерием отбора явилось наличие вышеперечисленных синдромов. Всем детям проводились исследования методом ИФА и методом ПЦР (выделение специфической ДНК из цельной крови и из соскоба со слизистой ротоглотки). Исследование иммунного статуса включало тесты II уровня.

**Основные результаты.** У 52,2% детей были выявлены IgG к ВГЧ-6, у такого же количества — к ЦМВ. IgM к ЦМВ обнаружился у 21,7% обследуемых. IgG к ВПГ в повышенном титре обнаружился у 39,1% детей, а к ВЭБ-EBNA — у 38,7%, ВЭБ-ЕА — у 30,4%. Специфическая ДНК ВГЧ-6 была выделена в крови у 35,7%, а в соскобе — у 18,8% пациентов. Так же в соскобе со слизистой ротоглотки у 25,4% выделялась ДНК ЦМВ, у 6,7%, — ВЭБ, у 14,5% ВПГ. В крови ДНК ВЭБ была выделена у 16,7%, ЦМВ — у 47,2%, ВПГ — у 22,1% всех детей. При исследовании клеточного звена иммунитета среди нарушений преобладали: лейкопения (41,7%), относительная лимфопения (25%), отмечалось увеличенным у 33,3% абсолютное число Т-лимфоцитов. В-лимфоциты так же определялись, преимущественно, в повышенном количестве. Абсолютное содержание Т-хелперной субпопуляции лимфоцитов было снижено в 58,3% случаев. Интересно, что процентное содержание Т-супрессорных клеток, в основном, находилось в пределах возрастных референтных показателей, тогда как отмечалось снижение абсолютных значений у 50% исследуемых. Иммунорегуляторный индекс был снижен у 25% детей. Маркер поздней активации лимфоцитов был повышен в 100% (относительное количество), а абсолютное — в 66,7% случаев. Количество

естественных киллеров было достоверно снижено. В гуморальном звене отмечалась гипергаммаглобулинемия за счёт IgA, IgM, повышение концентрации ЦИК. При подключении к основному лечению противовирусной терапии, включающей сочетание ациклических нуклеозидов и препаратов  $\alpha$ -интерферона, наблюдалась положительная динамика: улучшалось общее состояние, купировался судорожный синдром, снижалось внутричерепное давление, нормализовалась температура тела, экзантема имела обратное развитие в более ранние сроки по сравнению с детьми, находящимися на стандартном лечении.

**Заключение.** Герпетические инфекции и, в частности, ВГЧ-6 инфекция, может явиться причиной экзантемы и поражения ЦНС, а у больных с сочетанной инфекцией — усугублять течение патологического процесса, как фактор, отягощающий симптоматику основного заболевания и обладающий выраженным иммуносупрессивным действием. Поэтому очевидна необходимость выявления ВГЧ-6 с последующим назначением противовирусной и иммуномодулирующей терапии.

## ФЕНОМЕН МИКРОБНОГО РАСПОЗНАВАНИЯ «СВОЙ – ЧУЖОЙ» В АССОЦИАТИВНОМ СИМБИОЗЕ ЧЕЛОВЕКА

Бухарин О.В., Перунова Н.Б.

*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза  
УрО РАН, Оренбург, Россия*

**Введение.** Способность отличать «своих» от «чужих» — одно из фундаментальных свойств живых организмов (от прокариот до высших эукариот) на котором основаны важнейшие биологические процессы, в том числе защита хозяина от патогенов, отторжение чужеродных клеток, колониальность, многоклеточность, сохранение гомеостаза организма (Марков А.В., Куликов А.М., 2006, López-Lagrea C., 2012). Генетические и биохимические основы различия «своего» и «чужого» материала у бактерий ограничены исследованиями микробного распознавания на моделях взаимодействия бактерий с вирусами (López-Lagrea C., 2012) и внутрипопуляционных взаимоотношений протей (K. Gibbs et al., 2008).

Исходя из концепции ассоциативного симбиоза (Бухарин О.В. с соавт., 2007), где в условиях микросимбиоза взаимодействуют доминантная и ассоциативная микрофлора, внедрение микроорганизма в организм хозяина и его выживание будет зависеть не только от результата распознавания бактерий иммунной системой человека, но и от взаимоотношений с уже существующей симбиотической микрофлорой конкретного биотопа (Бухарин О.В., 2007), которая филогенетически и онтогенетически является функциональным единством и частью врожденной иммунной системы (Беляев И.М., 1997). В связи с этим, представляет интерес исследование способности симбионтных (доминантных) бактерий осуществлять «первичную сортировку» микробных антигенов, непосредственно участвуя в микробном распознавании.

Исходя из вышесказанного, следует, что микроорганизмы, в частности представители доминантной микрофлоры, способны также участвовать в распознавании «свой – чужой», являясь первой линией обороны в биотопах.

**Цели и задачи.** Изучить изменение базовых физиологических функций (размножение, адаптация) микросимбионтов в паре «доминант – ассоциант» при реализации

алгоритма микробного распознавания «свой – чужой» на модели микросимбиоза кишечника человека.

**Материалы и методы.** Исследования были проведены в парах «доминант – ассоциант», с использованием штаммов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecium* (ассоцианты), а также *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* и *B. adolescentis* (доминанты). В работе использованы микробные метаболиты, поскольку взаимодействия микроорганизмов с метаболитами микрофлоры связаны с наличием в супернатанте «сигнальных» молекул (Shank A.E. and Kolter R., 2009), оказывающих регуляторное действие на биологические свойства микросимбиоты (Бухарин О.В., 2006, 2011). Определение феномена микробного распознавания проводили по разработанному алгоритму (Бухарин О.В., Перунова Н.Б., 2011), основанному на принципе индукции метаболитов в результате предварительного соинкубирования с супернатантом ассоциантов и формировании обратной связи в паре «доминант – ассоциант». При этом соинкубирование микробных культур с метаболитами проводили в несколько этапов, оценивая результат по изменению базовых параметров физиологических функций микросимбиоты: ростовые свойства (рост/размножение, РС), биопленкообразование (БПО) и антилизоцимную активность (АЛА) фотометрическим методом на фотометре ELx808 (BioTek, США).

**Основные результаты.** В первоначальных экспериментах супернатант бифидобактерий чаще (в 72-86,1 % случаев) ингибировал рост/размножение микроорганизмов, характерных для дисбиоза дистального отдела толстого кишечника человека, в сравнении с представителями нормофлоры, у которых угнетение ростовой функции встречалось реже (в 44,4-47,2 % случаев) ( $p < 0,05$ ). Изучение динамики БПО и АЛА ассоциантов выявило сходную картину с результатами по изучению РС микросимбиоты.

Использованный прием с предварительным соинкубированием бифидобактерий с супернатантом микросимбиоты (разработанный алгоритм), позволил получить более четкую картину влияния доминантов на ассоцианты. При изучении РС микросимбиоты оказалось, что предварительное соинкубирование доминантов с супернатантами ассоциантов приводило к увеличению ингибирующего эффекта влияния *Bifidobacterium spp.* на РС дисбиотических культур *S. aureus* с  $72,2 \pm 6,3$  % до 100 % ( $p < 0,05$ ), лактозонегативных гемолитических *E. coli* с  $80,6 \pm 5,6$  % до 100 % ( $p < 0,05$ ), *K. pneumoniae* с  $86,1 \pm 4,8$  % до 100 % ( $p < 0,05$ ) и появлению антагонистической активности в отношении всех исследуемых штаммов *C. albicans*, изначально не чувствительных к супернатанту бифидобактерий. Предварительное соинкубирование доминантов с супернатантами ассоциантов, характерных для эубиоза кишечника, способствовало увеличению распространенности стимулирующего эффекта влияния бифидобактерий на РС культур *E. faecium* с  $30,6 \pm 6,5$  % до  $63,9 \pm 8$  % ( $p < 0,05$ ) и штаммов лактозопозитивных негемолитических *E. coli* с  $19,5 \pm 5,6$  % до  $61,1 \pm 8$  % ( $p < 0,05$ ). Кроме того, отмечено снижение распространенности ингибирующего типа воздействия бифидобактерий на РС энтерококков с  $44,4 \pm 7$  % до  $13,8 \pm 5,7$  % ( $p < 0,05$ ) и кишечных палочек с  $47,2 \pm 7,1$  % до  $11,1 \pm 5,2$  % ( $p < 0,05$ ). Сходные данные были получены в отношении БПО и АЛА ассоциантов.

**Заключение.** На основании экспериментальных данных выявлен феномен оппозитного (усиления/подавления)

влияния микросимбиоты на их базовые физиологические функции (репродукция и адаптация), позволяющий реализовать принцип «свой – чужой» в паре «доминант – ассоциант» в условиях микросимбиоза.

## ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕНОВ ПНЕВМОКОККА

Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В., Леонова А.Ю., Романенко Э.Е., Ястребова Н.Е., Михайлова Н.А.

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

Инфекции, возбудителем которых является *Streptococcus pneumoniae*, являются одной из ведущих причин инфекционной заболеваемости и смертности среди лиц пожилого возраста, детей и пациентов с хронической патологией. Общеизвестно, что такие заболевания как менингит, сепсис, пневмония, средний отит вызываются капсульными штаммами *S. pneumoniae*. Однако существующие современные полисахаридные и конъюгированные с белком-носителем (столбнячный и дифтерийный анатоксины, D-протеин *Haemophilus influenzae*) пневмококковые вакцины обладают одним общим недостатком. К полисахаридным антигенам формируется строго сероспецифический иммунный ответ, что определяет бесперспективность таких вакцин при смене серотипов возбудителя в этиологии пневмококковых заболеваний у человека. Поэтому представляет интерес изучение свойств белков *S. pneumoniae*, поскольку последние обладают потенциально высокой внутривидовой перекрестной активностью.

**Целью нашей работы** явилось определение перекрестной активности белоксодержащих антигенов пневмококка *in vitro* и *in vivo*.

**Задачи исследования:** 1) получить белоксодержащие антигены пневмококка; 2) оценить их перекрестную активность; 3) доказать наличие в белоксодержащих антигенах белков пневмококка; 4) проверить протективную активность выделенных препаратов.

**Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F и 36R, полученные из коллекций штаммов пневмококка ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Культуру *S. pneumoniae* выращивали в сердечно-мозговом бульоне в течение 16-18 ч. при температуре 37°C и 5% содержании углекислого газа. Белоксодержащие антигены выделяли из выщепленных серотипов путем осаждения надосадочной фракции культуральной среды. Иммунохимическую активность белоксодержащих антигенов оценивали с помощью методов иммуноферментного анализа (ИФА), реакции преципитации по Оухтерлони и иммуноблоттинга. Протективную активность полученных препаратов определяли в опытах активной защиты мышей.

**Результаты.** С помощью ИФА показано, что белоксодержащие антигены пневмококка серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F и 36R, сорбированные на твердой фазе в дозе 5 мкг/мл, взаимодействовали с кроличьей иммунной сывороткой, полученной к серотипу 19F *S. pneumoniae*, в титре 1:640 – 1:1280. Разница оптической плотности между иммунной и неиммунной сыворотками составила  $\approx 0,2$  ( $p < 0,05$ ). В реакции преципитации в геле выявлено, что белоксодержащие антигены пневмококка серотипов 3, 6В, 14 и 36R в концентрации 1 мг/мл реагировали

с кроличьей сывороткой, полученной к серотипу 19F *S. pneumoniae*. В иммуноблоттинге определено, что белоксодержащие антигены пневмококка серотипов 3, 6B, 10A, 14, 19F и 36R связывались с моноклональными антителами к пневмококковому белку — пневмолизину. В опытах на мышах продемонстрировано, что белоксодержащие антигены пневмококка, выделенные из серотипов 6B, 10A, 14, 19F и 36R, при двукратной иммунизации защищали 80-100% экспериментальных животных ( $p < 0,05$ ) от заражения гетерологичным штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3.

**Заключение.** Исследуемые белоксодержащие антигены пневмококка обладают внутривидовой перекрестной активностью, что подтверждено в опытах *in vitro* и *in vivo*, а в их состав входит пневмолизин — белок, играющий важную роль в патогенезе пневмококковой инфекции.

### МЕТОД ИММУНОБЛОТТИНГА В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИЕРСИНИОЗА В РАМКАХ МНОГОПРОФИЛЬНОГО ЛАБОРАТОРНОГО ЦЕНТРА

Выливанная О.Б.

ГБУЗ «Диагностический центр лабораторных исследований», Москва, Россия

Поражение суставов является самым распространенным осложнением кишечного иерсиниоза. Нередко соответствующая симптоматика возникает после острой фазы инфекционного заболевания, когда прямое выявление возбудителя маловероятно. Поэтому в лабораторной диагностике постинфекционных артритов основное значение имеет использование серологических методов.

**Цели и задачи работы:** выяснение необходимости использования двустадийного алгоритма при серологической диагностике иерсиниоза.

В лаборатории ГБУЗ ДЦЛИ ДЗМ в 2012-2015 годах обследовано более 13000 пациентов с подозрением на кишечный иерсиниоз, с реактивным артритом и воспалительными заболеваниями с неустановленным возбудителем (пневмония, бронхит, нарушения пищеварения неясного генеза) на наличие специфических антител к *Yersinia enterocolitica*, а также к другим бактериям и вирусам.

Для тестирования использовали диагностические наборы «Anti-Yersinia enterocolitica ELISA (IgG)» и «Anti-Yersinia enterocolitica ELISA (IgA)» производства фирмы EUROIMMUN, Германия. Положительные результаты, полученные при использовании ИФА наборов, повторно исследовали с помощью наборов типа Вестерн-блот.

**Результаты.** Методом ИФА положительные антитела 170 (IgA) и 39 (IgG) были выявлены у произвольно выбранных 427 обследованных лиц, что составило 39% и 9.1% соответственно. Наборы типа Вестерн-блот использовали в качестве подтверждающего теста. С их помощью положительная реакция была подтверждена в 11 (IgG) и 61 (IgA) случаях. При анализе ложноположительных образцов было установлено, что они содержат антитела IgA и IgM к другим возбудителям инфекций, что позволяет предположить высокую вероятность определения перекрестных антител.

В работе анализируется несколько сложных диагностических случаев из клинко-лабораторной практики, когда применение вышеупомянутых тест-систем оказалось решающим фактором для постановки правильного диагноза

**Заключение:** применение наборов типа Вестерн-блот для диагностики иерсиниоза позволяет повысить специфичность диагностического исследования и снизить вероятность назначения неадекватной терапии.

### ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ И ИХ КОМПЛЕКСА НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБИОЗЕ КИШЕЧНИКА

Ермоленко Е.И.<sup>1,2</sup>, Борщев Ю.Ю.<sup>1</sup>, Рыбальченко О.В.<sup>2</sup>, Тарасова Е.А.<sup>1</sup>, Леонтьева Г.Ф.<sup>1</sup>, Крамская Т.А.<sup>1</sup>, Орлова О.Г.<sup>2</sup>, Суворов А.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Дисбиоз кишечника приводит к изменениям местного и общего иммунитета. Успех коррекции данной патологии при помощи пробиотиков зависит от правильности выбора пробиотических штаммов. Однако до сих пор особенностях их действия на организм хозяина остаются мало изученными.

**Целью работы** явилось исследование влияния пробиотических штаммов и их смеси на морфофункциональное состояние слизистой оболочки, клеточный и гуморальный иммунитет на модели экспериментального дисбиоза кишечника.

В эксперименте были использованы 5 групп крыс (самцы, Вистар). Животным из групп Е, L, В, М и контрольной группы внутрижелудочно вводили сначала ампициллин и метронидазол (3 дня), а затем в течение 5 дней *Enterococcus faecium* L3 (Е), *Lactobacillus rhamnosus* K32 (L), *Bifidobacterium longum* GT15 (В), смесь перечисленных бактерий (М) или воду (К1). Крысы из второй контрольной группы (К2) не получали никаких препаратов.

Иммунологические показатели и морфофункциональные свойства кишечника были исследованы на 9-ый день эксперимента. Морфологические исследования проводились при помощи световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Содержание цитокинов IFN- $\alpha$ , MCP-1, TNF- $\alpha$  и IL-10 в сыворотке крови определяли при помощи иммуноферментного анализа (Bender MedSystems, США). Экспрессия генов, обеспечивающих продукцию цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-8 и IL-10, оценивалась при помощи ОТ-ПЦР.

Признаки воспаления были выявлены во всех образцах слизистой оболочки, за исключением К2 группы. Количество лейкоцитов в этих образцах увеличилось (в основном за счет фракции лимфоцитов). У крыс из групп Е и М в отличие от других животных отмечено увеличение количества бокаловидных клеток, из которых наблюдался активный выброс слизи. Большое число энтероцитов с поврежденными микроворсинками, расширение межклеточного пространства были выявлены в группе К1 и L. Только в группах Е, В и М эпителиальные клетки были в физиологически активном состоянии и имели классическую топографию (как в группе К2).

Экспрессия провоспалительного цитокина IL-8 в брыжеечных лимфатических узлах была самой высокой в группах К1 и L. Экспрессия IL-10 был выражена в большей степени в группах Е, В и М, при сравнении с другими группами.

Только в группе К1 в сыворотке были обнаружено увеличение концентрации IFN- $\alpha$  и MCP-1. Содержание про-

тивовоспалительных цитокинов и регуляторного цитокина TGF- $\beta$  и IL-10 было более высоким в группах E и M.

Таким образом, изменения в слизистой оболочке кишечника при пробиотической коррекции дисбиоза сопровождается значительными, но различающимися, в зависимости от использованных штаммов бактерий, сдвигами в иммунной системе (местными и системными). Использование поликомпонентных пробиотиков позволяет компенсировать недостаток активности их отдельных компонентов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01861 и ГК 8418-7/2014.

## КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РОТАВИРУСНЫХ ГАСТРОЭНТЕРИТОВ У ДЕТЕЙ

Ермоленко К.Д.<sup>1,2</sup>, Куляшова Л.Б.<sup>1</sup>, Быстрова Г.Ф.<sup>1</sup>, Гончар Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> НИИ детских инфекции ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Острые кишечные инфекции являются одной из актуальных проблем здравоохранения, затрагивающей детей всех возрастов вне зависимости от географического региона и уровня социально-экономического развития. От 20 до 73 % в общей структуре острых кишечных инфекций у детей составляют инфекции, вызываемые вирусами и, в частности, ротавирусами. На сегодняшний день недостаточно изученными являются механизмы взаимодействия данного возбудителя с иммунной системой ребёнка, определяющие тяжесть течения заболевания, длительность вирусыведения и частоту развития постинфекционных гастроэнтерологических осложнений.

**Целью данной работы** явилось изучение особенностей иммунного ответа у детей с острым периодом ротавирусного гастроэнтерита и в период ранней реконвалесценции.

**Материал и методы.** В период с января по февраль 2015 года было обследовано 25 детей в возрасте от 1 года до 7 лет, госпитализированных в отделение кишечных инфекций НИИ детских инфекции ФМБА России с лабораторно подтверждённым ротавирусным гастроэнтеритом среднетяжелого и тяжелого течения. Средний возраст исследуемой группы составил – 1,7 $\pm$ 1,1 лет. У всех пациентов проводилось стандартное клинико-лабораторное обследование (при поступлении, на 7 и 21 дни наблюдения), ультразвуковое исследование органов брюшной полости и почек. Иммунный ответ оценивался на основании иммунограммы (интерфероновый статус, общий уровень иммуноглобулинов А, М, G, E, циркулирующих иммунных комплексов, реакции торможения миграции лейкоцитов, определения концентрации CD 3, CD 4, CD 8, CD 16, CD 19, CD 25 клеток) – на 2-3 день стационарного лечения, и на 21 день наблюдения, а также определения уровня С-реактивного белка, общего белка, альбумина (при поступлении, на 7 и 21 дни наблюдения).

Диагноз ротавирусной инфекции подтверждался при помощи полимеразной цепной реакции в фекалиях с использованием праймеров для выявления РНК/ДНК бактериальных и вирусных возбудителей производства «АмплиСенс®». Пациенты с сопутствующей инфекционной,

гастроэнтерологической патологией из исследования исключались.

**Результаты.** Острый период инфекции у большинства пациентов протекал с характерными иммунологическими и биохимическими изменениями. В крови у большинства пациентов отмечался умеренный лейкоцитоз – средний показатель 12,8  $\pm$  3,7  $10^3$  кл/мкл, сопровождающийся повышением скорости оседания эритроцитов – 23 $\pm$ 2,9 мм/ч и уровня С-реактивного белка 19 $\pm$ 4,3 мг/л.

Нарушения в иммунограмме наблюдались у 24 (96%) детей в остром периоде наблюдения и у 18 (72%) детей на 21 день стационарного наблюдения. В 20 наблюдениях (80%) на 4-5 сутки болезни сывороточный уровень интерферона был повышен (17,2 $\pm$ 2,4 МЕ/мл), на фоне снижения резервов продукции интерферона лейкоцитами, в то время как на 21 сутки лечения индуцированная выработка интерферона была снижена у 16 детей (64%). У 6 пациентов (24%) в остром периоде и 13 (52%) в стадии реконвалесценции отмечалось повышение иммуноглобулинов различных классов и циркулирующих иммунных комплексов в крови.

Индекс торможения миграции лейкоцитов (миграция с фитогемагглютинином) в остром периоде был снижен у 4 детей и у 9 детей в стадии ранней реконвалесценции, причем у трех из них в течение 3 месяцев до госпитализации отмечался не менее 1 эпизода острых кишечных инфекций. В 5 случаях (20%) на 3 день госпитализации в иммунограмме отмечалось снижение зрелых Т и В лимфоцитов. Подобные изменения отмечались у 15 детей (60%) на 21 день наблюдения. При этом у 8 из них на 21 сутки лечения сохранялись жалобы на увеличение частоты дефекации, изменение консистенции стула.

**Выводы.** Ротавирусные гастроэнтериты у большинства детей протекают с вовлечением различных звеньев иммунного ответа. После перенесенной инфекции у значительной доли пациентов (60%) отмечается период снижения иммунной реактивности, что может приводить к повышению риска инфицирования другими возбудителями.

Дальнейшие исследования необходимы для выявления иммунологических факторов, предрасполагающих к неблагоприятному течению ротавирусных гастроэнтеритов.

## НЕКОТОРЫЕ ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ СОВРЕМЕННОГО ТЕЧЕНИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ ДЕТЕЙ

Ефименко М.В., Холодок Г.Н., Супрун Е.Н., Козлов В.К.

Хабаровский филиал ФГБНУ ДНЦ ФПД НИИ охраны материнства и детства, Хабаровск, Россия

**Введение.** Данные медико-демографических показателей свидетельствуют о неуклонном росте болезней органов дыхания (БОД) и их высоком удельном весе у детей, превышающем показатели не только в ДВФО, но в Российской Федерации. Пневмонии и БА занимают более половины, регистрируемых БОД у детей в Хабаровском крае. Хабаровский край занимает 2-е место среди территорий ДВФО, уступая лишь Приморскому краю, а сравнительный анализ динамики показателей заболеваемости пневмонией среди детей в Хабаровском крае свидетельствует о стабильно высоком ее уровне, высоких темпах прироста (86%). У подростков отмечается рост заболе-

ваемости в 2 раза, а темпы прироста составляют 113%. Исследование этиологии определило, что лидирующим возбудителем внебольничной пневмонии у детей в Хабаровском крае является *S. pneumoniae* с частотой детекции до 23% у детей первого года жизни и 52-66% у детей старше 1 года. Выявлена ко-инфекция *S. pneumoniae* с *M. pneumoniae* (до 13,3%), другими бактериальными возбудителями, относящимися к условно-патогенной группе, и вирусными агентами, обуславливающая нетипичное течение заболевания. *H. influenzae* типа *b* занимает максимум до 2,9% в структуре возбудителей пневмонии. У детей первого года жизни спектр возбудителей пневмонии характеризуется увеличением доли энтеробактерий (преимущественно *E.coli*).

**Цель и задачи.** Изучить молекулярно-клеточные иммунные механизмы этиопатогенеза, клинического течения острой бронхолегочной патологии.

**Материалы и методы.** На базе Института проведено клиничко-лабораторное обследование четырёх групп детей с внебольничной пневмонией (ВП): 1 группа – ВП с типичным течением заболевания; 2 группа – ВП, развившейся на фоне врожденного порока развития легких (ВП+ВПРЛ); 3 группа – ВП с синдромом интоксикации (ВП+СИ); 4 группа – ВП без воспалительных изменений гемограммы (ВПг). Определены показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета в крови, содержание цитокинов в цельной крови. Группу сравнения составили практически здоровые дети.

**Основные результаты.** В основе прогрессирования и хронизации микробно-воспалительных заболеваний лежат нарушения иммунологической реактивности. Контроль показателей цитокинов является важной лабораторной информацией для оценки тяжести течения заболевания и его прогноза. Особенности цитокиновой регуляции иммунного ответа у детей с ВП с синдромом интоксикации является значительное повышение продукции провоспалительных цитокинов (MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VEGF) и значительное ингибирование синтеза IL-4, IL-17. В сравнении с показателями детей основной группы (ВП с типичным течением заболевания) у детей с ВП, протекающей с выраженным интоксикационным синдромом спонтанный уровень синтеза MCP-1 соответствует 556,2% ( $p < 0,05$ ) от показателя основной группы (повышен в 5,6 раз), TNF- $\alpha$  – 175,1% ( $p < 0,05$ ), IL-1 $\beta$  – 137,3% ( $p < 0,05$ ), VEGF – 471,1% ( $p < 0,05$ ). Соотношение исследуемых цитокинов сохраняется после стимулирования иммунокомпетентных клеток смешанным митогеном (ФГА, Конковалин А): выявляется высокая продукция MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VEGF, а также IL-4, содержание которого на 75,0% превышает показатель основной группы. Развитие острого бронхолегочного заболевания на фоне дефектов органогенеза респираторной системы (ВПРЛ) приводят к наиболее выраженному нарушению продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками, к их постоянному синтезу и истощению, что истощает экспрессию молекул межклеточной адгезии на поверхности активированных макрофагов, негативно влияя с одной стороны на антигенпредставляющую стадию иммунного ответа, с другой – недостаток цитокинов (TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$ ).

**Заключение.** Выявлено, что разнонаправленность изменений про- и противовоспалительных цитокинов, уровень активности местных и системных факторов иммунологической защиты определяют характер течения воспалительного ответа у детей с острой бронхолегоч-

ной патологией: недостаточная в фазе начала заболевания бактерицидная и окислительно-метаболическая активность нейтрофильных гранулоцитов, неадекватный степени тяжести низкий уровень TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, IL-2 определяют клиническое течение (степень, тяжесть и возможность развития осложнений) у детей с острой бронхолегочной патологией, а угнетение кислородзависимых механизмов бактерицидности нейтрофилов, выраженная напряженность Т-клеточных механизмов защиты, снижение базальной и стимулированной секреции провоспалительных факторов (TNF- $\alpha$  и IL-8) свидетельствует о наличии хронического процесса в легких.

## СИНТЕЗ И СЕКРЕЦИЯ КАТЕПСИНА G КЛЕТКАМИ ПАНЕТА КИШЕЧНЫХ ЖЕЛЁЗ ЧЕЛОВЕКА (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Замолодчикова Т.С.<sup>1</sup>, Прохоров А.В.<sup>2</sup>,  
Свирицкая Е.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН, Москва, Россия

На всей своей протяжённости желудочно-кишечный тракт подвергается мощной антигенной нагрузке, особенно значительной в просвете кишечника. Иммунологический контроль за антигенным и химическим составом веществ, проникающих из химуса во внутреннюю среду организма, осуществляют иммунокомпетентные клетки слизистой кишечника. Некоторые клетки защитной системы, такие как тучные клетки, нейтрофилы и Т-лимфоциты продуцируют сериновые протеазы, которые в значительной степени обуславливают роль этих клеток как эффекторов в защитных реакциях. В последнее время изучению этих протеаз уделяется повышенное внимание в связи с их предполагаемым участием в различных патологических процессах. Катепсин G-сериновая протеаза секреторных гранул клеток иммунной системы, синтезируемая нейтрофилами, моноцитами и тучными клетками. Катепсин G обладает антимикробными свойствами, нейтрализует токсины, расщепляет белки межклеточного матрикса, способствуя миграции иммунных клеток.

В настоящем исследовании была проведена локализация лейкоцитарного катепсина G в двенадцатиперстной кишке человека с использованием иммуноцитохимических методов и конфокальной микроскопии. В результате исследования было установлено ранее неизвестные места биосинтеза этого белка. Катепсин G-специфическая иммуофлуоресценция впервые была продемонстрирована в базальной части кишечных желёз (крипт), где расположены клетки Панета. Мощная иммуофлуоресценция регистрируется в подъядерной части (в зоне шероховатого эндоплазматического ретикулума) клеток Панета, в зоне расположения секреторных гранул и в просвете кишечной железы. Полученные результаты свидетельствуют о синтезе и секреции катепсина G клетками Панета. Кроме того, была зарегистрирована катепсин G-специфическая флуоресценция в другом типе клеток криптального эпителия, фенотипически определяемого как энтероэндокринная клетка. Флуоресцентно меченые катепсин G-специфические антитела также связывались с секреторными гранулами полиморфноядерных нейтро-

филов и тучных клеток, в значительном количестве присутствующих в собственной пластинке слизистой (lamina propria).

Первым эшелон антибактериальной защиты слизистой кишечника являются расположенные на дне кишечных желёз клетки Панета, которые известны исследователям более века. Клетки Панета синтезируют целый ряд бактерицидных факторов — антимикробные пептиды (дефенсины, криптины), лизоцим, фосфолипазу 2, ангиогенины, IgA. В ответ на бактериальную стимуляцию происходит дегрануляция клеток Панета и содержимое секреторных гранул, в том числе и антибактериальные факторы, попадают в просвет крипты. Клетки Панета и нейтрофилы имеют некоторое функциональное сходство — оба типа клеток участвуют в неспецифическом иммунитете и синтезируют общие антимикробные факторы, такие как дефенсины и лизоцим.

Обнаружение катепсина G в клетках Панета в просвете крипты свидетельствует о постоянном присутствии этого белка в зоне кишечного эпителия, вне зависимости от содержания иммунных клеток в слизистой. Криптальный катепсин G может играть значительную роль в антибактериальной защите эпителиальных клеток.

В настоящей работе впервые показано, что в дуоденальной слизистой человека катепсин G синтезируется не только свободными клетками системы врождённого иммунитета, но и эпителиоцитами крипт — клетками Панета. Лейкоцитарный катепсин G освобождается в межклеточное пространство в ходе дегрануляции клеток в ответ на рецептор-опосредованную стимуляцию преимущественно при воспалении, тогда как клетки Панета в норме постоянно секретуют в просвет крипты антимикробные факторы, в число которых, как выясняется, входит и катепсин G. Полученные результаты указывают на постоянное присутствие катепсина G в кишечных железах в качестве одного из факторов антибактериальной защиты кишечника.

#### **ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ ДИПЕПТИДА ГЛУТАМИЛ-ТРИПТОФАНА С ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТОЙ В ОТНОШЕНИИ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА**

**Зарубаев В.В.<sup>1</sup>, Смирнов В.С.<sup>2</sup>, Гаршинина А.В.<sup>1</sup>, Штро А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ гриппа, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Грипп представляет собой высоко контагиозное заболевание человека. Вирус гриппа вызывает ежегодные эпидемии, а при появлении нового варианта вируса — пандемии, охватывающие все регионы земного шара. Пандемия гриппа А(H1N1)pdm09 характеризовалась широким охватом населения многих стран мира, тяжёлым клиническим течением и высокой летальностью. В последние годы отмечены случаи инфицирования человека вирусами гриппа птичьего происхождения подтипов H5N1, H6N2, H7N7 и H7N9.

Противогриппозными этиотропными препаратами являются производные адамантана (амантадин и ремантадин) и ингибиторы вирусной нейраминидазы — осельтамивир (Тамифлю®) и занамивир (Реленца®), а также перамивир (Рапиакта®) и ланинамивир (Инавир®). Недостатком этих препаратов является снижение их эффективности при позднем (после 48 часов от начала заболева-

ния) начале лечения. Кроме того, к этиотропным препаратам вирус способен быстро вырабатывать устойчивость.

**Целью настоящего исследования** была оценка противовирусной активности дипептида глутамил-триптофана (EW) и глицирризиновой кислоты (GA) в комбинации и в виде монопрепаратов.

**Материалы и методы.** Опыты проводили на модели летальной гриппозной пневмонии белых мышей, вызванной вирусами гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и осельтамивир-устойчивым штаммом A/Владивосток/02/09 (H1N1). В отдельной группе опытов изучали противовирусные свойства GA и EW на модели аденовирусного гепатита у новорожденных сирийских хомяков. В ходе экспериментов оценивали выживаемость животных, инфекционную активность вируса гриппа в ткани, морфологическую структуру органа-мишени (легких или печени в случае аденовирусной инфекции), а также уровень интерферона в сыворотке крови. **Результаты.** Показано, что при гриппозной инфекции у мышей применение обоих препаратов приводило к снижению специфической смертности (индекс защиты до 77%) и повышению продолжительности жизни животных. В ряде случаев защитный эффект препаратов превосходил таковой для препарата сравнения — ремантадина. Применение GA не влияло на репродукцию вируса в ткани, однако использование EW в дозах 10 и 1000 мкг/кг приводило к достоверному снижению инфекционной активности вируса в легких, причем ингибирующий эффект был более выражен, если EW использовался в виде монопрепарата, а не в комбинации с GA.

При помощи морфологического анализа показана способность изученных соединений к ограничению признаков вирусспецифического и реактивного поражения ткани легких на острой стадии гриппозной пневмонии, что проявлялось ограничением протяженности очагов пневмонии, снижением степени отека легких и воспалительной клеточной инфильтрации ткани. Кроме того, на стадии хронической постгриппозной пневмонии использование EW-GA приводило к ограничению размеров очагов, нормализации структуры легочной ткани, в том числе повышению степени воздушности респираторных отделов, повышением количества и сохранностью эластического каркаса легочной ткани. При помощи морфометрического анализа показана способность комбинации EW-GA к цитопротекторному действию в отношении клеток бронхиального эпителия.

Эти же закономерности были подтверждены при использовании осельтамивир-устойчивого штамма вируса A/Владивосток/2/09 (H1N1). Кроме того, была продемонстрирована способность EW-GA к стимуляции продукции интерферона в сыворотке крови инфицированных животных. Уровни интерферона составили 44, 38 и 66 МЕ/мл у контрольных животных, животных, получавших Тамифлю и EW-GA, соответственно.

На модели аденовирусной инфекции показано, что использование EW-GA снижало репликативную активность вируса на 0,6 — 1,2 порядка. Показано, что GA и комбинация GA+EW приводили к нормализации структуры печени инфицированных животных как на уровне световой микроскопии, так и на ультраструктурном уровне.

**Выводы.** Вместе взятые, полученные результаты позволяют рассматривать комбинацию EW-GA как перспективное средство терапии респираторных вирусных инфекций и говорить о комплексном механизме его противовирусной активности.

**ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ, АКТИВАЦИЯ  
ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И ИНДУКЦИЯ  
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ  
ИКСОДОВЫМ КЛЕЩЕВЫМ БОРРЕЛИОЗОМ  
И КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ**

**Ильинских Е.Н., Замятина Е.В., Галактионова О.И.**

*Сибирский государственный медицинский университет,  
Томск, Россия*

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) и клещевой энцефалит (КЭ) — актуальные острые инфекционные трансмиссивные природно-очаговые заболевания, имеющие тенденцию к хроническому и рецидивирующему течению, поражающее преимущественно нервную систему.

