

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ CD294DIM

Афанасьева Н.М.¹, Калинина Ю.А.¹, Кудрявцев И.В.²

¹ ООО Вега ГК АлкорБио

² ФГБНУ «НИИЭМ», СПб Россия

ДВФУб Владивосток, Россия

Введение. Аллерген-индуцированный выброс широкого спектра провоспалительных медиаторов резидентными макрофагами, тучными клетками и клетками эпителия определяет патобиохимическую стадию аллергического воспаления в тканях, а также является фактором привлечения эффекторных клеток к зоне воспаления. Среди них: эозинофилы, моноциты, плазматикоидные дендритные клетки и базофилы. Одним из ключевых медиаторов тучных клеток, осуществляющих хемотаксис, является простагландин D2 (PGD2). Свойства PGD2, как хемоаттрактанта, проявляются через взаимодействие с молекулой CRTH2 (CD294), экспрессированной на поверхности базофилов, эозинофилов и Т хелперов 2 типа. Высокая специфичность антигена CD294 для базофилов позволяет использовать его для фенотипирования и оценки степени их активации (по уровню экспрессии CD203c) под воздействием аллергенов (тест активации базофилов, basophil activation test).

Опыт использования протокола SSlowCD294posCD3negCD203c показал, что при анализе клеточных популяций по гранулярности (SS) и маркеру CD294 выявляются популяции с низким и высоким уровнем экспрессии этого маркера. Поскольку базофилы являются малочисленной популяцией клеток, то вопрос точного выбора области анализа становится принципиальным, особенно с точки зрения диагностики.

Цель и задачи. Оценить целесообразность включения клеточной популяции SSlowCD294dim в состав анализируемы клеток при проведении теста активации базофилов. Провести иммунофенотипирование популяции CD294dim по маркерам позитивным (CD294/CD123/CD203c/CD25/CD33) и негативным (CD14/CD16/HLA-DR/CD3) для базофилов.

Материалы и методы. Методом проточной цитофлуориметрии проведено иммунофенотипирование базофилов с использованием моноклональных антител компании Beckman Coulter (США): CD3-ECD (UCHT1), CD25-PC7 (B1.49.9), HLA-DR-PB (Immu-357), CD33-PE (D3HL60.251), CD16-PC7 (3G8), CD14-APC (RMO52), CD45- APC-AlexaFluor 750 (J.33), CD45-KromeOrange (J.33); моноклональные антитела компании Biolegend (США): CD294(CRTH2)-FITC (BM16); моноклональные антитела компании Veston Dickinson (США): CD123-PE (9F5). Для анализа были скомбинированы следующие

панели антител: CD294/CD123/CD3/CD25/HLA-DR/CD45 и CD294/CD33/CD3/CD16/CD14/CD45/HLA-DR. Стратегия гейтирования заключалась в выборе лейкоцитов с фенотипом CD45posSSlowCD294dim и CD294bright популяции с последующим анализом по выбранным маркерам. Иммунофенотипирование базофилов проводилось на образцах цельной (гепаринизированной) периферической крови 2 доноров без аллергии (мужского пола, возраст 3 и 11 лет). Протокол пробоподготовки включал окраску моноклональными антителами с последующим лизисом эритроцитов раствором Versalyse (Beckman Colter, США) и однократной отмывкой в фосфатно-солевом буфере. Анализ пробы проводился на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, США).

Результаты. Популяция SSlowCD294dim состоит преимущественно из мононуклеарных лейкоцитов, позитивных по CD16 (85.1%), CD14 (87.6%), HLA-DR (92.9%), CD33 (91.8%), CD25 (11.1%) клеток, представляющих собой провоспалительные моноциты. Популяция CD294dim практически не содержит клетки, позитивные по CD123 и CD203c (не более 5%), являющиеся базофилами.

Популяция клеток SSlow CD294bright представлена базофилами CD203c (52,8%) и CD123 (81,75%), позитивными по CD25(90,2%), CD33 (76,9%) и негативными по CD16 (2,9%), CD14 (1,9%), HLA-DR (6,18%). Исследуемая популяция содержит также 17,7% CD3posT клеток.

Заключение. Таким образом, клеточная популяция с фенотипом SSlowCD294dim представлена главным образом провоспалительными моноцитами (CD16posCD14posCD33posHLA-DRpos) и содержит малый процент базофилов, поэтому включение данной популяции в целевую область анализа не целесообразно.

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Михайлова И.А., Кобиашвили М.Г.

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

В настоящее время большую актуальность приобретает хроническая патология верхних отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). В многочисленных исследованиях описана последовательность изменений слизистой оболочки желудка: воспаление → атрофия → метаплазия → прогрессирующая дисплазия и рак in situ, завершаю-

шийся инвазивным раком (каскад Соггеа). Одним из подходов к изучению механизмов противоопухолевого ответа является оценка показателей местного иммунитета у пациентов с хроническими воспалительными и неопластическими процессами ЖКТ.

Комплексное обследование было проведено 64 пациентам. По данным эндоскопического осмотра и результатам гистологического анализа биоптатов пациенты были разделены на следующие группы: 1-я группа (n = 15) с хроническим неатрофическим гастритом (НГ) со слабой или умеренной степенью воспаления (НР-неассоциированным), 2-я группа (n = 29) с хроническим атрофическим гастритом (АГ) (НР-неассоциированным), 3-я группа (n = 20) с аденокарциномой слизистой оболочки желудка (РЖ).

Методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC 500, Beckman-Coulter) в многоцветном анализе был исследован субпопуляционный состав лимфоцитов (CD45-PC7, CD8-FITC/CD4-PE/CD3-PC5, CD3-FITC/CD(16+56)-PE, CD19-FITC, HLA DR-PC5, CD95-PE, Beckman-Coulter), инфильтрирующих слизистую оболочку желудка, полученных из гастробиоптата при помощи механической дезагрегации (Medimachine, BD) с последующей фильтрацией и центрифугированием в растворе Версена.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica (версия 5.0).

В суспензии клеток, полученной из слизистой оболочки желудка, количество лимфоцитов (CD45+bright) варьировало от 0,2 до 24,8%, прогрессивно уменьшаясь в ряду «слизистая с НГ»-«слизистая с АГ»-«РЖ» (12,6%-7,8%-4,1%, $p < 0,05$).

Среди лимфоцитов во всех исследованных образцах преобладали зрелые Т-клетки (67-90%). Самое низкое количество Т-лимфоцитов наблюдалось у пациентов с новообразованиями желудка. Среди Т-лимфоцитов преобладали цитотоксические Т-клетки во всех группах, что резко отличало распределение Т-клеток слизистой оболочки желудка от субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. В ряду «слизистая с НГ»-«слизистая с АГ»-«РЖ» наблюдалось незначительное увеличение относительного количества Т-хелперов при выраженном снижении Т-цитотоксических лимфоцитов (70%-59%-47%, $p < 0,05$) «Дубль-позитивные» Т-лимфоциты составили в разных группах от 1 до 2,2%, самые высокие значения наблюдались при новообразованиях желудка.

Количество НК-клеток в биоптатах пациентов всех групп было невысоким, наблюдалось повышение относительного количества этих клеток в ряду «слизистая с НГ»-«слизистая с АГ»-«РЖ» (1,8%-3,4%-5,3%, $p < 0,05$).

Количество ТНК-клеток в 2-6 раз превышало число НК-клеток в биоптатах слизистой желудка всех обследованных групп и было сопоставимо во всех группах.

Среди лимфоцитов, инфильтрирующих слизистую, доля В-клеток составила 7-19%, их количество увеличивалось в ряду «слизистая с НГ»-«слизистая с АГ»-«РЖ» (7%-15%-19%, $p < 0,05$).

Количество внутриэпителиальных лимфоцитов, экспрессирующих маркеры поздней активации (HLA DR, CD95), незначительно увеличивалось в ряду «слизистая с НГ»-«слизистая с АГ»-«РЖ».

Проведенное исследование показало, что соотношение субпопуляций лимфоцитов слизистой оболочки желудка резко отличается от такового периферической

крови и характеризуется преобладанием Т-лимфоцитов и специфических Т-цитотоксических лимфоцитов, что обусловлено функциональными особенностями барьерного органа.

При изменении характера воспаления и прогрессирующей трансформации слизистой оболочки в соответствии с каскадом Соггеа наблюдается истощение слизистой лимфоцитами и, особенно, Т-цитотоксическими клетками. Они осуществляют противоопухолевую защиту, и их гибель в результате апоптоза вносит существенный вклад в прогрессирование опухолевого заболевания.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Бычкова Н.В., Калашникова А.А., Давыдова Н.И., Калинина Н.М.