**Цель настоящей работы** — определить взаимосвязь между продукцией цитокинов, активацией окислительных процессов и индукцией цитогенетических нарушений или апоптоза в культурах мононуклеарных клеток у больных ИКБ и КЭ.

Обследовано 31 больной с диагнозом ИКБ, 37 больных КЭ, 35 больных с микст-инфекцией ИКБ и КЭ, а также 34 контрольных здоровых лица. Получали культуры лимфоцитов периферической крови, стимулированные фитогемагглютинином (ФГА), с целью оценки уровня цитогенетически измененных клеток методом хромосомного анализа, определения числа лимфоцитов в культурах, находящихся в фазе апоптоза с помощью набора АРО-BRDU Kit («BD Pharmingen», США), а также для оценки спонтанной и стимулированной продукции цитокинов в супернатантах клеток методом твердофазного ИФА. В периферической крови определяли показатели перекисного окисления липидов, а также сывороточный интерлейкин-6 (ИЛ-6).

Установлено, что в культурах больных ИКБ, КЭ и микст-инфекции по сравнению с контролем, происходит значительный рост числа лимфоцитов с признаками геномной нестабильности, включая полиплоидию, анеуплоидию и хроматидные разрывы, при одновременном увеличении их апоптоза ( $p < 0,01$ ). Наиболее высокие уровни клеток с цитогенетическими абберациями были выявлены у больных КЭ и микст-инфекцией, по сравнению с группой больных ИКБ ( $p < 0,05$ ). Уровни клеток с цитогенетическими нарушениями у всех групп больных положительно коррелировали с уровнями ИЛ-6 в сыворотке крови ( $p < 0,01$ ), а также с диеновыми конъюгатами и малоновым диальдегитом ( $p < 0,05$ ), содержание которых в крови было существенно повышено, по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). В супернатантах культур, стимулированных ФГА, у больных ИКБ, КЭ и микст-инфекцией, по сравнению с контролем, были значительно увеличены уровни интерферона (ИФ)-гамма ( $p < 0,01$ ), ИФ-альфа ( $p < 0,01$ ), фактора некроза опухоли (ФНО)-альфа ( $p < 0,01$ ) и ИЛ-6 ( $p < 0,01$ ). Установлена корреляция между уровнем апоптоза мононуклеаров в культурах больных и концентрацией ФНО-альфа ( $p < 0,01$ ). Добавление антител против ИФ-гамма в культуры достоверно уменьшало формирование полиплоидных клеток, что свидетельствует о роли этого цитокина в образовании многоядерных клеток путем слияния.

Известно, что цитогенетическая стабильность и рост апоптоза иммунокомпетентных клеток является одним из критериев их функциональной полноценности. Результаты могут свидетельствовать о подавлении

Т-клеточного иммунного ответа, особенно у больных КЭ и микст-инфекцией КЭ и ИКБ.

**КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
РАЗВИТИЯ ОСТРОГО ГЕПАТИТА ПРИ КОКСИЕЛЛЕЗЕ**

**Карпенко С.Ф., Галимзянов Х.М., Аракельян Р.С.**

*Астраханский государственный медицинский  
университет, Астрахань, Россия*

Коксиеллез (лихорадка Ку) является природно-очаговым заболеванием, наиболее часто регистрируемым в России в Астраханской области. Одним из клинических проявлений коксиеллеза является развитие острого гранулематозного гепатита.

Целью настоящего исследования явилось выявление клинико-патогенетических особенностей развития острого гепатита при коксиеллезе на основе изучения клинических проявлений, общего содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и органической гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Было обследовано 169 больных коксиеллезом в возрасте от 17 до 50 лет (133 мужчин и 36 женщин). Диагноз коксиеллеза ставился на основании эпидемиологических, клинико-anamnestических данных и результатов иммуноферментного анализа («Coxiella burnetii Elisa IgG, IgM», Vircell, Испания), полимеразной цепной реакции («АмплиСенс Coxiella burnetii-FL» ФБУН «ЦНИИЭ», Россия). Все больные получали комплексную терапию. В качестве этиотропной терапии назначался доксицилин по общепринятой схеме. Контроль — 60 доноров. Общее содержание ЦИК в сыворотке крови определяли методом осаждения в 4% растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) по В. Гашковой (1977). Уровень ЦИК в контроле составил  $60,3 \pm 2,7$  усл. ед. ГЗТ изучали в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с печеночным экстрактом (ПЭ) по методу Clausen I. (1971). Исследования проводили в динамике: в период разгара (1-2 недели болезни) и в период ранней реконвалесценции (3-4 недели болезни). Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы Microsoft Excel.

Как показали наши исследования, больные коксиеллезом поступали в стационар на  $6,6 \pm 0,5$  день болезни. У 33 пациентов (19,5%, 1 группа) отмечалось развитие острого гепатита, сопровождавшегося желтухой. У 136 больных (80,5%, 2 группа) гепатит не наблюдался. Оказалось, что у пациентов 1 группы при сравнении с больными 2 группы дольше в 1,4 раза протекала болезнь ( $19,0 \pm 1,2$  против  $13,8 \pm 0,4$  дней,  $p < 0,001$ ), а также длительнее отмечались в 1,3 раза лихорадка ( $12,3 \pm 1,2$  против  $9,5 \pm 0,4$  дней,  $p < 0,05$ ), в 1,4 раза слабость ( $14,4 \pm 1,1$  против  $10,3 \pm 0,5$  дней,  $p < 0,05$ ), в 1,6 раза озноб ( $11,8 \pm 1,9$  против  $7,2 \pm 0,5$  дней,  $p < 0,05$ ), в 1,3 раза гепатомегалия ( $19,2 \pm 1,2$  против  $14,9 \pm 0,7$  дней,  $p < 0,01$ ). Содержание ЦИК за весь период болезни у пациентов 1 группы оказалось в 3,7 раза, а у больных 2 группы в 2,2 раза выше нормы ( $p < 0,001$ ). При этом, уровень ЦИК у пациентов 1 группы был в 1,7 раза выше такового у пациентов 2 группы ( $221,7 \pm 20,4$  усл. ед. против  $130,4 \pm 12,8$  усл. ед.,  $p < 0,001$ ). В период разгара болезни показатели ЦИК у больных 1 и 2 групп в 3,2 и 1,9 раза превышали контрольные значения ( $p < 0,001$ ). Уровень ЦИК у больных 1 группы в 1,7 раза превышал таковой у пациентов 2 группы ( $195,4 \pm 24,4$  усл. ед. против  $116,4 \pm 11,7$  усл. ед.,  $p < 0,001$ ). У больных 1 группы в 1,3 раза чаще, чем у пациентов 2 группы, выявлялись повы-

шенные уровни ЦИК (88,9±7,4% против 67,7±5,8% случаев,  $p<0,05$ ). В период ранней реконвалесценции уровни ЦИК в 1 и 2 группах больных достигали 253,7±33,1 усл. ед. и 200,8±46,7 усл. ед., они были в 4,2 и 3,3 раза выше контрольных значений ( $p<0,001$ ). Статистически значимых различий между показателями ЦИК у больных обеих групп в этот период болезни не отмечалось. При этом, у всех больных 1 группы (100%) и у большинства пациентов 2 группы (84,6±10%) отмечалось повышение уровня ЦИК. При изучении органной ГЗТ в РТМЛ с ПЭ за весь период болезни ИМ в 1 и 2 группах составили 92,8±11,8% и 106,5±7,5%, статистически значимых различий выявлено не было. Однако в разгар болезни у пациентов 1 группы превалировало торможение миграции лейкоцитов, а у больных 2 группы — ускорение миграционной активности лейкоцитов. При этом ИМ у больных 1 группы был в 1,5 раза ниже такового у пациентов 2 группы (71,4±6,9% против 110,0±4,3%,  $p<0,001$ ). Ускорение миграции лейкоцитов у больных 2 группы отмечалось в 4,8 раза чаще, чем у пациентов 1 группы (47,7±7,5% против 10,0±9,5% случаев,  $p<0,001$ ). В период ранней реконвалесценции ИМ в 1 группе больных повышался до 109,2±19,2%. Частота выявления торможения и ускорения миграции лейкоцитов регистрировалась почти с одинаковой частотой у 38,5±13,5% и 46,2±13,8% больных. У больных 2 группы ИМ понижался до нормальных значений и был равен 91,6±16,6%. Частота выявления торможения и ускорения миграции лейкоцитов регистрировалась с одинаковой частотой у 50,0±15,8% больных.

Таким образом, у больных коксиейеллезом с развитием острого гепатита дольше протекала болезнь. Установлены иммунокомплексный характер болезни и аллергия при коксиейеллезе, которые были наиболее выражены при развитии гепатита. Одним из патогенетических механизмов формирования острого гепатита при коксиейеллезе, очевидно, является сочетание иммунокомплексных процессов и аллергического компонента.

#### СРЕДНЕ- И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ – ПРЕДИКТОРЫ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЛИХОРАДКИ ПРИ КОКСИЕЛЛЕЗЕ

Карпенко С.Ф., Галимзянов Х.М., Аракельян Р.С.

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

Известно, что одним из ведущих симптомов коксиейеллеза (лихорадки Ку) является лихорадка. Представляет несомненный интерес выявление прогностических кри-

териев длительности лихорадки при коксиейеллезе и создание математических моделей прогнозирования длительности лихорадки у конкретного больного, что позволило бы своевременно корректировать терапию.

**Цель работы** — выявление предикторов длительности лихорадки у больных коксиейеллезом.

Под наблюдением находилось 169 пациентов со среднетяжелым течением коксиейеллеза в возрасте от 17 до 50 лет. Средний возраст больных составил 31,0±1,3 год. Диагноз коксиейеллеза был подтвержден иммуноферментным анализом («Coxiella burnetii Elisa IgG, IgM», Vircell, Испания) и полимеразной цепной реакцией («АмплиСенс Coxiella burnetii-FL» ФБУН «ЦНИИЭ», Россия). Все больные получали комплексную терапию, включающую этиотропное (доксидиклин в первый день по 0,2 г, затем по 0,1 г однократно в течение 8,0±0,1 дней), патогенетическое и симптоматическое лечение. Обследование больных проводилось в динамике заболевания: в период разгара (1-2 недели болезни) и в период ранней реконвалесценции (3-4 недели болезни). Содержание средние и низкомолекулярных циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом осаждения в растворах полиэтиленгликоля (ПЭГ- 6000) по В. Гашковой (1977) по разнице концентраций, полученных соответственно в 3,75% и 3% растворах ПЭГ. Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программ Microsoft Excel и BioStat. С помощью регрессионного анализа определяли стандартизированные регрессионные коэффициенты, их стандартные ошибки, значения t-критерия (t-статистика) и уровни значимости (p).

Как показали наши исследования, больные поступали в стационар на 6,6±0,5 день болезни. Длительность лихорадочного периода варьировала от 5 до 28 дней и в среднем составила 13,5±0,8 дней. В разгар болезни температура у больных повышалась до 39—40 С, в среднем на 13,0±0,5 день болезни температура снижалась до субфебрильных цифр. Субфебрилитет сохранялся от 2 до 22 дней. В таблице показаны результаты регрессионного анализа, которые позволили выявить статистическую значимость ЦИК как предикторов длительности лихорадки при коксиейеллезе.

Были созданы математические модели, позволяющие прогнозировать длительность лихорадки у больных коксиейеллезом в разгар болезни, то есть при поступлении в стационар.

На 1 неделе болезни:  $y=6,5644+0,0367x$ , где  $y$  — длительность лихорадки, 6,5644 и 0,0367 — стандартизированные регрессионные коэффициенты,  $x$  — уровень

**ТАБЛИЦА. РЕЗУЛЬТАТЫ РЕГРЕССИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ЗАВИСИМОЙ ПЕРЕМЕННОЙ «ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ЛИХОРАДКИ» И НЕЗАВИСИМОЙ ПЕРЕМЕННОЙ «ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ» У БОЛЬНЫХ КОКСИЕЛЛЕЗОМ В РАЗГАР БОЛЕЗНИ (К ТЕЗИСАМ КАРПЕНКО С.Ф. И ДР.)**

Неделя болезни	Наименование	Коэффициент	Стандартная ошибка	t-статистика	p
1	intercept	6,5644	0,5175	12,6842	0
	циркулирующие иммунные комплексы	0,0367	0,0122	3,0015	0,01
2	intercept	7,3508	0,5877	12,5076	0
	циркулирующие иммунные комплексы	0,0474	0,0078	6,0797	0

средне- и низкомолекулярных ЦИК на 1 неделе болезни. На 2 неделе болезни:  $y=7,3508+0,0474x$ , где  $y$  — длительность лихорадки, 7,3508 и 0,0474 — стандартизированные регрессионные коэффициенты,  $x$  — уровень средне- и низкомолекулярных ЦИК на 2 неделе болезни.

Таким образом, была доказана актуальность определения средне- и низкомолекулярных ЦИК в качестве статистически значимых предикторов длительности лихорадки при коксиеллезе, созданы математические модели для прогнозирования длительности лихорадки у пациентов при поступлении в стационар, что позволит своевременно корректировать лечение больных коксиеллезом, и сократит их пребывание в стационаре.

## НОРМАЛЬНАЯ МИКРОБИОТА И ИММУННАЯ СИСТЕМА

Киселева Е.П.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия

По современным представлениям организм человека является гигантской химерой, состоящей на 90% из клеток симбионтных микроорганизмов и лишь на 10% из клеток человека. В литературе пока нет общепринятого обозначения функции иммунной системы, ответственной за поддержание взаимоотношений с симбионтными микроорганизмами. Взаимоотношения с комменсалами отличаются от борьбы с патогенами тем, что представляют собой физиологическую норму и не сопровождаются развитием воспаления, поскольку одним из основных принципов взаимного сожительства является непричинение вреда друг другу. В 2002 году В.Б. Климовичем для обозначения взаимодействия иммунной системы с нормальной микробиотой был впервые предложен термин «акцептивный иммунитет» и высказано предположение о том, что он представляет собой отдельную функцию иммунитета, отличную от протективной. Обеспечение возможности проживания большого количества видов симбионтных бактерий на слизистых рассматривается как отдельная и независимая функция иммунной системы — акцептивная. Будет проведено сопоставление основных эффекторных звеньев протективного (защита от патогенов) и акцептивного (взаимодействие с комменсалами) иммунитета. Будут рассмотрены основные гомеостатические механизмы, обеспечивающие симбиотические взаимоотношения в слизистой кишечника, происходящие на уровне эпителия, а также на уровне клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Поскольку симбионтные бактерии являются полезными для организма, основные задачи акцептивного иммунитета заключаются в обеспечении условий для создания и поддержания микробного биоценоза с одной стороны, а с другой — в обеспечении безопасности организма хозяина. Ключевым этапом этого взаимодействия является распознавание микробных продуктов с помощью паттерн-распознающих рецепторов на клетках хозяина. Основным ответом врожденного иммунитета является продукция слизи и антибактериальных пептидов клетками барьерного эпителия, а также развитие в подслизистой специфического микроокружения, богатого противовоспалительными факторами. Главным ответом адаптивного иммунитета является синтез секреторного иммуноглобулина А, который выделяется в просвет кишечника и взаимодействует с бактериями. При этом иммуноглобулин А не оказывает повреждающего действия в отношении комменсалов.

Напротив, этот фактор играет важную роль в создании симбиотических взаимоотношений. В качестве предполагаемых промикробных функций секреторного иммуноглобулина А рассматривают его участие в формировании биопленки, в организации фиксированного и свободного способов проживания кишечных бактерий, а также участие иммуноглобулина А в транспорте микроорганизмов через М-клетки. Для нормального гомеостаза слизистых в организме создается и постоянно поддерживается состояние иммунологической толерантности к антигенам нормальной микробиоты с участием Т-регуляторных клеток. Будут рассмотрены вопросы об участии в этом процессе двух основных популяций Т-регуляторных клеток — тимусных и индуцированных на периферии. Работа поддержана грантом РФФИ №15-04-06150.

## АКТУАЛЬНОСТЬ ДИАГНОСТИКИ ПАРВАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ ДОНОРОВ КРОВИ И ПЛАЗМЫ

Ковязина Н.А., Алхутова Н.А., Бардышева Н.А.,  
Ганапиев А.А.

ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России,  
Санкт-Петербург, Россия

Обеспечение инфекционной безопасности донорской крови по-прежнему является одной из наиболее актуальных проблем трансфузиологии. Несмотря на внедрение современных методов скрининга основных гемотрансмиссивных инфекций, мер по карантинизации крови и ее компонентов и т.д., риск инфекционных осложнений у реципиентов сохраняется. Частично риск обусловлен возможным присутствием в донорской крови тех инфекционных агентов, выявление маркеров которых не входит в стандартную схему скринингового обследования. К ним, в частности, относится парвовирус В19. Наиболее уязвимыми являются пациенты с иммуносупрессией. Данной категории реципиентов рекомендуется переливать только серопозитивную по IgG кровь, так как существует мнение, что в ней не содержится сам парвовирус В19.

**Цель:** оценить распространенность выявления иммуноглобулинов классов М и G к парвовирусу В19 (IgM В19V и IgG В19V) в донорской крови и обсудить целесообразность включения данных тестов в стандартный алгоритм обследования доноров

**Материалы и методы.** Исследовали 386 образцов сыворотки донорской крови, поступивших в лабораторию для стандартного скринингового исследования на наличие маркеров гемотрансмиссивных инфекций. Исследование проводили иммуноферментным методом с использованием комплекса оборудования «SUNRISE», «TECAN» США и наборов реагентов «Anti-Parvavirus В19 ELISA (IgG)» и «Anti-Parvavirus В19 ELISA (IgM)» EUROIMMUNE, Германия. Расчет значений проводили с помощью компьютерной программы «MAGELLAN», США. Результаты определения IgM В19V интерпретировали качественно согласно инструкции:  $\leq 0,8$  — отрицательно;  $0,8 - 1,1$  — неопределенно;  $> 1,1$  — положительно. Исследование IgG В19V было количественным; положительными считали образцы с концентрацией выше 4 МЕ/мл.

**Результаты.** IgM В19V были выявлены 1,3% случаев (5 из 386), 1 результат интерпретировался как неопределенный. Во всех указанных шести образцах также присут-

ствовавали антитела класса G. IgG B19V выявлены в 63,7%, 2,3% — неопределенно и 34,2% — отрицательно. Среди 246 положительных результатов IgG B19V 9,1% были выше 100 МЕ/мл.

**Выводы.** В результате проведенного обследования выявлены доноры с маркерами острой парвовирусной инфекции. Более четверти образцов донорской крови не содержат иммуноглобулины класса G, что может быть расценено как фактор риска. И в том и в другом случае для исключения инфицирования необходимо провести дополнительное молекулярно-диагностическое исследование.

Доля выявленных IgG B19V соответствует данным об их распространенности в популяции (около 70% у людей старше 25 лет).

Выполненное исследование подчеркивает актуальность вопроса о способе обеспечения инфекционной безопасности донорской крови, которая может быть достигнута за счет расширения алгоритма обследования доноров либо путем вирусной инактивации донорской крови и гемокомпонентов.

#### КОЛЛЕКТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ К ВИРУСУ ГРИППА A(H1N1)PDM09

Коншина О.С., Никоноров И.Ю., Позднякова М.Г., Ерофеева М.К.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Основа успешной борьбы с ОРВИ и гриппом — эпидемиологический надзор, важным элементом, которого является наблюдение за коллективным иммунитетом. Слежение за уровнем антител к вирусам гриппа, ранее циркулирующих на территории Санкт-Петербурга и других регионов, позволяет прогнозировать уровень заболеваемости при возникновении их рециркуляции.

В настоящее время нами ведется динамическое наблюдение за не привитыми против гриппа лицами в возрасте 18-60 лет, постоянно проживающими на территории Санкт-Петербурга. Исследования коллективного иммунитета позволяют совершенствовать методы специфической профилактики гриппа.

Отправной точкой наблюдения послужил эпидемический подъем, вызванный вирусом гриппа типа A(H1N1) pdm09 в сентябре 2009 г., с дальнейшим наблюдением на фоне пика заболеваемости гриппом в ноябре 2009 г. Отмечено, что из 130 обследованных добровольцев в реакции торможения гемагглютинации, число серонегативных к вирусу A(H1N1) pdm09 составило 86,9% (ДИ% 80,0-91,8). Дальнейшее наблюдение с января по ноябрь 2010 г. показало, что в Санкт-Петербурге вирус A(H1N1) pdm09 активно не циркулировал. Однако серологическое исследование 110 сывороток (апрель 2010 г.) показало, что число серонегативных лиц составило 58,0% (ДИ% 43,0-61,8). При оценке напряженности коллективного иммунитета в октябре 2010 г. вновь показано, что число серонегативных лиц составило до 84,9% (ДИ% 79,6-89,0). Дальнейшее наблюдение выявило повышение числа лиц с низким уровнем антител к вирусам гриппа в январе 2011 г. до 88,2% (ДИ% 82,5-92,3), после окончания эпидемического сезона, в мае 2011 г., отмечено уменьшение их числа до 66,5% (ДИ% 59,1-73,1).

В последующие эпидемические сезоны 2012-2013, 2013-2014 гг. продолжены наблюдения за напряженно-

стью коллективного иммунитета. Так, перед эпидсезоном 2013-2014 гг. число серонегативных лиц составило 41,2% (ДИ% 32,1-50,9).

Полученные данные свидетельствуют о недостаточном формировании и сохранении протективного иммунитета к вирусам гриппа у взрослого населения. Учитывая такую тенденцию, можно закономерно прогнозировать ухудшение эпидемиологической ситуации в случае возникновения дрейф- и шифт-вариантов вирусов гриппа.

#### ПРОТИВОВИРУСНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КЛЕЩЕВОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ

Крылова Н.В.<sup>1</sup>, Леонова Г.Н.<sup>1</sup>, Попов А.М.<sup>2</sup>, Артюков А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Владивосток, Россия

До настоящего времени этиотропная терапия клещевого энцефалита (КЭ), как и других вирусных инфекций, представляет собой сложную и нерешенную проблему. Одним из возможных подходов к эффективному патогенетически обоснованному лечению пациентов с КЭ является включение в комплексную терапию биологически активных соединений (белков, полисахаридов, пептидов, полифенолов и др.), выделенных из природных объектов и обладающих в ряду прочих свойств, иммуномодулирующим действием.

**Целью исследования** явилась оценка противовирусной активности биополимеров из морских гидробионтов (люромарин, тинростим) и их комбинированного использования с некоторыми официальными препаратами, применяемыми для профилактики и лечения КЭ, при экспериментальном КЭ.

Изучение эффективности веществ в отношении вируса КЭ проводили согласно требованиям Фармкомитета РФ по доклиническому исследованию лекарственных средств (2005), включающим двухэтапное исследование изучаемых препаратов на моделях *in vitro* и *in vivo*.

При исследовании противовирусной активности препаратов на культуре клеток СПЭВ установлено, что исследуемые препараты не токсичны для используемой культуры клеток, и проявляют ингибирующую активность в отношении вируса КЭ. Показано, что комбинированное использование официального препарата (рибавирина) и иммуномодуляторов из гидробионтов (люромарина, тинростима) более эффективно подавляет репродукцию вируса и имеет аддитивный характер.

Изучение протективного действия препаратов при остром летальном КЭ у мышей показало, что животные, не получавшие препаратов (контрольная группа), погибают, начиная с 9 суток после заражения (СПЖ составила 9,8±1,9 дней). Введение мышам люромарина и тинростима защищает от гибели 25-35% животных, увеличивая СПЖ на 2,7-4,7 дней. Показано, что комбинация официальных препаратов (рибавирина и циклоферона) с исследуемыми биополимерами оказывает выраженный защитный эффект аддитивного характера. Наиболее эффективным является сочетанное применение циклоферона и люромарина, которое защищает от гибели 60,0±10,0% мышей, увеличивая СПЖ на 7,0 дней, по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, биополимеры из морских гидробактерий - люромарин и тинростим с широким спектром биологического действия и иммуномодулирующими свойствами, проявляют *in vitro* и *in vivo* вирусингибирующую и протективную активность в отношении вируса КЭ. Экспериментально обоснована эффективность использования этих иммуномодуляторов в комплексной терапии КЭ.

### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ ВЭБ-ЭТИОЛОГИИ И ПРИ МИКСТ-ИНФЕКЦИИ

Кукушкина Е.А.<sup>1</sup>, Лопатина Т.К.<sup>1</sup>, Тульская Е.А.<sup>1</sup>, Устинова М.А.<sup>1</sup>, Зверева Н.Н.<sup>2</sup>, Новосад Е.В.<sup>2</sup>, Здыбель О.В.<sup>3</sup>, Сливкина О.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского  
Роспотребнадзора, Москва

<sup>2</sup> ГБОУ РНИМУ им Н.И. Пирогова Минздрава России,  
Москва

<sup>3</sup> ГБУЗ г. Москвы ИКБ №1, Россия

В настоящее время инфекционный мононуклеоз (ИМ) считается полиэтиологическим заболеванием, которое может быть вызвано различными вирусами семейства герпеса. Показано, что частота и выраженность наиболее постоянных клинических признаков заболевания неодинакова при различной его этиологии и в наибольшей степени характерна именно для ВЭБ-инфекционного мононуклеоза.

**Целью настоящей работы** было сравнение показателей, характеризующих активацию иммунной системы, в течение заболевания, вызванного либо вирусом Эпштейна-Барр либо сочетанием этой инфекции с цитомегаловирусной.

**Материалы и методы.** Обследовано 37 детей 4-14 лет, госпитализированных с диагнозом «инфекционный мононуклеоз». Серологические исследования, проведенные на ИФА-тест-системах Вектор-Бест (Россия) включали определение антител IgM, IgG к цитомегаловирусу, к EA, VCA и EBNA антигенам ВЭБ и определение avidности IgG к VCA и антигенам ЦМВ. На основе серодиагностики пациенты были разделены на группу переносящих острый ИМ ВЭБ-этиологии и группу с острым ИМ смешанной (ВЭБ и ЦМВ) этиологии.

Проведено сравнение иммунофенотипа лимфоцитов крови больных, продукции иммуноглобулинов В-лимфоцитами и продукции цитокинов (ИФН $\gamma$ , ИЛ-4) Т-лимфоцитами при 72-часовом культивировании.

**Результаты.** В остром периоде заболевания у всех пациентов наблюдалось резкое повышение количества цитолитических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, CD3+CD8+), в результате которого соотношение CD4+/CD8+ снизилось до 0,43 и 0,48 у больных 1 и 2 группы, соответственно. Повышение процента активированных ЦТЛ по сравнению с контрольной группой больных ангиной было значительным, но также не различалось между группами: CD8+HLADR+ - 25% и 29%, CD8+CD38+ 39% и 36 %.

Вместе с тем, способность Т-лимфоцитов продуцировать ИФН $\gamma$ , была выше у лиц, переносящих ИМ ВЭБ-этиологии: 2500 пг/мл и 1900 пг/мл, соответственно. Особенно это различие возрастало при сравнении соотношения между продукцией ИФН $\gamma$  и ИЛ-4. У больных с ИМ ВЭБ-этиологии отношение концентрации ИФН $\gamma$  и ИЛ-4

составляло 29,3 $\pm$ 12,2, а в группе с микст-инфекцией – 15,0 $\pm$ 6,9.

Количество В-лимфоцитов было снижено у большинства больных, однако концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови свидетельствовала об активном гуморальном иммунитете на инфекцию. Уровень IgE был повышен в сыворотках больных с обоими вариантами заболевания, но при микст-инфекции достоверно ниже (278 МЕ/мл в 1 группе и 110 МЕ/мл во 2 группе). Сывороточный уровень IgG был выше нормы только при моноинфекции ВЭБ.

Таким образом, даже в остром периоде ИМ имеются признаки меньшей активации иммунной системы, в случае если это заболевание связано с микст-инфекцией. Представляется интересным исследовать влияние особенностей в интенсивности иммунного ответа на длительность реконвалесценции и ее течение.

### ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВВЕДЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Кухаренко А.Е.<sup>1</sup>, Щелчкова Н.А.<sup>2</sup>, Бабаев А.А.<sup>2,3</sup>, Лапшин Р.Д.<sup>2</sup>, Гаврилова Н.А.<sup>1</sup>, Ловцова Л.В.<sup>2</sup>, Гравель И.В.<sup>4</sup>, Мухина И.В.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГУП Государственный НИИ генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний  
Новгород, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний  
Новгород, Россия

<sup>4</sup> ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
Минздрава России, Москва, Россия

В последнее время активно проводятся исследования по разработке терапевтических вакцин на основе рекомбинантных белков для лечения заболеваний, вызванных вирусом папилломы человека (ВПЧ). Одним из перспективных направлений в таких разработках считается использование в качестве иммунизирующего антигена раннего онкобелка E7 ВПЧ, конъюгированного с полноразмерным белком теплового шока HSP 70 *Mycobacterium tuberculosis*.

**Целью работы** явилось изучение динамики показателей клеточного иммунитета у мышей-самцов линии C57BL/6 при однократном внутримышечном введении терапевтической вакцины, состоящей из двух гибридных рекомбинантных белков на основе антигена E7 ВПЧ 6 или 11 типа, конъюгированных с полноразмерным белком теплового шока HSP 70, против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондилломатоза.

Животным опытной группы вводили исследуемый препарат в эквивалентных дозах. Животным контрольной группы вводили стерильный буферный раствор. Забор селезенки и периферической крови проводился на 7, 14, 21 и 28 сутки после однократного введения препарата. Выделенную селезенку гомогенизировали при 4 °С. Анализ проводили на цитофлюориметре FACS Canto II. Гейтирование популяции лимфоцитов проводилось по маркеру CD45. Определение относительного количества NK-лимфоцитов проводили по графику CD45 PerCP/SSC путем выделения лимфоцитарного гейта CD3e-NK1.1+. Определение субпопуляции Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток – по графикам

ку FSC/SSC путем выделения лимфоцитарного гейта CD3e+CD4+ и CD3e+CD8+ соответственно, субпопуляции Т-хелперов 1 типа – по графику FSC/SSC путем выделения лимфоцитарного гейта CD3e+CD4+CD195+. Оценку содержания интерферона гамма в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (Cusabio CSB-E04578m).

В ходе исследования показано, что введение вакцины экспериментальным животным индуцирует статистически значимое нарастание пула NK-клеток в селезенке к 14 суткам после однократного введения препарата как относительно исходного значения, так и относительно группы контроля. Затем к конечной фазе исследования (28 суток) происходило колебание данного показателя в пределах диапазона статистической значимости. Увеличение относительного содержания цитотоксических Т-клеток наблюдалось с 14 суток наблюдения до конечной фазы исследования, достигая максимума на 28 сутки. Относительное содержание Т-хелперов в опытной группе достигало уровня выше аналогичного показателя группы контроля на 14 сутки и оставалось на уровне, незначительно превышающем контроль в течение всего срока исследования.

Субпопуляция Т-хелперов 1 типа, напротив, показала устойчивый статистически значимый рост с выраженной динамикой кратного нарастания до конца срока исследований.

Полученные данные динамики изменения соотношений между отдельными пулами иммунокомпетентных клеток селезенки коррелируют с данными по динамике интерферона гамма в плазме экспериментальных животных, что свидетельствует о выраженности ответа клеточного звена иммунитета.

Таким образом, исследуемая терапевтическая вакцина после однократного внутримышечного введения мышам-самцам обуславливает увеличение уровня интерферона гамма и числа иммунокомпетентных клеток, что свидетельствует о способности препарата стимулировать клеточное звено иммунитета.

#### **МИКРОБИОЦЕНОЗНАЯ ЗАЩИТА БИОТОПА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ РЕГУЛЯЦИИ АНТИИНФЕКЦИОННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА СЛИЗИСТЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ ЛЕКТИНАМИ**

Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С.

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

**Введение:** Конструирование про/ синбиотиков – стратегическое направление исследований. Одним из приоритетных составляющих синбиотиков являются пробиотические лектиновые системы (ПЛС), например, лектины пробиотических бактерий (ЛПБ). ПЛС относятся к распознающим гликоконъюгатные системы (ГКС) белковым эффекторам и их комплексам, проявляют полезные для организма свойства. Среди распознающих защитных систем (РЗС) в биотопах организма выделяется дежурная система компонента человека (СКЧ), включающая ПЛС (набор рецепторных и растворимых лектинов). Организационно-функциональные принципы СКЧ используются в других РЗС организма.

**Цель:** На основании анализа результатов проведенных исследований и разработок предложить концепцию

дежурных микробиоценозных молекулярно-клеточных РЗС биотопа, вовлекающих ПЛС и ПЛС-ГКС синбиотического компартмента биотопа в регуляцию микроорганизмов условно-патогенного компартмента биотопа.

**Основные составляющие, обосновывающие концепцию:** Широкое распространение лектинов и их комплексов в РЗС организма. Примеры: цитокины, дефенсины, система свертывания крови, СКЧ, система «Белковые гормоны – Рецепторы», ЛПБ (ПЛС, их сетевая организация, прямые и обратные обратимые взаимоотношения с ГКС), фитолектины со свойствами ПЛС. Роль биотопного пробиотического компартмента слизистых в РЗС. Лидерные во взаимоотношениях с окружающими микробами виды и штаммы пробиотических микроорганизмов (бифидобактерий и лактобацилл) – источники поверхностно-клеточных и внеклеточных ЛПБ/ ПЛС, распознающих ГКС и антигены муцинового типа. Имеет место антимикробный синергизм между ЛПБ/ ПЛС/ ГКС, ЛПБ и ГКС, ЛПБ и антибиотиками. Потенциально патогенный компартмент биотопа. Выбор (в качестве модельных) дрожжеподобных грибов (кандид) – эукариотических (как и клетки хозяина) условных патогенов, участвующих во взаимоотношениях с хозяином и бактериями. Выбор сенсорного узла сцепленного микробиоценоза биотопа – системы «Лактобациллы – Кандиды». Противостояние пробиотического и потенциально патогенного компартментов. Адресные (прямые и обратные) связи компартментов на уровне взаимодействий «Лидерные штаммы одного компартмента – Популяции штаммов другого компартмента». Биопленкообразование смешанными культурами как один из регуляторов диагностико-прогностических событий усиления/ ослабления здорового статуса биотопа. Противостояние компартментов на уровне противоборства коммуникационных сообществ/ коммуникационных тел, характеризующегося обменом надклеточными сигналами, в условиях пролонгирования коммуникаций при стрессе. ЛПБ как новый класс деградантов биопленок дрожжеподобных грибов. Микробиоценозы РЗС в биотопах слизистых. Совместимость с внутриволокнистыми слизистыми муцин/ маннан/ (другие полимерные ГК, имитирующие муцины)-распознающих ПЛС. Участие таких ПЛС (например ЛПБ) в сборке и организации пористых внеклеточных полимерных матриц – штамм/ вид/ род-зависимых. Молекулярно-клеточные дежурные микробиоценозные РЗС в реализации сетевых макрофункций биотопа. ЛПБ как метаболомбиотика - агенты влияния на сетевые узлы метаболома в предсказуемых направлениях развития событий. Кофункционалирование РЗС в биотопе. Участие ПЛС и ПЛС-ГКС в регуляции чувства кворума в микробиоценозах (роль авторегуляторной системы «Популяции пробиотических бактерий – ЛПБ») и кросс-токкина с СКЧ и другими РЗС в биотопе.