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

Проточная цитометрия в приложении к исследованию содержания ДНК, являясь самым старым методическим подходом, на современном этапе активно развивается, находя новые возможности применения не только в онкологии, но и в клинической лабораторной диагностике. Помимо определения плоидности и пролиферативной активности клеток опухолей различной локализации анализ содержания ДНК в клетках может быть использован для исследования функциональной (главным образом, пролиферативной) активности иммунокомпетентных клеток.

В исследование были включены 25 пациентов с тяжелой сочетанной травмой, 163 пациента с рассеянным склерозом, 44 пациента с сахарным диабетом 1 типа, 15 родственников с высоким риском развития данного заболевания. В качестве группы сравнения были обследованы 18 человек, которые не имели острых воспалительных процессов и при наличии хронических заболеваний на момент сдачи крови находились в состоянии ремиссии.

Всем пациентам методом проточной цитометрии (EPICS XL, Beckman-Coulter) был проведен анализ спонтанной, индуцированной ФГА и митогеном лактоноса пролиферативной активности лимфоцитов. Пациентам с аутоиммунными заболеваниями дополнительно исследовали пролиферативную активность лимфоцитов со специфическими антигенами (для группы пациентов с сахарным диабетом и их родственников — инсулин, для больных рассеянным склерозом — основной белок миелина). Инкубацию цельной крови проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 (с митогенами) и 7 (со специфическими антигенами) суток. В каждой пробе, окрашенной бромистым этидием в присутствии РНК-азы, оценивали долю пролиферирующих клеток (%), а также индекс пролиферации на специфический антиген, который рассчитывали как соотношение показателей антиген-стимулированной и спонтанной пролиферации лимфоцитов.

По сравнению с клинически здоровыми людьми у пациентов в первые дни после тяжелой сочетанной травмы выявлено достоверное угнетение пролиферативной функции Т-лимфоцитов ($9,5 \pm 4,5\%$ против $44,1 \pm 1,4$, $p < 0,001$) при сохранении пролиферативного потенциала В-клеток. Впоследствии к третьей-четвертой неделям по-

сле травмы наблюдалось повышение пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Отсутствие восстановления пролиферативного потенциала Т-лимфоцитов к концу 2-ой недели наблюдения свидетельствовало о высоком риске летального исхода ($8,3 \pm 4,5\%$ у умерших против $15,9 \pm 2,9\%$ у выживших пациентов, $p < 0,05$).

У пациентов с рассеянным склерозом показана значимость определения аутореактивных клонов лимфоцитов *in vitro* в пролиферативном тесте с использованием в качестве аутоантигена основного белка миелина (индекс пролиферации лимфоцитов на основной белок миелина у пациентов $1,11 \pm 0,05$, в группе сравнения $0,90 \pm 0,05$, $p < 0,05$). Выявление у обследуемого больного пролиферации лимфоцитов на основной белок миелина или повышение индекса пролиферации по сравнению с предыдущим исследованием может свидетельствовать об обострении демиелинизирующего процесса, что должно быть учтено лечащим врачом для коррекции терапии.

Индекс пролиферации на инсулин у пациентов с высоким риском развития сахарного диабета был значимо выше, чем в группе сравнения и у пациентов с компенсированным заболеванием ($1,9 \pm 0,1$ против $0,7 \pm 0,1$ и $1,1 \pm 0,1$, $p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что определение сенсibilизации лимфоцитов к инсулину *in vitro* можно использовать как дополнительный информативный критерий риска развития этого заболевания у лиц первой степени родства больных сахарным диабетом 1 типа. При выявлении у данной категории лиц аутореактивных клонов лимфоцитов *in vitro* в пролиферативном тесте с использованием в качестве аутоантигена инсулина необходимо более тщательное диспансерное наблюдение для выявления заболевания на ранней стадии.

В результате проведенной работы доказана клиническая значимость предложенного варианта оценки пролиферативного потенциала лимфоцитов методом проточной цитометрии у разных категорий пациентов при использовании для стимуляции клеток митогенов и различных специфических антигенов.

ДВУХЭТАПНАЯ МАГНИТНАЯ СЕПАРАЦИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОЙ ФУНКЦИИ ТИМУСА *IN VIVO*

Головизнин М.В., Лахонина Н.С., Донецкова А.Д., Никонова М.Ф., Кременчугская Т.А., Тимофеев В.Т.

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

ГНЦ Институт иммунологии ФМБА РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Роль тимуса как центрального органа Т-системы иммунитета установлена более полувека назад, однако, оценка функции тимуса у человека *in vivo* до сих пор не перешагнула стадию эксперимента. В настоящее время перспективными методами оценки Т-клеточного созревания в тимусе являются определение уровня колец реаранжировки генов альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TREC) и анализ фенотипа клеток CD4+31+, т.н. «ранних тимических эмигрантов» (РТЭ). Целью настоящей работы явилась разработка методики, позволяющей определить уровень TREC в клетках CD4+31+ (РТЭ). Материалы и методы: Фракционирование лимфоцитов с целью обогащения их субпопуляцией CD4+CD31+-клеток

производили с помощью двухэтапной магнитной сепарации при помощи магнитных бус Dynabeads Untouched Human CD4 T Cells и Dynabeads CD31 Endothelial Cell («Invitrogen») в соответствии с прилагаемыми протоколами. В основу фракционирования положено предварительное выделение CD4+-лимфоцитов с помощью бус, нагруженных МоnАТ к CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CDw123 и CD235a (отрицательная сепарация CD4+ Т-лимфоцитов), и последующим выделением CD31+ из популяции CD4+-клеток (положительная сепарация CD31+ Т-лимфоцитов). При этом предварительно выделенные МНПК обрабатывали смесью МоnАТ (CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CDw123 и CD235a), отмывали в PBS с добавлением 2 mM ЭДТА («Sigma») и 0,1% BSA («ПанЭко») для удаления несвязавшихся антител. Затем клетки в концентрации 1×10^8 инкубировали с отмывтыми магнитными бусами в течение 15 минут при комнатной температуре на Dynal mixer с интенсивным вращением и встряхиванием. Клетки, соединившиеся с бусами, собирали магнитом (Dynal MPC), отделившийся супернатант (CD4+-клетки) использовали для последующего выделения CD4+CD31+-клеток и постановки ПЦР (1×10^6 клеток). Для выделения клеток CD31+ из популяции CD4+-клеток последние ресуспендировали, перемешивали с отмывтыми магнитными бусами с МоnАТ к CD31 и инкубировали в течение 20 минут при 40С на «Dynal mixer» с интенсивным вращением и встряхиванием. Клетки, соединившиеся с бусами (CD4+CD31+), собирали магнитом («Dynal MPC»), отмывали 2 раза. TREC определяли с помощью методики ПЦР. Для постановки ПЦР использовали CD4+CD31+-клетки, соединенные с бусами и CD4+CD31-клетки (супернатант) в количестве 1×10^6 . Процент клеток CD4+ в выделенной фракции при цитометрическом анализе с использованием МоnАТ к CD4 при контроле на чистоту выделенной популяции составил 96-98%, процент клеток CD4+CD31+- выше 70%. Результаты исследования представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ TREC В CD4+31+ И CD4+31- Т-ЛИМФОЦИТАХ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

| Донор | Возраст | TREC в клетках CD4+31+ | TREC в клетках CD4+31- |
|-------|---------|------------------------|------------------------|
| Д-1 | 33 | 0,0298 | 0,0080 |
| Д-2 | 20 | 0,1580 | 0,0115 |
| Д-3 | 34 | 0,2765 | 0,0045 |
| Д-4 | 21 | 0,0870 | 0,0162 |
| Д-5 | 21 | 0,0530 | 0,0075 |
| Д-6 | 53 | 0,0611 | 0,0024 |
| Д-7 | 50 | 0,0117 | 0,0010 |
| Д-8 | 56 | 0,0090 | 0,0009 |

Средний уровень TREC в CD4+31+ клетках составил 0,057050 у.е. (нижний квартиль – 0,020750, верхний квартиль – 0,12250), в клетках CD4+31- 0,006 у.е. (нижний квартиль – 0,0017, верхний квартиль – 0,00975). При проведении корреляционного анализа была выявлена достоверная сильная отрицательная корреляция между возрастом и уровнем TREC в Т-лимфоцитах CD4+31- (не РТЭ) ($R = -0,898$, $p = 0,002$). Корреляция между кон-

центрацией TREC в РТЭ (CD4+31+ лимфоцитах) достоверной не была ($R=-0,55$, $p=0,157$), что свидетельствует о том, что количество TREC в РТЭ не зависело от возраста. Таким образом, наличие у доноров разного возраста РТЭ, уровень TREC в которых не зависел от возраста, указывает на сохраняющуюся функцию тимуса у взрослых лиц. Разработанный нами метод двухэтапной магнитной сепарации лимфоцитов с выделением РТЭ и последующей оценкой в них уровня TREC представляется перспективным для мониторинга дифференцировочной функции тимуса *in vivo*. В доступной литературе мы не встретили аналогичных методик, с использованием бус, нагруженных МоАТ к CD31, которые изначально предлагались производителем для оценки эндотелиоцитов. Работа выполнена в рамках инициативного проекта №14-04-32106, поддержанного грантом РФФИ.

ЭТАПЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ ЗВЕНЬЕВ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПЭТИЧНСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (ТГСК) У ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА

Гусева О.А.¹, Жогов В.В.¹, Хайдуков С.В.²

¹ФГБУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, МЗ РФ, Москва, Россия

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

Проблемы возникающие после аллогенной ТГСК у пациентов как правило связаны с недостаточностью клеточного звена иммунитета. В связи с этим, цель данного исследования заключалась в проведении мониторинга реконструкции основных и малых субпопуляций Т-, В- и NK-клеток в течение 6 мес с интервалом в 1 мес. В процессе работы были обследованы 33 пациента в возрасте от 8 до 15 лет, после аллогенной ТГСК. Идентификацию субпопуляций лимфоцитов проводили методом пятицветной проточной цитофлуориметрии с использованием МАТ конъюгированных различными флюорохромами: FITC; PE; ECD; PC5 и PC7 (все Beckman Coulter). Анализировали следующие субпопуляции лимфоцитов: Tcells(CD45+CD3+), Th (CD4+CD3+), Tc (CD8+CD3+), Treg (CD25^{high}CD127-), Teff (CD4+CD45RA-CD45R0+), Tnaiv(CD4+CD45RA+CD45R0-), T tym.naiv (CD31+CD4+); B cells (CD45+CD19+), B-cells (CD27+CD38+от CD19+), B-cells (CD27+CD5-от CD19+); NK cells (total CD3-), NK cells (CD8+CD3-), NK cells (CD56+CD38+).

В первые 30 суток после ТГСК был выявлено иммунодефицитное состояние по Т- и В-лимфоцитам. При этом содержание NK-клеток было достаточно высоким. В то же время отмечено появление Ttym.naiv CD31+CD4+. Уровень Ttym.naiv CD31+CD4+ возрастает на 90-е сутки и достигает максимального значения на 180 сутки. Нормализация соотношения Th/Tc отмечалась на 90-е сутки и сохранялась до 150-и суток. На 90-е сутки регистрировалось максимальное количество Treg, которое, в дальнейшем постепенно снижалось. Нормализация соотношения CD45RA/CD45R0+ было отмечено на 150 – 180-е сутки после ТГСК. Выявлено, практически полное отсутствие В-лимфоцитов после ТГСК вплоть до 90-х суток, после чего в крови регистрировались единичные В-клетки. В это же время появлялись В-клетки памяти.

На 180-е сутки уровень В-лимфоцитов достигает физиологически нормального значения, характерного для детского возраста (25-35%). Следует отметить, что наибольшее количество всех исследованных субпопуляций NK-клеток регистрировалось на 30-е сутки после ТКСТ. В последующие месяцы (сутки) их количество плавно снижалось до нормативных показателей (120 сутки).

Таким образом, выявлено, что, в отличие от зрелых Т-клеток, уже на 30-е сутки в периферической крови пациентов регистрируются Ttym.naiv CD31+CD4+. Содержание В-лимфоцитов вплоть до 90-х суток было незначительным. Их количество резко возрастало на 120-е сутки (выше нормы) и нормализовывалось к 180-м суткам. Наоборот, содержание NK-клеток до 120-х суток было высоким ($49,1-35,0 \pm 34,3-20\%$). Уверенная нормализация регистрировалась спустя 120 суток ($20,0 \pm 7,5$).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ НЕМАТОFLOW-CYTODIFF

Ермаков А.И., Кобзева Н.Г., Гайковая Л.Б., Вавилова Т.В.

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

Введение. В последние годы с совершенствованием лабораторных технологий появилась возможность проводить более эффективную оценку клеточного состава периферической крови на гематологическом анализаторе. Компанией Beckman Coulter разработан и внедряется в клиническую практику расширенный дифференцированный подсчет лейкоцитов методом проточной цитометрии с использованием панели реагентов “CytoDiff”®. Данный метод позволяет в более ранние сроки и с высокой чувствительностью выявить изменения в популяционном составе лейкоцитов при различных патологических состояниях.

Целью настоящего исследования явился анализ популяционного состава лейкоцитов периферической крови человека с использованием панели реагентов “CytoDiff”® у пациентов с воспалением на ранних этапах диагностики.

Материал и методы. В исследование были включены 30 пациентов в первые сутки поступления в клинику. Пациенты группы А (16 человек) с атеросклерозом артерий нижних конечностей в качестве модели хронического воспалительного процесса и 14 человек (группа Б) – с гнойно-воспалительными заболеваниями органов дыхания. Оценивали клеточный состав венозной крови с помощью дифференцированного подсчета лейкоцитов с использованием двухплатформенной технологии методом проточной цитометрии (Beckman Coulter, США). Полученные данные анализировали как непараметрические величины, для сравнения средних показателей использовался тест Манна-Уитни.

Результаты. Статистически достоверного различия по общему количеству лейкоцитов между двумя группами пациентов отмечено не было. При сравнении популяционного состава лейкоцитов периферической крови у пациентов с септическим воспалением было отмечено значимое ($p<0,05$) снижение процентного содержания

ТАБЛИЦА 1. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ПРОЦЕССОМ ИССЛЕДОВАННЫЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАНЕЛИ “CYTODIFF”® (К ТЕЗИСАМ ЕРМАКОВА А.И. И ДР.)

| Популяция лейкоцитов | отн., % | | p | абс., кл/мкл | | p |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------|--------------|----------------|--------|
| | Гр. А (n=16) | Гр. Б (n=14) | | Гр. А (n=16) | Гр. Б (n=14) | |
| Общее количество лейкоцитов | - | - | - | 8,9±0,7 | 13,8±2,4 | 0,10 |
| В-лимфоциты | 3,1±0,5 | 1,7±0,4 | 0,01 | 263,8±43,8 | 183,5±43,0 | 0,07 |
| Т- и НК-лимфоциты | 27,8±2,5 | 16,2±3,9 | 0,01 | 2293,6±162,0 | 1354,2±182,3 | 0,002 |
| Общее количество лимфоцитов | 30,8±2,5 | 17,9±4,2 | 0,01 | 2557,7±175,0 | 1537,9±200,3 | 0,002 |
| Общее количество моноцитов | 8,4±0,6 | 7,5±1,4 | 0,74 | 710,0±52,7 | 817,6±186,3 | 0,90 |
| Зрелые нейтрофилы | 56,6±3,1 | 70,6±5,6 | 0,04 | 5275,9±693,1 | 10988,1±2264,3 | 0,06 |
| Эозинофилы | 3,2±0,6 | 2,1±0,8 | 0,08 | 245,0±34,0 | 168,8±67,8 | 0,03 |
| Базофилы | 0,9±0,1 | 0,2±0,1 | 0,0002 | 71,1±8,9 | 24,2±5,7 | 0,0004 |
| Незрелые гранулоциты | 0,1±0,03 | 1,1±0,4 | 0,003 | 8,7±2,4 | 173,8±56,7 | 0,007 |

В-лимфоцитов, относительного и абсолютного количества базофилов, Т- и НК-лимфоцитов и абсолютно количества эозинофилов, которые, мигрируя в очаг воспаления и регионарные лимфатические узлы, осуществляют развитие специфического иммунного ответа на внедрение инфекционного агента (табл. 1).

Выявленные у данной группы пациентов увеличение процентного содержания нейтрофилов, относительного и абсолютного количества незрелых гранулоцитов отражают более выраженную реакцию костного мозга на инфекционный процесс, по сравнению с асептическим воспалением.

Выводы. Отсутствие в первые сутки различий по общему количеству лейкоцитов между разными формами воспалительного процесса не позволяют адекватно оценить его обширность, силу и этиологический фактор, тогда как изменения в популяционном составе, полученные с помощью панели “CytoDif”® несут клиническую значимость для ранней диагностики развивающихся инфекционно-воспалительных осложнений.

Данная исследовательская работа поддержана грантом компании «BECKMAN COULTER, INC.».

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ СИСТЕМНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ И СЕПСИСА

Калашникова А.А., Макарова Н.В., Калинина Н.М.

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

Диагностика сепсиса представляет значительные сложности для клиницистов. Появление теста на прокальцитонин, коррелирующего с бактериальной нагрузкой, облегчило эту задачу, но не решило ее полностью. В настоящее время остается актуальным поиск ранних и специфических для бактериальной инфекции, лабораторных показателей.

В антибактериальном ответе ведущую роль играют компоненты врожденного иммунитета. Попадание бактериального антигена в кровь приводит к экспрессии нейтрофилами Fc gammaRI (nCD64). Повышение nCD64 в периферической крови является наиболее ранним по-

казателем развития иммунного ответа на бактериальную инфекцию. В течение последних лет в ряде зарубежных работ было предложено определение nCD64 для ранней диагностики и оценки эффективности терапии системной бактериальной инфекции и сепсиса.

Уровень экспрессии HLADR на моноцитах (mHLADR) отражает развитие моноцитарной дисфункции у иммуноскомпрометированных пациентов. Снижение mHLADR, по мнению ряда авторов, является предиктором присоединения нозокомиальной инфекции и коррелирует с выживаемостью.

Цель работы: Оценить целесообразность определения nCD64 для диагностики системных бактериальных инфекций и сепсиса. Определить референтные значения для здоровых лиц и дигностически значимые уровни nCD64 для пациентов с системными бактериальными инфекциями и сепсисом. Оценить эффективность определения mHLADR для прогноза вероятного исхода.

Обследованы 32 пациента ОРИТ ВЦЭРМ МЧС России (системная бактериальная инфекция (перитонит, нозокомиальная пневмония, острая внебольничная пневмония и др.) – 15 чел., сепсис – 7 чел., группа сравнения (тяжелое поражение ЦНС неинфекционного генеза, травматическая болезнь с неосложненным течением и др.) – 10 чел.) и 10 условно здоровых лиц. Исследования проводились в динамике (1-14 наблюдений на пациента). Методом проточной цитометрии (NAVIOS, CYTOMICS FC 500, Beckman-Coulter) в многоцветном анализе определялось относительное количество HLA DR+ моноцитов и относительное количество CD64+ нейтрофилов в периферической крови (IgG1FITC, CD64FITC, CD14PE, CD16ECD, CD45PC5, HLA DRPC7, Beckman-Coulter). Для оценки плотности экспрессии nCD64 использован расчетный индекс (РИ) – соотношение средней интенсивности флуоресценции нейтрофилов после связывания с анти-CD64 к средней интенсивности флуоресценции негативного контроля. Результаты сопоставлялись с данными медицинских карт пациентов и уровнем прокальцитонина в сыворотке. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica 5.0.

Результаты исследования. У пациентов с системными бактериальными инфекциями и сепсисом отмечалось статистически достоверное повышение экспрессии CD64

ТАБЛИЦА 1. ДОЛЯ CD64+ НЕЙТРОФИЛОВ И ПЛОТНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ CD64 В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ (К ТЕЗИСАМ КАЛАШНИКОВОЙ А.А. И ДР.)

| | %CD64 | Плотность экспрессии CD64 (PI) |
|--|--------|--------------------------------|
| Сепсис (n=7, 49 наблюдений) | 97-100 | 6,5-13 |
| Системная бактериальная инфекция (n=15, 75 наблюдений) | 87-100 | 4,4-9,3 |
| Группа сравнения (n=10, 24 наблюдения) | ≤43 | ≤2,2 |
| Условно здоровые лица | ≤15 | ≤1,5 |

по сравнению с группой сравнения и условно здоровыми лицами ($p < 0,001$) (табл. 1).

Определены диагностически значимые уровни nCD64: при $CD64 \geq 94\%$ и $PI \geq 6,5$ вероятность сепсиса очень велика ($p < 0,001$), при $CD64 \geq 75\%$ и $PI \geq 4$ вероятность системной бактериальной инфекции очень велика ($p < 0,001$). Снижение доли CD64+ нейтрофилов $< 75\%$ и $PI < 4$ говорит о локализации системной бактериальной инфекции. nCD64 более динамичный показатель, чем прокальцитонин, с которым отмечена прямая корреляционная зависимость ($p < 0,05$).

Снижение mHLADR ниже нормальных значений отмечено у 19 пациентов ОРИТ (60%). Минимальные значения ($< 35\%$) наблюдались у 3-х пациентов за сутки и менее до летального исхода.

Определение nCD64 методом проточной цитометрии позволяет расширить спектр лабораторных исследований для диагностики системных бактериальных инфекций и сепсиса, а также мониторинга состояния пациентов. mHLADR может быть информативным показателем для оценки риска летального исхода у тяжелобольных пациентов.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТВЕРДОФАЗНОЙ СИСТЕМЫ БЕЛКОВОГО ГОРМОНА С МЕЧЕНЫМИ АНТИТЕЛАМИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

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

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

Введение: Белковые гормоны функционируют как системы множественных форм с варьирующим набором разделяющихся биологических активностей. Ранее мы показали возможность дот-блоттингового иммунохимического выявления рекомбинантного эритропоэтина (рЭПО) в моче пациента с использованием моноклональных антител (мАТ) к ЭПО в составе меченого иммунного сэндвича (ИС). Разделение системных форм гормона изоэлектрофокусированием в полиакриламидном геле (ИЭФ-ПААГ) позволяет проводить идентификацию хемилюминесцентных картин системных типов рЭПО на блоте посредством мАТ-содержащего меченого пероксидазой ИС. Однако более выигрышным по времени и по затратам является использование пероксидазных поликлональных АТ к ЭПО. Цель: Цель - хемилюминесцентное блотовое определение системы белкового гормона конъюгатом пероксидазы с поликлональными антителами в реальном времени на примере рЭПО.

Материалы и методы: Использовали эритроцитим (www.microgen.ru), эпокрин (www.epocpin.ru), рекормон (Boehringer-La Roche). Положительный контроль

- нормальная моча с добавленным рчЭПО (сутки, 37°C). Концентраты проб с рЭПО разделяли высоковольтным ИЭФ-ПААГ в градиенте pH 2-6 с мочевиной и сахарозой, блотировали на иммобиллон. Изоформы проявляли тест-системой для ИФА ЭПО в микропанели (EPO ELISA kit, R&D). Разведения АТ-пероксидазы в 100 раз готовили в ФСБ pH 7 с 0.5% БСА или 0.005% твином-20. Блоты обрабатывали АТ-пероксидазой, проводили pH 2.9-электроперенос пероксидазной активности на иммобиллон (блот-2). Контролировали дискретность полос рЭПО доокрашиванием картины посредством (АТ к IgG)-биотин—Стрептавидин-пероксидазой. Пероксидазу проявляли субстратом BioWest (UVP), хемилюминесценцию регистрировали в реальном времени в системе BioChem System (UVP).

Основные результаты: Конъюгат АТ-пероксидазы в разведениях в 100 раз позволял выявлять характерные для типов коммерческих препаратов рЭПО системы изоформ, различающиеся по числу и pH. Лучшие результаты получены при разделении эритроцитима в растворе глицерина. Смесь эритроцитима и эпокрин (разбавления в 25% глицерине до разделения форм рЭПО) давала максимальное число чередующихся полос на фоне совпадения диминирующих полос (5-6 более ярких и широких в случае эритроцитима и 9-11 менее ярких, более узких, вместе более протяженных - в случае эпокрин). Мажорные формы рекормона выявлялись как двухполосные в области совпадающих мажорных форм эритроцитима и эпокрин. В случае мочевых форм ЭПО наблюдались дополнительные полосы конверсии рЭПО в дополнительной области - пограничной с областью эндогенного ЭПО (эЭПО). Для определения распознавания немочевых систем рЭПО достаточно было рабочего дня. В случае мочевых систем ЭПО использование АТ-пероксидазы с доокрашиванием выявляло дозозависимые области дискретных полос эритроцитима при разбавлениях 500-32000 раз, а также системы эЭПО. Присутствие рЭПО в моче приводило к диффузности полос в сравнении с немочевым рЭПО. Случаи мочи пациента с почечной недостаточностью особенно усложняли определение как системного эЭПО (в меньшей степени), так и системного рЭПО (в большей степени) в связи с комплексобразованием рЭПО с компонентами мочи и взаимоконверсией рЭПО—эЭПО. Чувствительность выявления области мочевого рчЭПО (на примере эритроцитима) — менее 0.2 мМЕ/мл. Предложенные подходы были эффективными и при повторных использованиях блотов (нескольких репробингах). В случае репробинговых определений ЭПО несколько снижались интенсивность форм ЭПО и усиливалась их диффузность.