**Заключение:** Концепция кофункционалирования поверхностноклеточных и внеклеточных ПЛС и ПЛС-ГКС в составе РЗС человека доказывает еще один путь антиинфекционной резистентности, коррекции, стабилизации и усиления здорового статуса биотопов внутриволокнистых слизистых. Концепция обладает прогностико-диагностическим потенциалом, позволяет контролировать, локализовать и акцентировать адресные взаимодействия противоборствующих лидерных штаммов и сцепленных популяций микробов, коммуникационных сообществ. Она открывает новые перспективы синергистической борьбы с патогенами.

## СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МОНОЦИТОВ КРОВИ И КЛЕТОК МОНОЦИТОПОДОБНОЙ ЛИНИИ К ПРОДУКТАМ РАЗРУШЕНИЯ СТРЕПТОКОККОВ

Лебедева А.М., Старикова Э.А., Бурова Л.А.,  
Фрейдлин И.С.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** При инвазивной стрептококковой инфекции в крови накапливаются как продукты, секретлируемые живыми бактериями, так и продукты их деградации. Лейкоциты крови становятся мишенями для этих факторов. В качестве модели моноцитов широко используют перевиваемую линию моноцитоподобных клеток ТНР-1. Однако клетки ТНР-1 имеют ряд функциональных особенностей. **Цель данного исследования** состояла в сравнении чувствительности моноцитов крови человека и клеток перевиваемой линии ТНР-1 к продуктам деградации *S. pyogenes*.

**Материалы и методы.** Мононуклеарные лейкоциты выделяли из периферической крови условно здоровых доноров. Супернатант разрушенных ультразвуком стрептококков (СРС) был приготовлен из *Streptococcus pyogenes* серологической группы А (тип М22, штамм AL168). Оценка количества адгезировавших и мигрировавших моноцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител и коммерческих наборов Flow-count Fluogospheres. Оценка достоверности различий между средними значениями проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

**Основные результаты.** В присутствии СРС адгезия клеток линии ТНР-1 к эндотелию усиливалась. СРС также повышал миграцию и трансэндотелиальную миграцию этих клеток. Ингибиторный анализ с токсином коклюша показал, что эффект СРС на эти процессы был обусловлен взаимодействием рецепторов, связанных с G-белками на клетках с хемоаттрактантом в составе СРС. Адгезия моноцитов крови также усиливалась в присутствии СРС. Однако действие СРС на миграцию моноцитов крови было разнонаправленным в зависимости от концентрации СРС и индивидуальной чувствительности клеток доноров к продуктам деградации *S. pyogenes*. Токсин коклюша снижал индуцированную СРС миграцию моноцитов крови до спонтанного уровня. Чувствительность к токсину доказывает, что влияние СРС на миграцию моноцитов было обусловлено хемоаттрактантной активностью СРС. Несмотря на то, что влияние СРС на адгезию и миграцию моноцитов и клеток ТНР-1 было сходным, влияние СРС на трансмиграцию этих клеток различалось: трансмиграция клеток ТНР-1 усиливалась, а трансэндотелиальная миграция моноцитов снижалась. Это можно объяснить тем, что в используемой модели при взаимодействии мононуклеаров крови и эндотелиальных клеток, в присутствии СРС секретрируются факторы, ингибирующие трансмиграцию моноцитов. Кроме того, различная чувствительность к хемоаттрактанту в составе СРС может быть связана с разной экспрессией соответствующих рецепторов на этих клетках.

**Заключение.** Наши исследования выявили существенные различия в характере ответа моноцитов крови и моноцитоподобных клеток ТНР-1 на действие продуктов разрушения стрептококка.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Ли Л.А., Ефименко М.В., Козлов В.К.

Хабаровский филиал ФГБНУ ДНЦ ФПД – НИИ Охраны  
материнства и детства, Хабаровск, Россия

**Введение.** Внебольничные пневмонии (ВП) занимают одно из ведущих мест в структуре бронхолегочной патологии у пациентов детского возраста, хотя и наметилась небольшая тенденция к снижению заболеваемости [МИАЦ МЗ РФ, 2013]. В последнее десятилетие в медицине активно формируются представления о роли нарушений клеточного энергообмена в течение самых разнообразных патологических процессов. Энергообмен, как на уровне целостного организма, так и на уровне отдельной клетки, представляет собой грандиозный комплекс процессов, ключевым звеном которого является митохондрия. Нарушение биоэнергетических функций митохондрий – одно из наиболее ранних проявлений повреждения клеток. Изменился патоморфоз заболевания ВП. Значительно увеличилось число малосимптомных форм, пневмоний затяжного и рецидивирующего течения. Это свидетельствует о необходимости дальнейшего поиска и расшифровки молекулярных механизмов реализации локального и системного воспаления при ВП.

**Цель.** Исследовать энергообеспеченность лимфоцитов периферической крови у детей с ВП.

**Материал и методы:** Проведено обследование 54 ребенка с внебольничной пневмонией в первые 24 часа. Группу контроля составили 30 практически здоровых детей. Средний возраст детей составил 6,6 лет. Одним из современных методов оценки цитозенергетического статуса клетки – это диагностика состояния мембранного потенциала митохондрий. Процентное содержание клеток со сниженным потенциалом митохондриальной мембраны ( $\Delta\psi$ ) в общей популяции лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной лазерной цитометрии (BD FACS Calibur, USA) в программе Cell Quest Pro с использованием красителя JC-1 (5,5',6,6'-тетраэтилор-1,1',3,3' тетраэтилбензимидазолкарбоцианин иодид/хлорид) (Vector Dickenson, USA). Применении красителя JC-1 – наиболее распространенный способ регистрации локальных изменений трансмембранного электрохимического потенциала и визуализации митохондрий с низким и высоким потенциалом мембраны, так как спектральные свойства красителя в митохондриях зависят от структурно-функциональной целостности митохондриального аппарата и определяются трансмембранным электрохимическим потенциалом. JC-1 является катионным красителем, поглощение которого митохондриями напрямую связано с величиной митохондриального мембранного потенциала.

Цитохимическое определение активности окислительно-восстановительных ферментов сукцинатдегидрогеназы (СДГ),  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы ( $\alpha$ -ГФДГ) в лимфоцитах периферической крови осуществляли с помощью количественного метода, основанного на восстановлении тетразолиевого красителя с образованием окрашенных гранул формазана.

**Основные результаты.** При оценке уровня мембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\psi$ ) выявлено достовер-

ное увеличение содержания лимфоцитов со сниженным уровнем  $\Delta\psi$  в периферической крови детей с внебольничной пневмонией («ВП» -  $63,5 \pm 2,8\%$  vs. «контроль» -  $28,5 \pm 1,75\%$ ;  $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о нарушении целостности митохондриальной мембраны, в результате чего снижается образование АТФ и формируется клеточный энергодефицит.

Помимо потери  $\Delta\psi$ , данные, свидетельствующие о снижении клеточного энергообеспечения у детей с ВП, были получены при исследовании цитоэнзиматического статуса лимфоцитов периферической крови. В сравнении с группой «контроль» у детей с ВП выявлено в 0,7 раз достоверное снижение уровня активности СДГ и отношения СДГ/ $\alpha$ -ГФДГ, что указывает на несоответствие между энергопотребностью клетки и энергопродукцией в системе митохондриального окислительного фосфорилирования.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют, что в патогенезе внутрибольничной пневмонии у детей важную роль играет нарушение клеточной энергетики, в пользу чего свидетельствуют снижение мембранного потенциала митохондриальных. Вышесказанное указывает на необходимость создания алгоритмов диагностики митохондриальной дисфункции и рационального применения энерготропной терапии при внебольничной пневмонии у детей. Представленные исследования легли в основу разработки патента «Способ диагностики нарушения энергетического метаболизма лимфоцитов при внебольничной пневмонии у детей» (регистрационный №2014152971 от 25.12.2014).

#### **ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, КОДИРУЮЩИХ ВНУТРЕННИЕ БЕЛКИ ВИРУСА ГРИППА А, НА ГУМОРАЛЬНЫЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ**

Лосев И.В., Петухова Г.Д., Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова С.А.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Известно, что аттенуация вирусов гриппа, происходящая в результате появления различных мутаций в его внутренних генах, может приводить к снижению интенсивности иммунного ответа на эти вирусы. **Целью данной работы** было изучение влияния мутаций, ответственных за степень аттенуации вирусов гриппа, на формирование и интенсивность развития иммунного ответа при вакцинации линейных мышей авторским набором мутантных штаммов вируса гриппа А (H2N2), с различными комбинациями мутаций, связанных с его аттенуацией.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на мышах линии СВА, интраназально инфицированных исследуемыми вирусами в дозе  $5,5 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub> / 20 мкл. Титры антител в сыворотках крови иммунизированных животных определяли методами реакции торможения геммагглютинации и иммуоферментного анализа. Для выявления специфических к вирусу Т-клеток использовали проточную цитометрию (метод внутриклеточного окрашивания цитокинов).

**Результаты.** Было изучено 9 мутантных штаммов, содержащих во внутренних генах по одной точечные мутации отличающие донор аттенуации от патогенного родителя (PB1-K265N, PB1-V591I, PB2-V478L, PA-L28P, PA-V341L, NP-N492S, M1-I15V, M1-F144L, NS2-M100I),

а также вирус с полным набором мутаций донора аттенуации во внутренних генах (Len/17 са) и его «дикий» предшественник без мутаций (Len/134 wt). Было показано, что присутствие во внутренних генах «дикого» вируса некоторых единичных мутаций, характерных для донора аттенуации, в частности PB1-K265N и NP-N492S, может приводить к снижению первичного гуморального иммунного ответа, и в первую очередь это касается продукции высокоспецифичных IgG антител. При вторичном иммунном ответе не было выявлено существенных различий в продукции сывороточных антител. Исследование продукции локальных IgA в смывах верхних дыхательных путей мышей показало отставание аттенуированного вируса Len/17 са от «дикого» предшественника в стимуляции этих антител как при первичном, так и при вторичном иммунном ответе, несмотря на его высокий уровень репродукции в носовых ходах. Похожая картина наблюдалась у вируса с мутацией PB1-K265N. Введение остальных мутантных штаммов приводило к выработке секреторных IgA ближе к показателям «дикого» Len/134 wt. Мутации в М-гене приводили к более интенсивной продукции антител, чем на аттенуированный вирус Len/17 са. При этом штамм с мутацией M1-I15V, снижавшей репродукцию вируса в легких, стимулировал IgA так же хорошо, как и Len/134 wt. Введение всех вирусов приводило к достоверному увеличению уровней CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток как в НАЛТ, так и в селезенке по отношению к контрольной (не иммунизированной) группе мышей. Вирусы с мутациями в M1, NP и NS2 генах стимулировали формирование как локальных (НАЛТ), так и системных (селезенка) Т-лимфоцитов в 2-3 раза активнее, чем Len/134 wt. Эти вирусы можно также объединить по способности размножаться в носовых ходах лучше остальных мутантных штаммов. В тоже время Т-клеточный ответ к вирусу с мутацией PB2-V487L, который тоже хорошо репродуцировался в верхних дыхательных путях, был ближе к аттенуированному Len/17 са.

Обобщая представленные данные, можно отметить, что взаимосвязь между свойствами донора аттенуации и мутациями, придающими ему эти свойства, является сложным, комплексным процессом. Повышение иммунных свойств аттенуированных штаммов при сохранении их авирулентности может быть достигнуто путем изучения комбинаций наиболее многообещающих в этом отношении мутаций. По результатам данного исследования к таким мутациям можно отнести, в первую очередь мутации в гене M1, и в несколько меньшей степени NS2 и NP.

Работа поддержана грантом РФФИ № №14-04-32250.

#### **ВИРУСНАЯ НАГРУЗКА И УРОВЕНЬ ТХ1-ЦИТОКИНОВ ПРИ МИАЛГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ**

Малашенкова И.К.<sup>1</sup>, Крынский С.А.<sup>1</sup>, Огурцов Д.П.<sup>2</sup>, Добровольская Е.И.<sup>2</sup>, Гурская О.Г.<sup>2</sup>, Жарова М.А.<sup>2</sup>, Зуйков И.А.<sup>2</sup>, Дидковский Н.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия

<sup>2</sup> НИИ физико-химической медицины, Москва, Россия

Миалгический энцефаломиелит (МЭ) характеризуется повышенной частотой герпесвирусной инфекции и повышенной репликацией герпесвирусов, а также изменениями Th1-иммунного ответа. Обследованы 62 больных МЭ (34 муж., 28 жен., средний возраст  $34 \pm 5$  лет) и 42 здоровых добровольца в качестве контрольной груп-

пы (14 муж., 28 жен., средний возраст  $32,3 \pm 4,7$  лет). Изучалась вирусная нагрузка в слюне методом количественной ПЦР (вирус Эпштейна-Барр, герпесвирус человека 6 типа, герпесвирус человека 7 типа) и уровень цитокинов в сыворотке методом ИФА (IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-15). Применяли t-критерий Стьюдента и коэффициент корреляции Пирсона  $r$ ; различия между группами считали достоверными при  $p < 0.05$ . По результатам исследования, пациенты с МЭ имели более низкий уровень IFN $\alpha$  ( $p = 0.003$ ), TNF $\alpha$  ( $p = 0.0003$ ), IL-15 ( $p = 0.02$ ). У них также отмечалась тенденция к более низкому уровню IFN $\gamma$  ( $p = 0.053$ ). Кроме того, в группе пациентов с МЭ была отрицательная корреляция между IFN $\gamma$  и уровнем EBV ( $r = -0.35$ ), между IL-2 и уровнем EBV ( $r = -0.44$ ), между IL-15 и уровнем EBV ( $r = -0.59$ ). В контрольной группе корреляции EBV с уровнем цитокинов не было. В группе больных СХУ мы провели оценку уровня IFN $\gamma$  и IL-2 в зависимости от репликации EBV. Уровень IFN $\gamma$  и IL-2 был достоверно ниже при высокой ( $>104$ /мл) репликации EBV ( $p = 0.006$  и  $p = 0.03$ ). Полученные данные подтверждают нарушение Th1-ответа на герпесвирусную инфекцию при МЭ и демонстрируют возможность неинвазивной оценки репликации герпесвирусов у пациентов с МЭ.

#### ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Миргородская Н.В., Попов А.Ф.

ГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия

В последние годы наметилась четкая тенденция активизации энтеровирусной инфекции (ЭВИ) в мире, о чем свидетельствуют постоянно регистрируемые в разных странах эпидемиологические подъемы заболеваемости и вспышки. Среди медицинских аспектов исследования ЭВИ определяющая роль отводится дальнейшему изучению патогенеза заболевания и совершенствованию лечебных мероприятий. В клинике инфекционных болезней стали широко исследовать цитокины, которые являются важным регулятором иммунного ответа клеточного типа.

**Целью работы** было определение цитокинового статуса сыворотки крови у больных ЭВИ.

Нами было проведено количественное определение концентрации цитокинов в плазме крови с помощью иммуноферментного метода с использованием набора реагентов «Вектор-бест» (г. Новосибирск). Исследовались следующие цитокины: провоспалительные —  $\gamma$ -интерферон (IFN- $\gamma$ ) и фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); противовоспалительные — трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1), интерлейкин-4 (IL-4).

Группа испытуемых была набрана из числа больных, проходивших лечение на базе инфекционного отделения Краевой клинической больницы №2, с подтвержденным, методом полимеразной цепной реакции, диагнозом ЭВИ (100 человек). Группу сравнения составили 20 здоровых добровольцев сопоставимых по возрасту и полу.

Уровни провоспалительных цитокинов различались у пациентов с серозным вирусным менингитом (СВМ) и больных другими формами ЭВИ (малая болезнь, герпангина, экзантема и др.). При более тяжелом течении заболевания (СВМ) отмечалось повышение показателей провоспалительных цитокинов в два раза (TGF- $\beta$ 1  $51,2 \pm 1,3$  пг/мл, IL-4  $8,4 \pm 0,4$  пг/мл). В период реконва-

лесценции (10-14 сутки заболевания) показатели приходили к норме (TGF- $\beta$ 1  $24,6 \pm 1,3$  пг/мл, IL-4  $5,7 \pm 0,3$  пг/мл). В острый период болезни и реконвалесценции у пациентов без менингита показатели этих цитокинов не отличались от нормы (TGF- $\beta$ 1  $19,7 \pm 0,9$  пг/мл, при норме  $21,5 \pm 1,1$  пг/мл; IL-4  $5,1 \pm 0,6$  пг/мл, при норме  $4,4 \pm 0,7$  пг/мл).

Количественное содержание в крови пациентов провоспалительных цитокинов не зависело от степени тяжести процесса и превышало условную норму в разгар болезни (IFN- $\gamma$   $171,1 \pm 3,8$  пг/мл, при норме  $15,7 \pm 1,3$  пг/мл; TNF- $\alpha$   $11,36 \pm 1,2$  пг/мл, при норме  $2,84 \pm 0,6$  пг/мл). На 10-14 сутки болезни показатель TNF- $\alpha$  снижался до нормы ( $3,6 \pm 1,2$  пг/мл), в то время как значение IFN- $\gamma$  оставалось повышенным ( $49,4 \pm 2,3$  пг/мл).

Таким образом, установлено, что особенности патологического процесса в остром периоде ЭВИ оказывают влияние на цитокиновые параметры иммунитета.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЕННОСТЕЙ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ, ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ БОЛЬНЫХ ОСТРОЙ ДИЗЕНТЕРИЕЙ, ИМЕВШИХ КОЛОНИЗАЦИЮ КИШЕЧНИКА ГРИБАМИ ASPERGILLUS FLAVUS

Митин Ю.А., Пастушенков В.Л., Углина О.А.