Заключение: Использование АТ-пероксидазы сокращает идентификацию препаратов рЭПО более чем в 3 раза в сравнении с использованием ИС с биотин-

стрептавидиновой системой, меченой пероксидазой. Доокрашивание блотов АТ-биотин—Стрептавидин-пероксидазой усиливает дискретность системы белкового гормона в моче при репробинге блотов. Применение АТ-пероксидазы в сочетании с доокрашиванием позволяет выявлять варьирующие характеристические формы инъецированного в организм рЭПО в моче пациентов с почечной недостаточностью и анемией, проходящих лечение с использованием гормона.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРА К G-CSF НА РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

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

Центр медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

Введение. Гранулоцитарный-колониестимулирующий фактор (G-CSF, Granulocyte colony-stimulating factor) играет ключевую роль в процессах созревания клеток миелоидного ряда. Он индуцирует преимущественно рост колоний гранулоцитов, а так же стимулирует активность зрелых нейтрофилов. В то же время, влияние G-CSF на ростовые и функциональные свойства клетки лимфоидного ряда остается малоисследованным.

Цель. Оценить экспрессию рецепторов к G-CSF (G-CSFR) на различных субпопуляциях Т-лимфоцитов: Т-хелперов (Th: CD3+CD4+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL: CD3+CD8+), наивных Т-клеток (na ve: CD45RA+CD197+), центральных (CM: CD45RA-CD197-), эффекторных Т-клеток памяти (EM: CD45RA-CD197+), а также терминально-дифференцированных эффекторных клеток (TEMRA: CD45RA+CD197-).

Материалы и методы. CD3+ Т лимфоциты выделяли из мононуклеарных клеток здоровых доноров (5 мужчин и 3 женщины, средний возраст составил 31,5±2,3 года) методом позитивной магнитной сепарации. Выделенные Т-лимфоциты культивировали в бессывороточной среде TexMACS™ Medium research grade (Miltenyi Biotec), с частицами конъюгированными с антителами к CD2, CD3 и CD28 (T-cells activation/expansion kit, Miltenyi Biotec) или без них в течение 48 ч. В часть проб был добавлен G-CSF в концентрации 10 нг/мл. Экспрессию G-CSFR на Т-клеточных субпопуляциях оценивали методом проточной цитометрии с использованием меченных флюорохромами моноклональных антител к CD4, CD197, CD45RA и CD114.

Результаты. Как показано в таблице, активация Т-лимфоцитов может стимулировать экспрессию G-CSFR на их поверхности. Присутствие G-CSF в куль-

туральной среде дополнительно повышало уровень экспрессии G-CSFR на активированных клетках. Среди неактивированных клеток, только субпопуляции цитотоксических лимфоцитов CM и EMRA отвечали повышением экспрессии G-CSFR в ответ на присутствие G-CSF.

Выводы: Экспрессия G-CSFR на различных популяциях Т-клеток носит индуцибельный характер. Присутствие G-CSF в культуральной среде повышает уровень экспрессии G-CSFR на активированных Т-клетках. Полученные данные предполагают значимую роль G-CSF в регуляции адаптивных Т-клеточных реакций, а также формировании иммунной памяти. Среди неактивированных клеток, только некоторые популяции цитотоксических лимфоцитов (CM, EMRA) отвечали повышением экспрессии G-CSFR в присутствии G-CSF.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ МУКОЗАЛЬНЫХ СЕКРЕТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА ДОНОРА

Маркова В.А., Никушкина К.В., Батурина И.Л., Савельева А.А., Логинова Ю.В., Никонова Т.И.

НИИ иммунологии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия

Введение. Нейтрофильные гранулоциты – клетки, представляющие одну из первых линий защиты организма от внедрения патогенов. Это профессиональные охотники за микробами, обладающие самой высокой подвижностью среди всех клеток организма человека. Нейтрофилы являются ключевые клетки врожденной иммунной системы, и оказывают свое действие на объект, вызвавший их активацию, различными способами: выделением наружу бактерицидных продуктов, фагоцитозом или экстракцией во внеклеточное пространство сетей ДНК. Нейтрофил оснащен богатым набором рецепторов, которые позволяют чутко и дифференцированно реагировать на малейшие изменения окружающей среды. Большая часть функционально активных нейтрофилов функционирует в секретах слизистых оболочек, которые первыми подвергаются атаке патогенов.

Целью работы является установление особенностей в функциональном ответе нейтрофильных гранулоцитов мукозальных секретов в зависимости от пола донора.

Материалы и методы. Для оценки функциональной активности нейтрофилов мукозальных секретов проведено исследование, в котором приняло участие 30 практически здоровых небеременных женщин и 30 практически здоровых мужчин. В качестве объекта исследования были выбраны нейтрофильные гранулоциты слизистой полости рта, в связи с этим у всех обследуемых забиралась слюна, у женщин забор производился на 7-10 и 21-

ТАБЛИЦА. ЭКСПРЕССИЯ G-CSFR НА ПОКОЯЩИХСЯ И АКТИВИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ (К ТЕЗИСАМ МАЛАШЕНКО В.В. И ДР.)

| Стимулы | CD4+ Т-клетки | | | | CD8+ Т-клетки | | | |
|------------------|------------------------------------|------------|------------|------------|---------------|------------|------------|------------|
| | Naïve | CM | EM | TEMRA | Naïve | CM | EM | TEMRA |
| | Среднее значение (M±m, %*) *p<0,05 | | | | | | | |
| Среда (контроль) | 0,97 ±0,09 | 1,83 ±0,16 | 0,30 ±0,03 | 0,37 ±0,04 | 0,70 ±0,07 | 0,43 ±0,08 | 0,23 ±0,01 | 0,17 ±0,01 |
| Exp (активация) | 1,97 ±0,05 | 3,07 ±0,14 | 0,60 ±0,04 | 0,70 ±0,05 | 1,93 ±0,07 | 4,40 ±0,32 | 0,40 ±0,02 | 0,47 ±0,01 |
| G-CSF | 0,90 ±0,09 | 1,80 ±0,16 | 0,40 ±0,04 | 0,37 ±0,04 | 0,90 ±0,09 | 1,43 ±0,14 | 0,27 ±0,02 | 0,40 ±0,02 |
| G-CSF+Exp | 2,43 ±0,17 | 4,07 ±0,40 | 0,90 ±0,08 | 0,90 ±0,04 | 1,73 ±0,15 | 1,23 ±0,12 | 0,40 ±0,03 | 0,47 ±0,03 |

23 дни менструального цикла. Оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов слюны проводили с помощью НСТ-теста в модификации Маянского А.Н. и Вискмана М.К. (1979). Изучение способности к фагоцитозу проводили по методу Фрейдлин И.С. (1986). Определение лизосомальной активности нейтрофилов проводили по методу Фрейдлин И.С. (1976). Также определялось количество нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) входящих в состав слюны для этого применялся сложный метод окрашивания с использованием двух красителей: синьки Эванса и Sytox Green (Пат. № 2463349 Способ обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в мукозальных секретах). Полученные результаты исследования подвергнуты статистической обработке с использованием программы Statistica for Windows (v. 8.0). Полученные данные представлены в виде средней арифметической, о достоверности межгрупповых различий судили с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни. Проверка статистических гипотез осуществляли при критическом уровне значимости $p \leq 0,05$.

Основные результаты. При сравнении показателей количества нейтрофильных внеклеточных ловушек, присутствующих в слюне у мужчин и у женщин в разные фазы менструального цикла, было обнаружено, что в состав слюны у мужчин входит 13,4% НВЛ, что достоверно выше количества НВЛ по сравнению с этим показателем у женщин в первую фазу менструального цикла (9,3%) и значимо ниже по отношению к женщинам во вторую фазу менструального цикла (16,1%). При изучении лизосомальной активности нейтрофильных гранулоцитов, входивших в состав секрета слюны, было установлено, что значения этого показателя у мужчин (18,3 у.е.) значимо ниже, чем у женщин не зависимо от фазы менструального цикла (38,1 у.е.). При изучении фагоцитарной функции было установлено, что у мужчин 48% нейтрофильных гранулоцитов активно захватывают чужеродные объекты, что достоверно выше, чем данный показатель у женщин, как в первую, так и у женщин во вторую фазу менструального цикла. Такие же закономерности наблюдаются при оценке как интенсивности фагоцитоза, так и фагоцитарного числа. При оценке кислородзависимого метаболизма нейтрофилов слюны было установлено, что значения и спонтанного, и индуцированного НСТ-теста не зависят от пола обследуемы лиц. В среднем активность спонтанного НСТ-теста была равна 19,5 у.е., а активности индуцированного НСТ-теста принимала значение 34,1 у.е.