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

**Введение.** Заболевания, в патогенезе которых существенную роль играют изменения иммунной системы, обусловленные микотической инфекцией, в настоящее время представляют серьезную проблему здравоохранения. Научные исследования показали разнообразие антигенного воздействия, обусловленное широким спектром грибковых антигенов. Так, например, у грибов рода *Aspergillus flavus* (Af), было выявлено более 300 антигенных компонентов, среди которых наиболее значимыми являются антигены мицелия. В иммунной системе под действием антигенов грибов рода *Aspergillus flavus* могут развиваться различные патологические процессы, в том числе аллергические реакции как I типа, обусловленные Ig E механизмами, так и не Ig E патология, например такие как экзогенный аллергический альвеолит. В то же время недостаточно научных исследований, в которых были бы освещены вопросы особенностей клинического течения, изменений иммунной системы под влиянием нескольких патологических процессов, в том числе влияние колонизации грибами рода *Aspergillus flavus* на течение заболевания и изменения иммунной системы у больных острой дизентерией. Именно поэтому было проведено данное исследование.

**Цель и задачи исследования.** Оценка особенностей клинического течения, состава микрофлоры кишечника, изменений иммунной системы у детей больных острой дизентерией средней степени тяжести, имевших колонизацию кишечника грибами *Aspergillus flavus*.

**Материалы и методы.** Обследовано 212 детей (возрастной группы 7-14 лет) больных острой дизентерией средней степени тяжести, вызванной преимущественно *S. flexneri* (серовар 2a). Этиологический диагноз дизентерии устанавливался на основании клинико-эпидемиологических и лабораторных данных, включавших бактериологические и серологические исследования, посев кала с определением состава микрофлоры. Иммунологиче-

скими методами исследований определяли абсолютное и относительное содержание Т- и В-лимфоцитов, уровень циркулирующих иммунных комплексов, иммуноглобулинов (А, М, G классов) сыворотки крови, С3 и С4 компонентов комплемента.

**Основные результаты.** Анализ клинического течения острой дизентерии средней степени тяжести у обследованных выявил, что у пациентов без колонизации кишечника грибами *Aspergillus flavus*, заболевание в 93% случаях протекало по типичному колитическому варианту, в то же время у детей, имевших колонизацию кишечника грибами *Aspergillus flavus*, колитический вариант встречался в 32% случаев, а в 68% случаев (т.е. более чем в 9 раз чаще) наблюдался гастроэнтероколитический вариант течения заболевания, замедлялась инволюция симптомов интоксикации, нормализации частоты и характера стула. В результате проведенных лабораторных исследований установлено, что у больных острой дизентерией с колонизацией грибами *Aspergillus flavus* на фоне снижения содержания нормальной микрофлоры кишечника (бифидо- и лактобактерий, бактероидов) и возрастания количества условно-патогенных микроорганизмов (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*) достоверно снижается соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов, уменьшается содержание CD20+ лимфоцитов и концентрация в сыворотке крови С3 компонента комплемента, возрастает уровень ЦИК. Достоверных изменений относительного и абсолютного содержания в периферической крови CD4+ и CD8+ субпопуляций лимфоцитов, иммуноглобулинов классов А, М, G, а также С4 компонента комплемента в сыворотке крови выявлено не было.

**Заключение.** К особенностям клинического течения, изменений состава микрофлоры у детей больных острой дизентерией средней степени тяжести, имевших колонизацию кишечника грибами *Aspergillus flavus* относятся: большая продолжительность острого периода заболевания, более частая реализация гастроэнтероколитического варианта течения заболевания, нарушения состава нормальной микрофлоры кишечника (снижение уровня бифидо- и лактобактерий, бактероидов), возрастание количества условно-патогенных микроорганизмов (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*). Установлены особенности изменений иммунной системы таких лиц: достоверное снижение соотношения CD4+/CD8+ лимфоцитов, уменьшение содержания CD20+ лимфоцитов и концентрации в сыворотке крови С3 компонента комплемента, возрастание уровня циркулирующих иммунных комплексов.

### ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ МЕЧЕНОГО (Н<sup>3</sup>) ФУЛЛЕРЕНА НА ИНТАКТНУЮ И ИНФИЦИРОВАННУЮ ВИРУСОМ ГЕРПЕСА ПРОСТОГО КЛЕТКУ

Носик Н.Н.<sup>1</sup>, Прокудина Е.Н.<sup>1</sup>, Кондрашина Н.Г.<sup>1</sup>,  
Раснецов Л.Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ  
«ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,  
Москва, Россия

<sup>2</sup> ЗАО «Интелфарм», Нижний Новгород, Россия

Среди вирусных инфекций герпес занимает одно из ведущих мест в силу повсеместного распространения вирусов, многообразия клинических проявлений, как правило, хронического течения, а также различных путей передачи вирусов.

Он входит в число наиболее распространенных и плохо контролируемых инфекций человека. Герпес-вирусы могут циркулировать в организме с нормальной иммунной системой бессимптомно, но у людей с иммуносупрессией вызывают тяжелые заболевания со смертельным исходом. Существующие противогерпетические средства не позволяют достичь полного излечения, более того, при длительном применении развивается резистентность. Поэтому идет непрерывный поиск новых эффективных противогерпетических средств. Ранее нами было показано, что фуллеренополигидроаминокапроновая кислота защищает клетки от цитодеструктивного действия вируса герпеса. В настоящем исследовании исследовалось взаимодействие данного соединения с интактными и инфицированными вирусом герпеса простого (ВПГ) клетками.

**Материалы и методы.** Использовали перевиваемую культуру клеток почки обезьян (Vero) и ВПГ, тип 1, штамм Л2. В работе использовали препарат фуллерена, меченый по тритию- суммарная активность 2мКи, молярная активность 600мКи/ммоль. Концентрация 1мКи/мл. К неинфицированным и инфицированным ВПГ клеткам добавляли 3Н фуллерен. Через 1-2 часа брали пробы, в которых определили общую и кислоторастворимую радиоактивность.

**Результаты.** В клетках Vero, инфицированных ВПГ с множественностью 0,2 ТЦИД<sub>50</sub>/кл отмечалось достоверное увеличение сорбции меченого препарата по сравнению с сорбцией на интактных клетках. Наблюдалась динамика увеличения радиоактивности в инфицированных клетках. При этом обработка препаратом интактных клеток не меняла их способности сорбировать меченый материал.

**Заключение.** Тот факт, что данная динамика наблюдалась при различных схемах проведения экспериментов (внесение вируса до обработки клеток препаратом или после заражения на разных сроках, когда защитный эффект препарата незначительный) говорит в пользу изменения клеточной мембраны инфицированных вирусом герпеса клеток.

### ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ НАРУЖНЫХ МЕМБРАН ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Омельченко Н.Д., Мишанькин Б.Н., Иванова  
И.А., Дуванова О.В., Романова Л.В., Шипко Е.С.,  
Филиппенко А.В., Галичева А.Л., Беспалова И.А.,  
Дорошенко Е.П.

ФКУЗ научно-исследовательский противочумный  
институт, Ростов-на-Дону, Россия

**Введение.** В настоящее время активно изучаются протективные и иммуногенные свойства антигенов холерного вибриона с целью усовершенствования химических противохолерных вакцин. Известно, что при холере важное значение имеет как антибактериальный иммунитет, так и антитоксический, причем показано преобладающее значение первого (Holmgren J., Cierkinsky S., 1992). Учитывая, что протективные антигены, ответственные за формирование антибактериального иммунитета, локализованы, главным образом, в наружных мембранах (НМ) возбудителя (Марков Е.Ю. и др., 1998; 2004), можно объяснить интерес исследователей к этим структурам микробных клеток.

**Цель и задачи исследования.** Изучение влияния препарата наружных мембран холерного вибриона на течение генерализованной инфекции у белых мышей.

**Материалы и методы.** Для получения препарата наружных мембран клетки 18-часовых агаровых (агар Мартена, рН 7,6) культур штамма *Vibrio cholerae* Eltor 18950 (OmpT+, ctx-, tcr-, OmpU-, OmpW-) после смыва физиологическим раствором с 0,01% мертиолатом и 1,5-часовой инкубации при комнатной температуре осаждали центрифугированием на холоду при 6000 об/мин. и разрушали с помощью УЗ-дезинтегратора модели Bandelin SONOPULS HD 3200 или механическим растиранием с песком. Лизаты центрифугировали при 105000g 1 час при 4°C. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок солибилизировали с помощью физиологического раствора с 1 % тритона X-100 (Serva) при комнатной температуре в течение ночи с последующим концентрированием в 2 - 4 раза ультрафильтрацией в системе Amicon (камера 10 RA, мембрана PM 30). Полученным препаратом двукратно иммунизировали внутрибрюшинно и подкожно 2 группы белых мышей в дозах 2,5, 5, 10 и 20 мкг. Через 21 день иммунизированных (опытных) животных заражали внутрибрюшинно агаризованной вирулентной культурой *V. cholerae* 569B в дозе 100 LD50. Для этого агар Нобля (Difco) растворяли в дистиллированной воде, кипятили в течение 30 минут на водяной бане при постоянном помешивании и после охлаждения до 45 °C соединяли со взвесью культуры *V. cholerae* 569 B, выращенной при температуре 37° C в течение 18 часов, в соотношении 1:1 до конечной концентрации агара 0,2 %. Гибель 100% контрольных (интактных) мышей в течение суток подтверждала наличие генерализованной инфекции. Срок наблюдения за опытными животными составлял 3 суток после заражения.

**Основные результаты.** Установлено, что степень иммуногенности зависит от способа аппликации и дозы вводимого антигена. Выявлено, что после внутрибрюшинной иммунизации дозой 2,5 мкг выживало 30% животных, при иммунизирующей дозе 5 мкг – 60%, 10 и 20 мкг – 80% белых мышей. Подкожная иммунизация оказалась менее эффективной: защитным действием обладали высокие иммунизирующие дозы (10 и 20 мкг), обеспечивая выживаемость 65% и 75% животных, соответственно. Иммунизирующие дозы 2,5 и 5 мкг предотвратили развитие генерализованной холерной инфекции у 25% белых мышей.

**Заключение.** Препарат наружных мембран, выделенный из культур атоксигенного штамма *V. cholerae* 18950, препятствовал развитию экспериментальной холеры у белых мышей, зараженных вирулентным штаммом возбудителя. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования наружных мембран для совершенствования специфической профилактики этого заболевания.

## СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IN VIVO И IN VITRO ПРИ ЛЕПТОСПИРОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Петрова О.А., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Тотолян А.А.

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Лептоспирозы – зооантропонозная инфекция, протекающая в виде острого лихорадочного заболевания, характеризующаяся признаками капилляротоксикоза, выраженной интоксикацией, поражением почек, печени, центральной нервной системы, развитием геморрагического синдрома.

Патогенез лептоспирозов сложен и на данный момент мало изучен. Лептоспиры обладают множеством механизмов, которые позволяют им уклоняться от иммунной системы хозяина и вызывать тяжелые формы инфекции, а в том числе с летальным исходом.

**Цели и задачи.** Изучение продукции про- и противовоспалительных цитокинов *in vivo* и *in vitro*.

**Материалы и методы.** *In vivo*. Было обследовано 50 пациентов больных лептоспирозом с подтвержденным диагнозом. От данных пациентов было получено 86 сывороток. В сыворотках определяли уровень цитокинов.

*In vitro*. Для эксперимента был взят штамм из коллекции лаборатории зооантропонозных инфекций НИИ Пастера - *Leptospira interrogans*. Возбудитель был выделен от больного в 2013г, мужчина умер от лептоспирозной инфекции. Данным штаммом (живым и инактивированным нагреванием) проводилась 24 часовая стимуляция цельной крови здорового донора. Через 1 час, 2 часа, 4, 6, 12, 24 часа отбирались супернатанты. Определение цитокинов в биоматериалах (сыворотки и супернатанты) проводилось на анализаторе “MagPix” (“Millipore”, США), основанном на технологии xMAP компании Lumindex (США) с использованием стандартной панели из 9 аналитов: TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1Ra, IL-12(p70), IFN- $\gamma$ .

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ MS Excel, Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Для описания полученных результатов использовали стандартные методы непараметрической статистики.

**Основные результаты.** При изучении цитокинов *in vivo* в группе больных лептоспирозом по сравнению с контрольной группой выявлены достоверно повышенные уровни IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ).

В части *in vitro* была подобрана оптимальная концентрация *Leptospira interrogans* для стимуляции цельной крови человека -  $1 \times 10^6$  лептоспир/мл. Было показано, что живые лептоспиры достоверно являются более сильными стимуляторами продукции цитокинов, чем те же лептоспиры инактивированные нагреванием. Впервые были получены данные о почасовой стимуляции цельной крови здорового донора живыми и инактивированными лептоспирами. Было показано, что пик стимуляции для большинства цитокинов приходится на 2-3 час стимуляции (IFN- $\gamma$ , IL-12p(70), IL-1Ra, IL-4 (причем для двух последних цитокинов после достижения пика, продукция цитокинов выходит на плато) Непохожую на остальные цитокины динамику дали IL-8 и TNF- $\alpha$ , которые имеют более поздний, чем другие цитокины пики стимуляции приходящиеся на 6ч.

**Заключение.** В ходе нашего исследования было показано, что уровень цитокинов IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- $\alpha$  при лептоспирозной инфекции достоверно выше, чем у контрольной группы. Эти данные также были подтверждены в ходе эксперимента *in vitro*. Необходимо проводить новые, обширные исследования о взаимодействии цитокинов и механизмах иммунопатогенеза лептоспирозов.

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Рицук С.В., Дробченко С.Н.

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Существует мнение, что проблема диагностики хламидийной инфекции решена с внедрением и совершен-

ствованием молекулярно-генетических методов (ПЦР). В подтверждение этому разработанные рекомендации Российского общества дерматовенерологов и косметологов и Восточно-Европейской Ассоциацией по Сексуальному и Репродуктивному Здоровью предлагают диагностировать хламидийную инфекцию исключительно с применением метода ПЦР и игнорируют серодиагностику. Несмотря на растущую популярность метода ПЦР у врачей, его внедрение в практику показало возможность ложноотрицательных результатов из-за отсутствия возбудителя в первичных половых путях при хронизации инфекции и, в связи с этим, снижение вероятности его попадания в пробы для ПЦР. В 2013 году вышли новые рекомендации ВОЗ «Лабораторная диагностика передающихся половым путем инфекций, в том числе вирус иммунодефицита человека». В них указано, что использовать серологические методы необходимо в диагностике и/или скрининге осложненной хронической хламидийной (*S. trachomatis*) инфекции, неонатальной пневмонии и LGV инфекций, а также в эпидемиологических исследованиях. В настоящее время серологический анализ на антитела к *S. trachomatis* рекомендован в рутинное обследование бесплодных пар в Швеции и Нидерландах. Серологический скрининг групп молодых людей рекомендуется также в ряде других стран, включая США, Англию, Канаду и Японию.

**Целью данной работы** явилось определение информативности прямых и косвенных методов выявления хламидийной инфекции и их сопоставление с клиническими проблемами.

**Методы:** Обследовано 457 женщин и 752 мужчин, в составе которых были 353 пары, с различными нарушениями в репродуктивной системе. ДНК *S. trachomatis* определяли в соскобе из уретры у мужчин, а также из цервикального канала и уретры у женщин методом real-time ПЦР («АмплиСенс» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Для исследования иммунного ответа использовались бесприборные иммуноферментные тест-системы ИммуноКомб, производства Organics Ltd., Израиль: ImmunoComb Chlamydia trachomatis Monovalent IgA для выявления видоспецифичных сывороточных и секреторных IgA антител к *S. trachomatis* и ImmunoComb Chlamydia Bivalent IgG для одновременного дифференцированного определения видоспецифичных IgG антител к *S. trachomatis* и *S. pneumoniae*. На твердую фазу этих тест-систем (гребень) сорбированы антигены *S. trachomatis* штамма серотипа L2, с последующим удалением липополисахарида (LPS), вызывающего перекрестные взаимодействия с родоспецифичными антителами, что позволяет определять исключительно видоспецифические IgA и IgG к *S. trachomatis*. Использование фосфатазно-щелочного конъюгата позволяет достичь более высокой чувствительности по сравнению с тестами, основанными на пероксидазной реакции. В тест-системах ИФА российских производителей используется пероксидазная реакция и общие неочищенные антигены хламидий.

**Результаты и обсуждение:** У большей части обследованных выявлялись IgG и IgA к *S. trachomatis* вместе или по отдельности, у 217 мужчин (40%) и у 79 женщин (30%) отсутствовали обе разновидности иммуноглобулинов (IgG и IgA). У мужчин совместно или по отдельности специфические IgG к *S. trachomatis* в сыворотке крови были выявлены у 313 (42%), специфические IgA — у 319 (42,4%). При этом IgG к *S. pneumoniae* были обнаружены у 544 (72,3%), из которых у 280 (51,5%) — без IgG к *S.*

*trachomatis*. У женщин специфические IgG в сыворотке крови были выявлены у 227 (49,7%), специфические IgA — у 201(44,0%). При этом IgG к *S. pneumoniae* были обнаружены у 263 (57,5%), из которых у 101(38,4%) они определялись без IgG к *S. trachomatis*. При этом обнаружение возбудителя в real-time PCR у данного контингента больных имело место у женщин — в 3,7% случаев, у мужчин — в 4,4%. Диагноз хронической урогенитальной хламидийной инфекции был подтвержден у 42% мужчин и 44% женщин (на основании положительного серологического IgA-теста независимо от результата по IgG (чаще было сочетание с положительным тестом) и положительной ПЦР. Представленное сочетание лабораторных тестов регламентировано международными Рекомендациями. При этом получены достоверные корреляции положительных серологических тестов с тяжестью клинических проявлений и осложнениями у женщин и мужчин. Положительная real-time ПЦР не коррелировала ни с одной клинической ситуацией. Выявляемость хламидийной инфекции согласно отечественным рекомендациям (только с применением ПЦР) была на уровне 3,7% — у женщин и 4,4% — у мужчин, что соответственно в 12 и в 10 раз была ниже уровней, полученным согласно международным оценкам.