Заключение. При исследовании слюны как модели слизистого секрета было установлено, что функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов слизистых секретов, а так же способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек имеет четко выраженные гендерные различия.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРА IL-3 НА Т-ЛИМФОЦИТАХ

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

Центр медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

Введение. Интерлейкин-3 (IL-3, англ.) - гликопротеид, поддерживающий выживание и самоподдержание гемопоэтических стволовых клеток. От также усиливает пролиферацию и дифференцировку детерминированных клеток-предшественников и вовлечен в процесс функциональной активации зрелых лейкоцитов. Показана экспрессия рецептора IL-3 (IL-3R, CD123) на гемопоэтических, эндотелиальных клетках, эозинофилах и нейтрофилах. Вместе с тем, экспрессия IL-3R на Т-лимфоцитах и его роль в регуляции адаптивных иммунных реакций мало исследованы.

Цель исследования. Оценить экспрессию IL-3R на покоеющихся и активированных наивных CD45RA+ Т-клетках и CD45RA- Т-клетках памяти.

Материалы и методы. CD3+ Т-лимфоциты выделяли из МНК 10 здоровых доноров (7 мужчин и 3 женщины) методом магнитной сепарации. Выделенные CD3+ клетки культивировали в бессывороточной среде с частицами, конъюгированными с антителами к CD2, CD3 и CD28 (T-cells activation/expansion kit) или без его в контроле в течение 48 ч. В начале культивирования в часть проб добавляли IL-3. Экспрессию CD45RA и CD123 на прокультивированных клетках оценивали на проточном цитофлуориметре Accuri (BD, США) с использованием моноклональных антител, конъюгированных флуорохромом (Bioscience). Полученные данные представлены в таблице.

Полученные данные указывают на крайне низкую экспрессию IL-3R как на покоеющихся, так и на активированных Т-лимфоцитах. Экспрессия IL-3R существенно не менялась под воздействием IL-3.

Выводы. IL-3 и его рецептор могут не играть значимой роли в регуляции адаптивных Т-клеточных реакций.

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К ИНТЕРЛЕЙКИНУ-8 НА ЛИМФОИДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

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

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

Введение. Интерлейкин-8 (IL-8, англ.) является хемоаттрактантным цитокином, который продуцируется макрофагами, эндотелиальными и эпителиальными клетками. Секретия этого хемокина усиливает миграцию

ТАБЛИЦА. ЭКСПРЕССИЯ IL-3R НА Т-ЛИМФОЦИТАХ,% (К ТЕЗИСАМ МЕЛЬНИКОВА А.Е. И ДР.)

| | Среда | Активатор | IL-3 | Активатор+ IL-3 |
|------------------------------|-------|-----------|------|-----------------|
| CD3+Т-клетки | 0,1% | 0,2% | 0,3% | 0,4% |
| Наивные CD3+CD4RA-Т-клетки | 0,1% | 0,3% | н.д. | н.д. |
| CD3+CD4RA- Т-Т-клетки памяти | 0,1% | 0,1% | н.д. | н.д. |

лейкоцитов в очаг воспаления. Условием выработки IL-8 является активация клеток антигенами, их продуктами, медиаторами воспаления и провоспалительными цитокинами. IL-8 распознается двумя рецепторами, это CXCR1 и CXCR2. CXCR1 является высокоаффинным рецептором и он взаимодействует только с IL-8, тогда как CXCR2 может связывать и другие альфа-хемокины. Основные клетками, экспрессирующие указанные рецепторы являются нейтрофилы, моноциты и лимфоциты. Мало изученной остается экспрессия рецептора к IL-8 на покоящихся и активированных Т-лимфоцитах. Не исследовано влияние IL-8 на мембранную экспрессию его рецептора.

Цель исследования. Изучить экспрессию CXCR1 (CD181) на Т-лимфоцитах разной степени дифференцировки и охарактеризовать влияние на эту экспрессию IL-8.

Материалы и методы. Т-лимфоциты (CD3+) выделяли из мононуклеарных клеток здоровых доноров (5 мужчин и 2 женщин, средний возраст составил 30,5±2,3 года) методом позитивной магнитной сепарации. Выделенные Т-лимфоциты культивировали в бессывороточной среде с частицами, конъюгированными с антителами к CD2, CD3 и CD28 (T cells activation/expansion kit) или без них в течение 48 ч. Мембранную экспрессию CD181, CD197, CD45RA, CD4, CD8 оценивали с помощью моноклональных антител, конъюгированных флуорохромом (E-bioscience) на проточном цитофлуориметре Accuri (BD, США). Экспрессия CXCR1 была исследована на наивных Т-клетках (Na_{ve}), центральных Т-клетках памяти (CM), эффекторных Т-клетках памяти (EM) и терминально дифференцированных Т-клетках (EMRA).

Результаты. Согласно данным, представленным в таблице, CXCR1 может экспрессироваться как на CD4+, так и на CD8+ Т-лимфоцитах. Активация значительно повышала процент клеток, экспрессирующих CXCR1 среди Т-клеток памяти, но не среди наивных и терминально дифференцированных Т-клеток. Присутствие в среде IL-8 статистически значимо стимулировало экспрессию CXCR1 только на терминально дифференцированных Т-клетках.

Выводы. Полученные результаты подтверждают наличие экспрессии на CXCR1 на Т-лимфоцитах. Активация стимулирует экспрессию CXCR1 преимущественно на Т-клетках памяти. IL-8, по-видимому, не играет значимой роли в позитивной регуляции экспрессии CXCR1.

ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ РОСТОВЫЙ ФАКТОР β И ПАТОЛОГИЯ

Москалёв А.В., Рудой А.С., Апчел В.Я.

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

Введение. Дефекты функции TGF- β связаны с множеством патологических состояний и рассматриваются в двух ключевых аспектах. Повышенная сывороточная продукция отмечается в случае прогрессирования роста клеточной опухоли, при фиброзе, артериальной гипертензии, остеопорозе и аутоиммунных болезнях. Пониженная продукция отмечается в случае раннего канцерогенеза, при наследственной геморрагической телеангиоэктазии, репаративных процессах и атеросклерозе. Ранее нами была показана ведущая роль TGF- β в иммунопатогенезе эрозивно-язвенной патологии ЖКТ у лиц с наследственными нарушениями соединительной ткани. Однако при других вариантах патологии роль TGF- β неоднозначна.

Цель исследования. Изучить новые литературные данные молекулярной физиологии трансформирующего фактора- β и его роли в патофизиологии различной патологии

Результаты и их обсуждение. У млекопитающих установлено три изоформы TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3). Эти белки играют важнейшую роль в регуляции роста и развития. Каждая изоформа кодируется своим уникальным геном, расположенным на различных хромосомах. Все эти три фактора роста секретируются большей частью типов клеток, обычно в неактивной форме, и требуют обязательной активации для превращения в биологически активные белки. Было показано, что TGF- β участвует в организации ответов при нейродегенерации, поэтому определение TGF- β целесообразно при мониторинге болезни Альцгеймера, синдроме Дауна, СПИДе, болезни Паркинсона и заболеваниях соединительной ткани. Также определение уровня TGF- β в сыворотке при множественном склерозе имеет большое значение для мониторинга ремиссии и активной фазы заболевания.

TGF- β 1 играет важную роль в процессах метаболизма костного мозга, обсуждается его возможная роль как регулятора остеокласт-остеобластного взаимодействия. Таким образом, он может рассматриваться как маркер при остеопорозе. TGF- β 1 участвует в патогенезе гломерулярных заболеваний, таких как нефропатия при диа-

ТАБЛИЦА. ЭКСПРЕССИЯ CXCR1 НА СУБПОПУЛЯЦИЯХ Т-ЛИМФОЦИТОВ (M±m,%*) (К ТЕЗИСАМ МЕНЯЙЛО М.Е. И ДР.)

| | | Контроль | Активация | IL-8 | Активация+IL-8 |
|-----|-------|----------|-----------|----------|----------------|
| CD4 | Naïve | 2.4±0.25 | 0.8±0.06 | 3.8±1.15 | 2.8±1.08 |
| | CM | 2.4±0.36 | 7.1±1.9 | 2.9±1.1 | 5.1±2.3 |
| | EM | 2.5±0.23 | 7.2±0.84 | 2.0±0.32 | 3.4±0.74 |
| | EMRA | 0.1±0.02 | 2.2±0.19 | 9.1±1.12 | 1.3±0.6 |
| CD8 | Naïve | 1.4±0.14 | 1.6±0.25 | 1.7±0.78 | 0.2±0.34 |
| | CM | 7.1±1.28 | 13.4±1.98 | 5.2±2.47 | 9.4±0.96 |
| | EM | 3.4±0.29 | 10.5±2.5 | 2.4±1.12 | 5.4±1.56 |
| | EMRA | 2.5±0.59 | 2.2±0.86 | 0.3±0.02 | 2.2±0.45 |

*p≤0.05

бете или гломерулосклерозе. Установлена корреляция сывороточного уровня TGF- β 1 с активностью заболевания при аутоиммунном гепатите. Доказано, что TGF- β 1 способствует фиброзным процессам, таким образом, его выявление целесообразно при миелофиброзе и миелоидной метаплазии. Профили циркулирующего в периферической крови TGF- β 1 могут отражать различные стадии иммунопатогенеза солидных опухолей, как это было показано при раке шейки матки.

Повышенный уровень TGF- β 1 выявляется при синдроме хронической усталости, у пациентов при синдроме Гийена-Барре-Штроля, у страдающих тромбоцитопенической пурпурой, что предполагает его участие в гемопоэзе, при раке простаты, мочевого пузыря и печени.

Обратная корреляция уровня TGF- β 1 с активностью заболевания описана при болезни Кавасаки и у пациентов с дефицитом IgA. Снижение уровня TGF- β 1 в сыворотке крови при сепсисе и инсульте может отражать изменение характера иммуно-воспалительного процесса у этих пациентов.

Иммунопатофизиологические эффекты TGF- β 2 связаны с модулированием эмбрионального развития, формированием кости, развитием молочных желез, заживлением ран, гемопоэзом, последовательностью клеточного цикла и синтезом экстрацеллюлярного матрикса. У мышей отсутствие TGF- β 2 сопровождалось перинатальной смертностью, дефектами развития: пороки сердца, легких, лицевой части черепа, конечностей, позвоночника, глаз, внутреннего уха и уrogenитальной сферы. TGF- β 2 - мощный ингибирующий фактор роста уvealных меланоцитов, регулирует пролиферацию постнатальных мозжечковых нейронов и нейробластов. У лабораторных животных TGF- β 2 уменьшает количество половых клеток, активируя апоптоз.

Уровни TGF- β 2 повышены у пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией, с диссеминированной злокачественной меланомой, при болезни Паркинсона.

Таким образом, молекула TGF- β участвует в самых различных иммуно-воспалительных процессах, а оценка его роли в заболеваниях, по-прежнему, нуждается в изучении и систематизации.

ЭКСПРЕССИЯ CD127 НА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ИММУННЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Олейник Е.К., Олейник В.М., Чуров А.В., Жулай Г.А., Кравченко П.Н.

ФГБУН Институт биологии КарНЦ РАН,
Петрозаводск, Россия

Регуляторные Т-клетки (Tregs) контролируют иммунный ответ, предупреждая аутоиммунные заболевания, аллергию и поддерживая пищевую и трансплацентарную толерантность. Эти клетки могут участвовать в индукции иммунной супрессии при опухолевом росте. Пока не установлены специфические поверхностные маркерные молекулы, которые позволяли бы четко различать регуляторные клетки. Поэтому Tregs обычно идентифицируют по экспрессии CD25 и/или внутриклеточной экспрессии транскрипционного фактора FOXP3. В последние годы было показано, что экспрессия CD127 (IL-7R α) находится в обратной зависимости от экспрессии FOXP3. Это послужило основанием считать, что клетки

с фенотипом CD4+CD25+CD127^(low/-) могут отражать содержание Tregs в периферической крови человека. Более того, показано, что определение CD4+CD25+CD127^(low/-), возможно, позволяет исключать не Tег-клетки из пула CD25+лимфоцитов. Целью данной работы было изучение экспрессии CD127 на Tregs в периферической крови больных с ревматоидным артритом (РА), колоректальным раком (КРР), сосудистыми заболеваниями головного мозга (СЗГМ). Материалы и методы. Мы сравнили несколько профилей окрашивания Tregs: CD4+CD25^{hi}, CD4+CD25+FOXP3+, CD4+CD25^{hi}FOXP3+, CD4+CD25^{hi}CD127^(low/-). Исследовали 16 больных РА в возрасте 61,1 \pm 10,5 года (преобладали больные с серопозитивной формой РА и со II-III стадией заболевания по критерию DAS28), 25 больных КРР (I-III стадии) в возрасте 68,8 \pm 9,70 лет, 8 больных СЗГМ с острой фазой заболевания (недавно перенесенный инсульт) и с хронической стадией (дисциркуляторная энцефалопатия -ДЭ) в возрасте 68,7 \pm 15,9 лет. Контрольную группу составили 36 здоровых донора в возрасте 52,2 \pm 14 лет. Фенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500, с применением программного обеспечения CXP 2.0 («Beckman Coulter», США). Были использованы моноклональные антитела: CD4-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7 («Beckman Coulter», Франция), FOXP3-PE (eBioscience, США). Достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна-Уитни при уровне значимости $p < 0,05$, для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Результаты. У пациентов с СЗГМ отмечается рост численности Tregs. В общей группе больных СЗГМ содержание CD4+CD25^{hi}CD127^(low/-)Tregs периферической крови было в полтора раза выше, чем в контрольной группе (3,63 \pm 1,50 и 2,10 \pm 0,62). У пациентов с острой фазой заболевания существенных отличий от контроля по количеству CD4+CD25^{hi}CD127^(low/-)Tregs не наблюдалось, тогда, как при хроническом течении заболевания число таких Tregs оказалось в два раза выше, чем в контроле (4,15 \pm 1,54 и 2,10 \pm 0,62).

У больных КРР количество CD4+CD25^{hi} и CD4+CD25^{hi}CD127^(low/-)Tregs в периферической крови не отличалось от контроля, в то время как содержание CD4+CD25+FOXP3+Tregs у них было выше, чем у здоровых доноров (5,20 \pm 2,4% и 3,46 \pm 1,0% от CD4+ Т-клеток, соответственно, $p < 0,001$). Было выявлена положительная корреляция между содержанием CD4+CD25^{hi}CD127^(low/-) клеток и экспрессией FOXP3 ($r = 0,76$, $p < 0,001$).

У больных РА обнаружено повышенное содержание в крови CD4+CD25^{hi}CD127^(low/-) клеток по сравнению с контролем (2,5 \pm 1,0 и 1,6 \pm 0,9), а число лимфоцитов с фенотипом CD4+CD25+CD127^(low/-) и CD4+CD25+FOXP3+ практически не отличалось от контроля. Следовательно, увеличение содержания CD127^(low/-)-клеток среди CD25^{hi} лимфоцитов (но не среди CD25+) может быть свидетельством того, что при РА CD4+CD25^{hi}CD127^(low/-) клетки представляют более специфичную высоко активированную популяцию Tregs.

Заключение. Таким образом, характер изменений в содержании Tregs с фенотипом CD4+CD25^{hi}CD127^(low/-) у больных РА и СЗГМ, положительная корреляция их с клетками CD4+CD25+FOXP3+ при КРР позволяют предполагать, что эти клетки представляют собой высоко активированную субпопуляцию Tregs в крови человек.

В перспективе динамика численности Tregs с фенотипом CD4+CD25^{hi}CD127^(low/-) может послужить индикатором течения ряда иммунных патологий, в частности, аутоиммунных заболеваний и использоваться как более чувствительный метод диагностики состояния иммунной супрессии.

Работа поддержана грантом РФФИ - № проекта 13-04-98826, Грантом Президента РФ № МК-3680.2015.7.

НОВАЯ ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА

Порываева В.А., Агафонова О.А., Марченко А.К.,
Соболева Н.В., Сорокина Н.Н., Вторушина И.А.,
Рукавишников М.Ю.

ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово Новосибирской
области, Россия

Определение количества тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови является ключевой ступенью алгоритма диагностики нарушений функции щитовидной железы.

Цель нашей работы – получение новой коллекции мышиных гибридом, продуцентов антител (АТ) к тиреотропному гормону человека, исследование полученной панели антител с точки зрения эпитопной специфичности и пригодности в диагностике.