В последние годы опубликовано достаточно большое количество работ, доказывающих связь хламидийной инфекции с выкидышами и фертильностью пар на основании определения антител к *S. trachomatis*. При этом ДНК патогена в ПЦР у них не определялась. Абсолютизация метода ПЦР нередко приводит к значительной недооценке хламидийной инфекции при подготовке семейных пар к естественному и искусственному зачатиям, что, в свою очередь, в последующем является причиной частых осложнений со стороны матери и плода.

**Выводы:** При хронизации хламидийной инфекции попытка обнаружения возбудителя в ПЦР недостаточна для оценки его этиологической роли в той или иной клинической ситуации. Сочетанное определение специфических противохламидийных антител в биоматериалах на тест-системах с использованием фосфатазно-щелочного конъюгата и антигенов *S. trachomatis*, очищенных от родоспецифического липополисахарида, приобретает первостепенное значение в установлении диагноза хронической персистирующей хламидийной инфекции. Всё это подтверждает необоснованность отечественных рекомендаций и дееспособность рекомендаций ВОЗ по диагностике урогенитальной хламидийной инфекции.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОКИНОВЫХ ИНДЕКСОВ ПРИ HELICOBACTER PYLORI-АССОЦИИРОВАННОМ ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ

Саранчина Ю.В., Агеева Е.С.

ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», Абакан, Россия

**Введение.** В развитии хронического гастрита ключевую роль играет инфекция *Helicobacter pylori* (HP) (Alakkari A., 2011; Ивашкин В. Т., 2012). Благодаря наличию комплекса факторов патогенности, бактерия с легкостью колонизирует слизистую оболочку желудка, модулируя при этом иммуновоспалительную реакцию. В защите макроорганизма от HP, на ранней стадии инфицирования, основное значение приобретают клеточные адаптивные реакции иммунного ответа, которые активируются посредством экспрессии провоспалительных

цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  (Meyer F., 2000; D'Ellos M.M., 2007). Показателем завершения воспалительного процесса является повышение продукции противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10 и др. Динамика интерлейкинов в ходе воспалительной реакции, вызванной инфекционным агентом, позволяет судить о характере межклеточного взаимодействия, лежащего в основе патологического процесса.

**Целью исследования** является оценка соотношения оппозитных пулов цитокинов при НР-ассоциированном хроническом гастрите.

**Материалы и методы исследования:** Материалом для исследования послужила венозная кровь, полученная у 104 больных с поверхностным хроническим гастритом (ПХГ) и 75 больных с атрофическим хроническим гастритом (АХГ), ассоциированным с НР-инфекцией, а также 64 условно здоровых донора. В работе с обследованными пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые ст. 24 Конституции РФ и Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциацией. Все пациенты были ознакомлены и подписали информированное согласие, подтверждающее их добровольное участие в исследовании. Определение цитокин-продуцирующей способности лейкоцитов проводили методом твердофазного ИФА-анализа (Вектор-Бест, г. Новосибирск). Для оценки достоверности различий выборок использовали критерий Манна-Уитни. Достоверность различий считали значимой при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты исследования.** Цитокиновый индекс IL-1 $\beta$ /IL-10 в группе пациентов с ПХГ не имел статистически значимых различий по сравнению с группой контроля и составил 1,5 (0,3-5,4) и 1,5 (0,5-8,2) соответственно. В группе больных с АХГ наблюдалось повышение данного индекса по сравнению с контролем и достигало 2,8 (0,8-8,8). Индекс IL-1 $\beta$ /IL-4 как в группе больных с ПХГ, так и в группе больных с АХГ был выше по сравнению с группой контроля [17,6 (0-109,6); 8,1 (0,1-154,3) и 2,9 (0-71,2) соответственно]. При этом в группе пациентов с ПХГ соотношение цитокинов IL-1 $\beta$ /IL-4 было выше, чем в группе с АХГ. Значения индекса IL-2/IL-4 при ПХГ и АХГ снижались относительно группы контроля, при этом статистически значимых различий в сравниваемых показателях выявлено не было. Так, в группе больных с ПХГ индекс IL-2/IL-4 составил 2,0 (0,8-7,5), в группе с АХГ - 1,2 (0,6-7,0) и в контроле - 3,1 (1,3-7,7). Цитокиновый индекс IL-2/IL-10 достоверно снижался в группах больных с ПХГ [0,2 (0-1,1)] и АХГ [0,1 (0-0,5)] относительно группы контроля [0,6 (0-0,6)]. Как в группе с ПХГ, так и в группе с АХГ значение индекса IL-8/IL-4 было статистически значимо выше относительно группы контроля и составило 177,4 (34,1 - 406,8); 368,4 (26,6 - 493,3) и 57,7 (3,4-158,9), соответственно. Соотношение IL-8/IL-10 статистически значимо повышалось в группах с ПХГ и АХГ по сравнению с группой здоровых доноров и составило 20,9 (4,7-27,4) ( $p=0,008$ ); 17,9 (11,2-36,3) ( $p=0,001$ ) и 6,3 (0,3-12,6) соответственно.

Полученные результаты показали, что как в группе больных с ПХГ, так и у больных с АХГ наблюдается однонаправленная тенденция в изменении цитокиновых индексов, которая характеризуется повышением индексов IL-1 $\beta$ /IL-10, IL-1 $\beta$ /IL-4, IL-8/IL-4 и IL-8/IL-10. Вероятно, это свидетельствует о преобладании продукции провоспалительных цитокинов над противовоспалительными, что является отражением длительного хронического воспаления. При этом уменьшение индексов IL-2/IL-4

и IL-2/IL-10, может рассматриваться как показатель снижения уровня IL-2 - ключевого фактора, запускающего развитие клеточного пути иммунного ответа Th1-типа. Возможно, выявленные закономерности являются отражением нарушения межклеточной кооперации в реализации специфического иммунного ответа при ПХГ и АХГ, что, вероятно, способствует развитию иммунологической толерантности. Кроме того, несмотря на общую направленность изменения цитокиновых индексов, между ПХГ и АХГ наблюдаются отличия в их значениях. Так, при АХГ было показано повышение индексов IL-1 $\beta$ /IL-10, IL-8/IL-4 и снижение IL-1 $\beta$ /IL-4 IL-2/IL-4, IL-2/IL-10 IL-8/IL-10 по сравнению с ПХГ. Вероятно, данные особенности обусловлены происходящими альтеративно-деструктивными процессами в слизистой оболочке желудка при АХГ.

**Заключение.** Таким образом, при НР-ассоциированном хроническом гастрите наблюдается преобладание провоспалительных цитокинов над противовоспалительными, что является отражением пролонгации воспаления. Кроме того, между поверхностным и атрофическим гастритами в соотношении оппозитных пулов цитокинов есть различия, которые, вероятно, обусловлены различиями в механизмах протекания патологического процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания.

#### РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ОТНОСИТЕЛЬНОГО УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МРНК DR6 В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ

Сахарнов Н.А.<sup>1</sup>, Уткин О.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

**Введение.** Системным проявлением острого течения герпесвирусной инфекции является синдром инфекционного мононуклеоза (ИМ), возбудителями которого являются вирусы ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6. В основе патогенеза ИМ лежит пролиферация и изменение чувствительности к апоптозу инфицированных иммунокомпетентных клеток. Рецептор DR6 на относительно низком уровне экспрессируется клетками иммунной системы, участвует в их активации. Гиперэкспрессия DR6 инициирует каспазо-зависимый путь апоптоза. В литературе отсутствуют данные об особенностях экспрессии DR6 в иммунокомпетентных клетках крови при ИМ.

**Цель работы.** Разработка тест-системы для определения относительного уровня экспрессии мРНК DR6 в периферической крови больных ИМ с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени.

**Материалы и методы.** В качестве материалов исследования использовали по 20 образцов периферической крови больных ИМ и здоровых волонтеров. Экстракцию суммарной нуклеиновой кислоты проводили с использованием набора «Магносорб» (ФГУН ЦНИИЭ, Россия). Для получения кДНК использовали набор для обратной транскрипции (Thermo Scientific, США). ПЦР в реальном времени проводили с использованием TaqF ДНК-полимеразы (0,25 ед./25 мкл), укомплектованной 5x ПЦР буфером (67 мМ Трис-НСl (pH=8,3); 17мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;

2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Твин-20; 0,12 мг/мл БСА; 8% глицерин (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (10 мкМ/25 мкл) (Силекс, Россия) и 10% формамида (0,25 мкл/25 мкл) (Applied Biosystems, США).

**Результаты.** На основе собственных результатов и данных литературы в качестве референтного гена использовался FPGS (folypolyglutamate synthase), характеризующийся стабильной экспрессией в пределах исследуемых образцов. Выбраны специфические праймеры и зонды для детекции мРНК DR6 и мРНК FPGS на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных Gene Bank под регистрационными номерами NM\_014452.3 и NM\_004957 с использованием online-сервиса primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), определены их оптимальные рабочие концентрации. Для проведения реакции обратной транскрипции использовалась смесь обратных праймеров DR6R (5'-CTGTTGAGTTCATGCCTTG-3') (12,5 пкм/10 мкл) и FPGSR (5'-ACCACAGGCTTCCTGATGATG-3') (4 пкм/10 мкл). Реакция ПЦР в реальном времени проводилась в режиме мультиплекс с использованием праймеров DR6 F1 (5'-GCTCCCTTCTCCTGCTTGG-3') (12,5 пкм/25 мкл), DR6 Rс (5'-CGGTGGCACGGTCAACAT-3') (12,5 пкм/25 мкл), FPGS F (5'-atggcctgaagacgggattc-3') (4 пкм/25 мкл), FPGS R2 (5'-ACACAGCTGCCATCCTTGGT-3') (4 пкм/25 мкл) и зондов DR6 Z (5'-Fam-AGGCCTCGAATCTCATTGGCACATACC-TAMRA-3') (5 пкм/25 мкл) и FPGSZ (5'-Rox-cagtctgagctcttcaccagtagtactt-BHQ2-3') (5 пкм/25 мкл). В ходе серии экспериментов подобраны адекватные параметры амплификации: денатурация 94°C -15 мин - 1 цикл, (94°C - 25с, 60°C - 30с, 72°C - 30с) - 50 циклов. Расчет относительного уровня экспрессии мРНК DR6 проводился с помощью программы REST® (relative expression software tool), находящейся в свободном доступе в сети Internet на основе значений пороговых циклов DR6, FPGS и эффективности реакции амплификации. Уровни экспрессии мРНК DR6 рассчитывались относительно уровней экспрессии мРНК FPGS, принимаемых за единицу. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . В результате апробации метода выявлено, что при ИМ относительные уровни экспрессии мРНК DR6 были в 2,6 раза ниже, чем у здоровых волонтеров ( $p < 0,001$ ).

**Заключение.** Разработана и апробирована тест-система для оценки относительного уровня экспрессии мРНК DR6 в периферической крови больных ИМ с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени. Метод планируется оптимизировать для определения уровня экспрессии мРНК DR6 в изолированных субпопуляциях наивных и активированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов у пациентов с ИМ.

#### **ИНДИКАЦИЯ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA ПРИ ПОМОЩИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

Солдатенкова А.В., Калошин А.А., Борисова О.В., Михайлова Н.А., Свиридов В.В.

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Инфекции, вызываемые *Pseudomonas aeruginosa*, признаны острой проблемой в стационарах различного профиля и занимают одно из ведущих мест в структуре различных гнойно-септических заболеваний.

Наиболее значимым фактором патогенности *P. aeruginosa* является продуцируемый вирулентными штаммами возбудителя экзотоксин А (ЭТА), вызывающий как системные, так и местные проявления инфекции. ЭТА способствует диссеминации возбудителя и препятствует репаративным процессам, что существенно утяжеляет течение инфекции.

Дифференциация клинических штаммов *P. aeruginosa* по токсигенности могла бы помочь определить направления эффективной терапии пациентов, с включением специфических иммунобиологических препаратов.

В настоящем исследовании получена панель гибридом-продуцентов моноклональных антител к ЭТА *Pseudomonas aeruginosa*, изучены их специфичность, иммунохимические и токсиннейтрализующие свойства.

Количественная оценка токсигенности штаммов *in vitro* проводилась твердофазным иммуноферментным сэндвич-методом. С целью оптимизации чувствительности и специфичности метода в качестве иммобилизованных и детектирующих (меченых) антител исследованы различные варианты моноклональных и поликлональных антител. Оптимальным оказался вариант с сорбированными на планшете поликлональными антиоксическими антителами и конъюгатом токсиннейтрализующего моноклонального антитела № 33 с пероксидазой хрена.

В качестве дополнительного контроля разработан лабораторный вариант полимеразной цепной реакции, выявляющий нуклеотидную последовательность ЭТА.

Протестированы супернатанты 94 клинических изолятов *P. aeruginosa*, полученных из бактериологических лабораторий ГБУ здравоохранения города Москвы «ГКБ №23 им. «Медсантруд» Департамента здравоохранения города Москвы» и «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы» в период с мая по декабрь 2013 г. Среди 94 клинических изолятов 89 % штаммов содержали нуклеотидную последовательность гена ЭТА по данным ПЦР, тогда как у 11 % искомая последовательность отсутствовала. Результаты совпадали с литературными данными.

С целью количественной оценки содержания ЭТА супернатанты клинических изолятов протестированы в иммуноферментном методе. В качестве отрицательного контроля использован супернатант штамма *E. coli*, а также супернатанты штаммов *P. aeruginosa*, не содержащие нуклеотидной последовательности ЭТА по данным ПЦР. Большинство штаммов, содержащих нуклеотидную последовательность ЭТА, продуцировали ЭТА *in vitro*. Однако 11 штаммов содержащих нуклеотидную последовательность ЭТА, не синтезировали токсина в процессе культивирования.

В результате проведенных исследований разработаны два теста для определения ЭТА, позволяющие с одной стороны идентифицировать возбудитель, поскольку ЭТА является видоспецифичным, а с другой стороны определить токсигенность штамма.

#### **ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ В ОСТРЫЙ И ОТДАЛЕННЫЙ ПЕРИОДЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

Тригуб Д.В., Уразова О.И., Помогаева А.П.

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

**Введение.** Основным фактором иммунопатогенеза инфекционного мононуклеоза (ИМ) является дисрегуля-

ция иммунного ответа с поляризацией его по Th2-пути, угнетением Th1-реакций и усилением продукции интерлейкинов (IL) 4, 6 и 10, которые ингибируют синтез провоспалительных Th1-ассоциированных интерлейкинов, фактора некроза опухоли (TNF)  $\alpha$  и интерферонов (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), что приводит к затяжному течению заболевания и его хронизации в дальнейшем.

**Цель исследования.** Охарактеризовать содержание интерферонов и IL-4, IL-10 в крови при инфекционном мононуклеозе в острый и отдаленный его периоды.

**Материал и методы.** Обследовано 130 детей, 76 мальчиков и 54 девочки в возрасте от 0 до 15 лет, госпитализированных в Детскую инфекционную больницу им. Г.Е. Сибирцева с диагнозом острого ИМ. Дети были разделены на 6 групп в зависимости от этиологии заболевания: 10 детей с ИМ, вызванным HSV-1,2 (ИМ-HSV-1,2), 5 детей с ИМ-CMV, 5 детей с ИМ-EBV, 49 детей с ИМ-HHV-6, 46 детей с ИМ смешанной этиологии и 15 детей с ИМ неуточненной этиологии. Группу контроля составили 18 человек (10 мальчиков и 8 девочек), не имеющих в анамнезе хронических инфекционных, соматических заболеваний и ИМ. Также были обследованы дети, перенесшие ИМ. - через 6 месяцев ( $n=4$ ) и 2 года ( $n=10$ ) после заболевания. Материалом для исследования была сыворотка периферической венозной крови. Определение IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 и IL-10 осуществлялось с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для статистической обработки результатов использовался пакет программ SPSS Statistics 17.0.

**Результаты.** В ходе исследования показано, что статистически значимое снижение содержания IFN- $\alpha$  в крови имеется во всех группах больных ИМ по сравнению с группой контроля. Минимальное значение показателя выявлено при ИМ-HHV-6 - 13,00 (10,25-14,75) пг/мл ( $p<0,001$ ) при норме 46,00 (39,00-61,00) пг/мл. В группах детей с ИМ неуточненной этиологии и ИМ-CMV уровень IFN- $\alpha$  составил 19,75 (18,25-21,25) пг/мл и 14,75 (14,5-16,12) пг/мл соответственно ( $p=0,016$ ), при микст-инфекции - 16,50 (13,5-20,25) пг/мл ( $p=0,034$ ).

Статистически значимое снижение концентрации IFN- $\gamma$  выявлено при ИМ-CMV, ИМ-EBV, ИМ-HHV-6 ( $p=0,006$ ) и при микст-инфекции ( $p=0,015$ ). Минимальное значение IFN- $\gamma$  обнаруживалось при ИМ-HHV-6 - 25,8 (14,00-32,4) пг/мл ( $p<0,001$ ) при норме 178,67 (159,00 - 188,00) пг/мл.

У всех больных ИМ, кроме детей с ИМ-HHV-6, было выявлено статистически значимое увеличение показателя IL-4. Максимальное значение концентрации IL-4 обнаружено у пациентов с ИМ-HSV-1,2 - до 3,04 (2,19-3,87) пг/мл ( $p<0,001$ ) при норме 0,36 (0,20-0,47) пг/мл. Статистически значимое увеличение показателя IL-10 по сравнению с контрольной группой выявлено у детей с ИМ-HSV-1,2, ИМ-HHV-6 и при ИМ неуточненной этиологии ( $p<0,001$ ). Максимальное содержание IL-10 отмечалось в группе детей с ИМ-HHV-6 - до 45,94 (24,56-71,00) пг/мл ( $p<0,001$ ) при норме 11,64 (8,05 - 15,50) пг/мл.