Методы. Для иммунизации мышей линии BALB/c и скрининга позитивных гибридом использовали коммерческий очищенный природный ТТГ. Схема иммунизации представляла собой 2-кратное введение по 10-100 мкг ТТГ сначала с полным, а потом с неполным адъювантом Фрейнда, бустерные дозы составляли 25-150 мкг на инъекцию. В результате 4-х слияний спленоцитов с клетками миеломы NS-1 получили коллекцию из 106 гибридом с синтезом АТ к ТТГ.

Результаты. Полученную нами панель гибридомных антител для уточнения специфичности исследовали на реактивность с 3-мя другими гликопротеидными гормонами: лютеинизирующим гормоном (ЛГ), фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ) и хорионическим гонадотропным гормоном (ХГЧ) – и разделили на 2 группы. АТ первой группы реагировали только с ТТГ, но не с ЛГ, ФСГ и ХГЧ, что позволило заключить, что они специфичны к β -субъединице ТТГ. Ко второй группе отнесли АТ, которые реагировали со всеми исследованными гормонами и, следовательно, связывались с общей для них α -субъединицей. Критериями отбора для дальнейшей работы была специфичность антител к β -субъединице ТТГ с высоким индексом аффинности. Выбрали также и несколько гибридом с синтезом АТ к α -субъединице. Сответствующие гибридомы клонировали методом лимитирующих разведений, для них были получены асцитные препараты моноклональных антител (МоАТ), из очищенных МоАТ синтезировали пероксидазные конъюгаты и полученные препараты исследовали в качестве компонентов «сэндвич»-варианта ИФА для определения ТТГ. Методом конкурентного ИФА мы показали наличие 4-х неперекрывающихся антигенных детерминант (АГД) на β -субъединице ТТГ и 2-х - на α -субъединице. Мы обозначили их АГД- α (1-2) и АГД- β -ТТГ (1-4). Нами выявлено, что АГД- α -1 и АГД- β -ТТГ-1 расположены на молекуле ТТГ в непосредственной близости. Это следовало из того, что МоАТ, реагирующие с АГД- α -1, ингибировали

ли связывание с ТТГ пероксидазных конъюгатов МоАТ, специфичных к АГД- β -ТТГ-1. По такому же критерию установили близость расположения на молекуле ТТГ АГД- α -2 и АГД- β -ТТГ-2. Наличие в нашей панели МоАТ к разным неперекрывающимся АГД на молекуле ТТГ позволило осуществить подбор пар МоАТ (одно из них – сорбированное в лунки планшетов, другое – в виде пероксидазного конъюгата) для «сэндвич»-варианта ИФА при количественном определении ТТГ.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (МКАТ) К ЭНДОГЛИНУ

Смирнов И.В.^{1,2}, Грязева И.В.², Самойлович М.П.²,
Терехина Л.А.², Пиневиц А.А.², Кривоносова А.А.²,
Крутецкая И.Ю.², Климович В.В.², Никольский
Н.Н.¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
Россия

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

Эндоглин (CD105) – компонент рецепторного комплекса, связывающего ростовые факторы TGF- β , BMP-9 и BMP-10, экспрессирован преимущественно на мезенхимных стволовых, эндотелиальных и гладкомышечных клетках. Его экспрессия значительно возрастает в сосудах ишемизированных тканей и растущих опухолей. Повышение концентрации эндоглина в сыворотке и моче имеет прогностическое значение при ряде онкологических заболеваний, а также для ранней диагностики преэклампсии у беременных женщин. Выявление локальной экспрессии эндоглина при иммуногистохимических исследованиях биоптатного материала позволяет специфично дифференцировать сосудистые сети опухолей и нормальных тканей. Иммунохимические методы выявления эндоглина основаны на использовании МКАТ. Другой перспективной областью применения МКАТ к эндоглину является анти-ангиогенная терапия онкологических заболеваний. Для этого нужны МКАТ, блокирующие связывание ростовых факторов с эндотелием. Согласно опубликованным данным, эпитопы эндоглина, ответственные за передачу ангиогенных сигналов, являются низко иммуногенными для мышей линии BALB/c, что ограничивает возможности использования получаемых МКАТ.

Цель работы состояла в создании нового семейства гибридом-продуцентов МКАТ, которые обеспечивали бы выявление эндоглина на клеточных мембранах и в образцах биологических жидкостей.

Донорами иммунных спленоцитов были мыши F1 (SJL/JxBALB/c), отличающиеся своеобразием репертуара иммунного ответа. Иммуногеном служил рекомбинантный экстраклеточный домен эндоглина, синтезированный в клетках мышечной миеломы NS0 (R&D Systems). Для скрининга гибридом и характеристики продуцируемых МКАТ использовали рекомбинантные бактериальные аналоги антигена, а также первичные и перевиваемые адгезионные клеточные культуры человека: МСК, НЕР G2, ECV304, A172, T98G, HEK293.

В работе получено 11 новых МКАТ, распознающих не менее 9 отдельных эпитопов на молекуле эндоглина. На их основе разработана система двуцентрового ИФА, позволяющая определять концентрацию свободного эн-

долина в биологических жидкостях. Два полученных МКАТ специфичны к линейным эпитомам полипептидной цепи и способны выявлять эндоглин в биологическом материале методом вестерн-блоттинга. Восемь МКАТ взаимодействуют с мембранной формой эндоглина, экспрессированной на клетках различного происхождения, что подтверждено с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Предварительный анализ специфичности этих МКАТ позволяет заключить, что они охватывают как минимум семь уникальных эпитопов антигена на мембране. Это открывает возможность для изучения их биологической активности в отношении клеток сосудистого эндотелия человека.

Таким образом, в результате иммунизации эндоглином мышей F1 (SJL/J×BALB/c), скрининга гибридом на рекомбинантных антигенах и на клеточных линиях, получено новое семейство МКАТ против эндоглина, распознающих не менее 9 отдельных эпитопов и содержащих реагенты, обеспечивающие выявление эндоглина на клеточных мембранах и в образцах биологических жидкостей.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА VSV-РЕПЛИКОНОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ИНДУКЦИИ ИФН I ТИПА В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

**Фельдшерова А.А., Соколова М.В., Коноплева М.В.,
Суслов А.П.**

*ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,
Москва, Россия*

В настоящее время для анализа препаратов ИФН в европейской фармакопее рекомендовано применение традиционного цитопатического теста (ЦПТ) на культурах клеток А549 или WICH с использованием тест-вируса ВВС (вирус везикулярного стоматита) или ВЭММ (вирус энцефаломиокардита мышей). Этот метод является трудоемким, длительным и сопряжен с рисками инфицирования. В мире сейчас активно внедряются и используются другие методы, наиболее актуальным из которых является ген-репортерный метод, принципиально отличающийся от ЦПТ. В Швейцарии был разработан метод

VSV-репликонов, по сути, являющийся аналогом ЦПТ, но намного превышающем его по чувствительности, скорости исполнения, безопасности, воспроизводимости и динамическому диапазону. Оба этих метода (ген-репортерный и VSV-репликонов) являются количественными и более быстрыми, по сравнению с ЦПТ. До сих пор они были валидированы для оценки качества готовых препаратов ИФН. В то же время в области фармацевтики актуальной является задача разработки иммуномодулирующих препаратов, в частности, препаратов с ИФН-индуцирующей способностью.

Целью данной работы являлась проверка возможности применения VSV-репликонов для детекции ИФН, индуцированного в клетках крови человека и разработанной ответственной системы контролей, а также сравнение эффективности метода VSV-репликонов относительно методов ЦПТ и ген-репортерного анализа.

Была показана способность метода VSV-репликонов выявлять ИФН, индуцированный в культуре клеток периферической крови человека с помощью стандартных индукторов ФГА и Poly(I:C). В присутствии ИФН VSV-репликоны (рекомбинантные комплементированные репликоновые частицы VSV*deltaG(Luc)), способные только к однократному заражению клеток-мишеней, не размножались. Регистрация зеленой флуоресценции зараженных клеток (репортер – GFP) и измерение относительных световых единиц при проведении люциферазной реакции позволили дать качественную оценку эффективности трансфекции VSV-репликонами и количественную оценку содержания ИФН в пробе (EC50 по стандарту ИФН составляла 0,07 МЕ/мл). Кроме того, была разработана система контролей, позволяющая четко контролировать индукцию ИФН клетками крови человека под воздействием различных препаратов.

Показано, что данный методический подход позволяет проводить более быстрое, чувствительное и количественное тестирование индуцированного ИФН в широком динамическом диапазоне по сравнению с ЦПТ и ген-репортерным анализом.

Разработанная методология может быть предложена для оценки ИФН-индуцирующей способности фармацевтических препаратов.