В отдаленный период после ИМ концентрация IFN- $\alpha$  сохранялась пониженной, как через 6 месяцев (17,00 (15,5-19,75) пг/мл), так и через 2 года (15,87 (14,87-18,62) пг/мл). Уровень IFN- $\gamma$  увеличивался по сравнению с острым периодом ИМ и равнялся через 6 месяцев 126,2 (117,2-149,2) пг/мл, через 2 года - 150,2 (141,4-170,60) пг/мл, но при этом он сохранялся ниже, чем у здоровых детей. Кроме того, содержание IL-4 было, по-прежнему, выше нормы - 2,45 (2,28-4,88) пг/мл через 6 месяцев

и 5,39 (2,65-9,11) пг/мл через 2 года. Содержание IL-10 снижалось в отдаленный период после ИМ (27,36 (14,64-48,40) пг/мл через 6 месяцев и 21,64 (17,96 - 37,04) пг/мл через 2 года), но так же, как и уровень IL-4, сохранялось выше, чем у здоровых детей.

**Заключение.** Острый период ИМ характеризуется уменьшением содержания IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  и увеличением концентрации IL-4 и IL-10 в крови, их уровень варьирует в зависимости от этиологии заболевания с максимальной выраженностью отклонений от нормы при ИМ-HHV-6. В отдаленный период после перенесенного заболевания концентрация IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в крови остается ниже, а IL-10 и IL-4 - выше, чем в группе здоровых детей.

## ОТВЕТ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ HERPES LABIALIS НА АНТИГЕННУЮ СТИМУЛЯЦИЮ

Федорова И.М., Котелева С.И., Капустин И.В.,  
Сандалова С.В.

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

В настоящее время выявление антиген-специфических Т-лимфоцитов по продукции ИФН $\gamma$  в присутствии бактериальных и вирусных пептидов уже переходит в сферу клинического применения. В России применяются коммерческие тесты для выявления антиген-специфической Т-клеточной реакции для диагностики туберкулеза (QuantiFERON-TB) и для диагностики реактивации ЦМВ инфекции (QuantiFERON-CMV). Однако, для большинства инфекционных заболеваний приобретение стандартных антигенов, позволяющих исследовать клеточный иммунитет, представляет собой проблему. Мы попытались использовать для этой цели антигены, входящие в состав ИФА-тест-систем для серодиагностики инфекционных заболеваний.

**Целью нашей работы** было исследовать продукцию ИФН $\gamma$  лимфоцитами больных с герпетической инфекцией, сравнить активацию Т-лимфоцитов антигенами ВПГ-1, фиксированными в планшете для ИФА-диагностики, и раствором этих же антигенов, а также определить субпопуляционный состав лимфоцитов, активирующихся в присутствии данных антигенов.

**Материалы и методы.** Обследовано 32 пациента с обострением herpes labialis в остром периоде и через 1 месяц. Контрольная группа состояла из 7 человек (25 - 65 лет), серонегативных по ВПГ-1 инфекции, и не имевших в анамнезе герпеса.

Лейкоциты пациентов выделяли на желатине. Для антигенной стимуляции использовали полистероловые планшеты с сорбированным АГ ВПГ-1 из ИФА-наборов фирмы BioChemMak Diagnostics для определения IgG-антител или раствор АГ ВПГ-1, 2.

Активация лимфоцитов регистрировалась методом проточной цитометрии, концентрация ИФН $\gamma$  оценивалась в ИФА-тесте.

**Результаты.** В период обострения заболевания (2-5 сутки) у больных наблюдается активация Т-лимфоцитов АГ ВПГ-1. Суточное культивирование лейкоцитов больного на планшете с фиксированным АГ или с раствором АГ приводило к повышению продукции ИФН $\gamma$  по сравнению со спонтанной в среднем на 56 пг/мл. У пациентов с редкими рецидивами через месяц после обострения

продукция ИФН $\gamma$  составляла 50–90 пг/мл, у больных с частым рецидивированием заболевания – 0–170 пг/мл.

В процессе культивирования лейкоцитов больно-го с АГ ВПП-1 процент активированных лимфоцитов (судя по экспрессии CD69) не изменялся по сравнению со спонтанным уровнем в субпопуляции Т-хелперов (CD3+CD4+), увеличивался в субпопуляции ЦТЛ (CD3+CD8+) на  $3,6 \pm 0,6\%$ , и среди НК-лимфоцитов (CD3-CD16+) на  $18,1 \pm 2,8\%$ . В лунках с контрольным антигеном (*Mycoplasma pneumoniae*) повышение количества активированных ЦТЛ не превышало 2%, а процент НК-клеток было таким же, как в лунках с АГ ВПП-1 ( $21,9 \pm 3,6\%$ ).

Полученные данные дают основания полагать, что наблюдаемый эффект обеспечивается именно ЦТЛ, поскольку НК-клетки активируются в равной степени как под влиянием АГ ВПП-1 так и в присутствии контрольного антигена, а активация ЦТЛ происходит именно в ответ на антиген ВПП-1.

Для лейкоцитов биодоступность антигенов в жидкой форме выше, чем антигенов, фиксированных на планшете. При разведении антигена в 2–8 раз количество CD69+Т-лимфоцитов регистрируется на уровне в 3 раза выше ( $10,7 \pm 4,6\%$ ), чем при культивировании лейкоцитов с антигеном, фиксированным на пластике. НК-клетки при разведении антигена в 8 раз активировались на том же уровне, что и фиксированным антигеном ( $24,7 \pm 4,9$ ).

Таким образом, хотя наблюдаемая реакция значительно превышает, количество собственно АГ-специфических Т-лимфоцитов, и, вероятно, частично обеспечивается за счет цитокиновых взаимодействий лимфоцитов, полученные результаты могут быть использованы для мониторинга клеточного иммунного ответа при заболеваниях ВПП-этиологии.

## ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ БОЛЬНЫХ КРАСНЫМ ПЛОСКИМ ЛИШАЕМ

Хайретдинова К.Ф., Юсупова Л.А.

Казанская государственная медицинская академия,  
Казань, Россия

**Введение.** Изучение красного плоского лишая остается одной из наиболее актуальных проблем современной дерматологии в связи с широким её распространением, тяжелым вариабельным клиническим течением, частыми рецидивами, заболеванием лиц наиболее трудоспособного возраста и рефрактерностью ко многим методам терапевтического воздействия. В общей структуре дерматологической заболеваемости частота встречаемости красного плоского лишая составляет 2,5%, среди болезней слизистой оболочки рта – 35%. В патогенезе основное значение придается дисфункции иммунной системы, нарушениям метаболических процессов в организме, гепатобилиарной, пищеварительной, сердечно-сосудистой, нервной системам.

**Цель.** Изучение активности провоспалительных (ИЛ-1, ФНО- $\alpha$ ) и иммунорегуляторных (ИЛ-2, ИФН- $\gamma$ ) цитокинов у больных красным плоским лишаем.

**Материал и методы исследования.** Нами было обследовано 57 пациентов красным плоским лишаем с включением клинико-лабораторных, иммунологических методов диагностики. В качестве основных методов исследования использовались: клинический, иммунологический, статистический. В зависимости от формы за-

болевания все больные красным плоским лишаем были разделены на две группы. В первую группу вошло 29 человек подострой формой красного плоского лишая. Вторая группа включала 28 человек в период обострения хронической формы красного плоского лишая. Для иммунологического исследования использовалась сыворотка крови больных красным плоским лишаем. Забор крови производился двукратно по стандартным методикам в группах больных подострой и в период обострения хронической формы красного плоского лишая. Количественное определение цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ФНО $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  в сыворотке венозной крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа в системе бидетерминантного определения антигена с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента с использованием стандартных наборов (С-Петербург) в соответствии с прилагаемой к набору методикой. 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.** Проведенный клинико-статистический анализ заболеваемости 57 больных красным плоским лишаем показал, что значительный процент обследованных составили больные в возрастных группах от 31 до 40 лет (26,3%). Средний возраст больных составил  $37,8 \pm 0,8$  лет. Распространенный характер патологического процесса у женщин регистрировался в 1,8 раз чаще, чем у мужчин (63,1% и 35,1%, соответственно). Анализ результатов клинико-иммунологического исследования у больных красным плоским лишаем проводился в обеих группах. У обследованных отмечалось достоверное повышение содержания провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  как в группе больных подострой, так и хронической формой красного плоского лишая. Изменения содержания иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-2 и ИФН $\gamma$  у больных подострой формы красного плоского лишая были достоверно повышены, в то время как у больных хронической формой красного плоского лишая имели лишь тенденцию к их повышению. По нашим данным, при клиническом обследовании больных подострой формы красного плоского лишая средний индекс ПР составил  $12,7 \pm 0,5$  баллов, в период обострения хронической формы красного плоского лишая индекс ПР –  $14,3 \pm 0,9$  баллов. Основной жалобой у обследованных больных был зуд различной интенсивности, так в первой группе до лечения индекс зуда – Пруриндекс составил  $6,5 \pm 0,2$  балла, во второй группе –  $6,3 \pm 0,4$  балла.

**Выводы.** По результатам проведенного исследования установлено, что показатель иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-2, ИФН $\gamma$  зависит от формы красного плоского лишая. Так, если у больных подострой формой красного плоского лишая происходило повышение ИЛ 2 и ИФН $\gamma$ , то в период обострения хронической формы красного плоского лишая отмечалась лишь тенденция к повышению этих иммунорегуляторных цитокинов. Установленные иммунные механизмы развития красного плоского лишая диктуют необходимость поиска и изучения эффективности новых лекарственных средств патогенетической терапии.

## ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОТВЕТА НЕЙТРОФИЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АКТИВНОСТИ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ *PROTEUS MIRABILIS*

Шишкова Ю.С., Липская А.Д.

Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет, Челябинск, Россия

**Введение:** *P. mirabilis* представитель условно-патогенной флоры слизистых оболочек тела человека. На поверхности эпителия *P. mirabilis* способен образовывать внеклеточный матрикс, формируя биопленку. Данный признак не является видоспецифичным и постоянным, он зависит от внешних условий, влияющих на микроорганизм. При наличии предрасполагающих факторов протей может стать причиной развития гнойно-септических инфекций различной локализации. Первой линией антимикробной защиты на поверхности слизистых оболочек выступают нейтрофилы. В связи с этим, нами решено было оценить влияние *P. mirabilis* с разной способностью биопленкообразования на функциональный ответ нейтрофилов.

**Цель:** Определить функциональный ответ нейтрофилов при взаимодействии с *P. mirabilis* в зависимости от активности биопленкообразования.

**Задачи:** – определить фагоцитарную функцию нейтрофилов по отношению к *P. mirabilis* с высокой и низкой биопленкообразующей способностью; – сравнить интенсивность НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов при взаимодействии с *P. mirabilis*, обладающим высокой и низкой биопленкообразующей функцией; – изучить лизосомальную активность нейтрофилов при активации *P. mirabilis* с высокой и низкой биопленкообразующей активностью; – провести сравнительный анализ жизнеспособности нейтрофильных гранулоцитов после взаимодействия с *P. mirabilis* различной биопленкообразующей способностью.

**Материалы и методы:** Нейтрофилы выделяли из периферической крови 10 условно-здоровых доноров на двойном градиенте фикола-урографина. Для активации нейтрофилов использовали суточные культуры *P. mirabilis* с разной биопленкообразующей способностью. Определение фагоцитарной функции определялось по отношению к суточной культуре *P. mirabilis* с последующей окраской мазков по Романовскому-Гимзе. Определение лизосомальной активности проводилось с помощью люминесцентной микроскопии при окраске акридиновым оранжевым. Постановку НСТ-теста осуществляли в мо-

дификации А.Н. Маянского и М.К. Виксмана. Жизнеспособность нейтрофилов определяли при помощи трипанового синего.

**Основные результаты:** В результате проведенных исследований определили, что *P. mirabilis*, активно образующий биопленку, значительно стимулирует фагоцитарную, лизосомальную и НСТ-редуцирующую активность и гибель нейтрофилов (таблица 1).

**Заключение:** При взаимодействии нейтрофилов с *P. mirabilis* уровень антимикробной активности и количество жизнеспособных клеток определяется выраженностью биопленкообразования у микроорганизма: функциональный ответ нейтрофилов при взаимодействии с бактериальными штаммами, активно образующими биопленки, значительно выше, чем при взаимодействии с микроорганизмами слабо формирующими внеклеточный матрикс, при этом штаммы, активно образующие биопленки, стимулируют гибель нейтрофилов.

## ВЛИЯНИЕ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА *IN VIVO*

Шуленина Е.А., Буданова Е.В., Свитич О.А.

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия  
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Патология дыхательной системы, в частности пневмония, является одной из основных причин высокой заболеваемости и смертности новорожденных детей. К наиболее частым возбудителям бактериальной пневмонии у новорожденных относится *Klebsiella pneumoniae*. В литературе недостаточно данных о том, каким образом данный возбудитель модулирует факторы врожденного иммунитета, в частности распознающие структуры – Toll-подобные рецепторы.

**Целью настоящего исследования** было оценить воздействие *Klebsiella pneumoniae* на уровни экспрессии гена TLR2 в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей *in vivo*.

**Материалы и методы.** В экспериментах были использованы половозрелые мыши обоего пола линии BALB/c весом 18-19 г. Животные были получены из питомника «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН (Москва, РФ) и содержались в стандартных условиях в виварии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С *P. MIRABILIS* (К ТЕЗИСАМ ШИШКОВОЙ Ю.С. И ЛИПСКОЙ А.Д.)

Показатели функционального статуса нейтрофилов	Штамм <i>P. mirabilis</i> с высокой биопленкообразующей способностью	Штамм <i>P. mirabilis</i> с низкой биопленкообразующей способностью	p (M-U критерий)
Фагоцитоз, активность, %	36,5 (31,1-39,2)	28,5 (26,0-31,6)	0,004
Фагоцитоз, интенсивность, усл. ед.	1,28 (1,09-1,33)	0,76 (0,45-1,13)	0,009
Индекс люминесценции лизосом, усл. ед.	310,0 (300,3-312,0)	235,5 (210,5-254,0)	0,0002
Активность лизосом, %	71,1 (66,2-76,0)	64,0 (62,4-67,5)	0,02
НСТ, активность, %	59,0 (54,5-69,7)	51,1 (46,3-56,2)	0,008
НСТ, индекс, усл. ед.	0,82 (0,70-0,89)	0,40 (0,24-0,58)	0,0002
Жизнеспособность, %	56,0 (24,3-65,0)	74,5 (65,0-85,0)	0,01

Тест-штамм *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) был любезно предоставлен сотрудниками ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Данный штамм характеризуется продукцией бета-лактамаз расширенного спектра и, следовательно, обладает устойчивостью к действию многих бета-лактамовых антибиотиков.

Для проведения исследований соскобы из зева животных забирали велюровыми тампонами-ершиками (Sorap, Италия). Для бактериологического исследования производили посев образцов на плотную питательную среду для контроля стерильности №1 (РФ), жидкую тиогликолевую среду (Hi-Media, Индия) и агар MacConkey (Pronadisa, Испания).

Для оценки показателей экспрессии исследуемых генов проводили выделение РНК с использованием набора «Рибо-сорб» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, АмплиСенс, РФ). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора «ОТ-1» (Синтол, РФ), после чего проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Праймеры и зонды для исследований были смоделированы в компьютерной программе Vector NTI 8,0 в соответствии с последовательностями мРНК исследуемых генов (последовательности мРНК были взяты в базе GenBank) и синтезированы компанией Синтол (РФ). Для приготовления ПЦР-смеси в реакциях использовали «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Буфер Б)» (Синтол, РФ). ПЦР-РВ проводили в амплификаторе Pico Real 24 (Thermo Scientific, США) с заданной программой.

**Результаты.** В ходе данной работы была *in vivo* смоделирована клебсиеллезная пневмония. С этой целью мышам линии BALB/c интраназально вводили живую

суточную культуру *K.pneumoniae* по 50 мкл с конечной концентрацией 104 и 108 КОЕ/мл. Контрольной группе животных также интраназально вводили по 50 мкл стерильного физиологического раствора натрия хлорида. Зараженные и интактные животные содержались в разных клетках. Взятие мазков из зева и образцов легких, извлеченных асептически, производили на 1, 3, 7 и 10 сутки после инфицирования. Для оценки стерильности легких интактных (контрольных) животных проводили посев отпечатков на среду №1, тиогликолевую среду и агар MacConkey. Мазки из зева и отпечатки легких животных опытных групп засеивали на среду MacConkey. При проведении бактериологического исследования было установлено, что через 1 сутки после введения максимальной заражающей дозы *K.pneumoniae* в легких мышей отмечался рост колоний этих бактерий. Однако на 3, 7 и 10 сутки в легких этой группы животных признаков роста *K.pneumoniae* не было обнаружено. При этом полная элиминация *K.pneumoniae* из верхних дыхательных путей (из зева мышей) наблюдалась только на 7 сутки после заражения. В эпителиальных клетках верхних дыхательных путей у мышей, инфицированных *K.pneumoniae*, уже на следующие сутки после инфицирования определялась экспрессия гена TLR2 (179,1\*105 копий относительно 106 копий гена актина). При исследовании динамики уровня экспрессии гена TLR2 наблюдалась следующая тенденция: на третьи сутки экспрессия возросла в 3,88 раза относительно показателя в первые сутки, данный показатель сохранялся на высоком уровне в течение недели.

**Заключение.** Таким образом, определение факторов врожденного иммунитета при клебсиеллезной инфекции дыхательных путей, в частности у новорожденных, позволит прогнозировать развитие и течение пневмонии.