

ISSN 1563-0625 (print)
ISSN 2313-741X (online)

Том 17, № 1. С. 1- 102

2015

Официальный журнал
Санкт-Петербургского Регионального Отделения
Российской Ассоциации
Аллергологов и Клинических Иммунологов

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

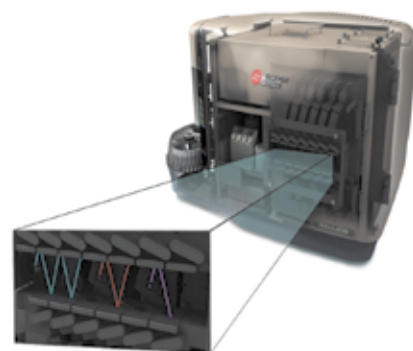
Gallios – совершенный проточный цитофлуориметр для научных исследований

Gallios решает исследовательские задачи в медицине, биологии, фармакологии и любой другой, когда необходима проточная цитофлуориметрия. Примеры решаемых задач:

- идентификация популяций клеток со специфическими поверхностными и внутриклеточными маркерами.
- исследование митотического цикла и пloidности клеток.
- анализ программируемой клеточной гибели (апоптоз).
- оценка эффективности трансфекции клеток и многое другое.



GALLIOS



- скорость до **25 000** событий в секунду
- до **четырёх** твердотельных лазеров на борту: 488, 638, 405 и 561 нм
- регистрация до **10** параметров флуоресценции
- чувствительность по размеру от **0,404 мкм***

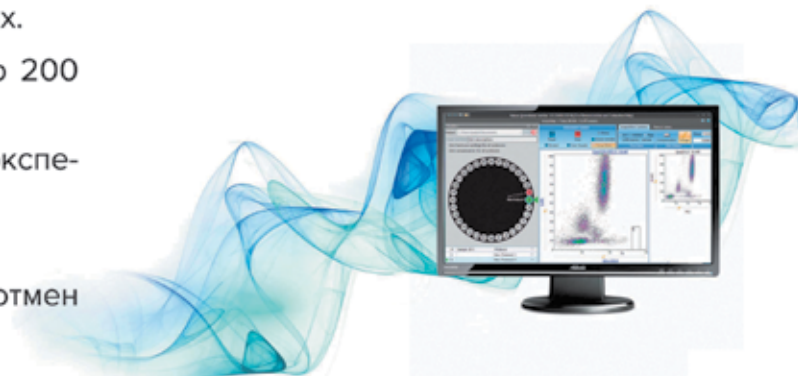
* позвоните и мы расскажем, как измерять частицы размером в 200 нм цитометром Gallios



KALUZA

Kaluza для Gallios – оцените экономию времени и гибкость анализа с программным обеспечением для обработки данных и проведения эксперимента

- интуитивный интерфейс.
- быстрая компенсация.
- высокая скорость обработки данных.
- работа с огромными файлами – до 200 млн. событий.
- создание и настройка протокола эксперимента offline.
- симулятор цитометра.
- неограниченное количество отмен действий.



САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
РОССИЙСКОЙ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕРГОЛОГОВ И КЛИНИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГОВ
(СПб РО РААКИ)

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

январь-февраль

2015, том 17

№ 1

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

Фрейдлин Ирина Соломоновна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, руководитель отдела иммунологии НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

Горячкина Людмила Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической аллергологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кетлинский Сергей Александрович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Климович Владимир Борисович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории гибридной технологии Российского научного центра радиологии и хирургических технологий Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор НИИ клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, руководитель отдела общей патологии и патологической физиологии НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Мазуров Вадим Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, проректор по лечебной работе Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава России, заведующий кафедрой терапии и ревматологии имени Э.Э. Эйхвальда, Санкт-Петербург, Россия

Назаров Петр Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории общей иммунологии отдела иммунологии НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spb.aaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

Электронная версия: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г.

Свидетельство о регистрации № П 3612.

Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций 30 июня 2003 г.

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64, 328-18-68.

Подписано в печать 21.01.2015 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 12,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1012

Напечатано в ООО «ИПК Береста».

196084, Россия, Санкт-Петербург, ул. Коли Томчака, 28.

Тел.: (812) 388-90-00

С 2001 г. журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

С 2014 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу Ulrich's Periodicals Directory

Недоспасов Сергей Артурович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой иммунологии МГУ им. М.В. Ломоносова и заведующий отделом молекулярной иммунологии в Институте физико-химической биологии им. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунодиагностики и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Симбирцев Андрей Семенович – доктор медицинских наук, профессор, директор Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов Вячеслав Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Хаитов Рахим Мусаевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, директор ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Черных Елена Рэмовна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Новосибирск, Россия

Редакционный совет

Ласунская Елена – доктор медицинских наук, профессор, Государственный университет Северной Флуминенсе, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

Мароди Ласло – доктор медицинских наук, профессор, Университет Дебрецена, Медицинский научный центр, Отдел инфекционной и педиатрической иммунологии, Дебрецен, Венгрия

Михалеk Ярослав – доктор медицинских наук, Университет города Брно, заведующий кафедрой фармакологии медицинского факультета, Брно, Чехия

Роггенбук Дирк – доктор медицинских наук, профессор, Университет Лауциц «University of Applied Sciences», Зенфтенберг, Германия

Сеонг Сеунг-Йонг – доктор медицинских наук, Национальный Университет, руководитель кафедры микробиологии и иммунологии, Сеул, Корея

Тендлер Евгений – доктор медицинских наук, Медицинский центр Рамбам, Отдел клинической биохимии, Хайфа, Израиль

Фейст Евгений – доктор медицинских наук, Университет Гумбольдта, клиника «Шаритэ», руководитель отделения ревматологии и клинической иммунологии, Берлин, Германия

Халдоуниди Софья – доктор медицинских наук, профессор, Институт молекулярных исследований, Сан-Диего, Калифорния, США

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

January-February

2015, volume 17

No. 1

Published since March 1999

Editor-in-Chief

Irina S. Freidlin – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief, St. Petersburg, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Deputy-director on Science, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, Chief, St. Petersburg, Russia

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russia

Kirill P. Kashkin – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Immunology, chief, Moscow, Russia

Sergei A. Ketlinskij – PhD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Deputy-director on Science, St. Petersburg, Russia

Vladimir B. Klimovich – PhD, MD, Professor, Russian Center of Radiology and Surgery Technologies, Laboratory of Hybridoma technology, chief, St. Petersburg, Russia

Vladimir A. Kozlov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Clinical Immunology, Director, Novosibirsk, Russia

Elena A. Korneva – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief, St. Petersburg, Russia

Vadim I. Mazurov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Nord-Western State Medical University, Vice Rector for Clinical Affairs, Department of Therapy and Rheumatology, Chief, St. Petersburg, Russia

Petr G. Nazarov – PhD, MD, Professor, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Laboratory of Fundamental Immunology, Chief, St. Petersburg, Russia

Sergei A. Nedospasov – PhD, Professor, RAS corresponding member, Lomonosov State University, Department of Immunology, chief; Institute of Physico-Chemical Biology, Belozersky, Department of Molecular Immunology, Chief, Moscow, Russia

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

Editorial Office: phone/fax +7 812 233-08-58

Address for correspondence:

197136, St. Petersburg, P.O. Box 58.

Electronic version: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western Regional Administration for the Press Affairs of the Russian Federation, March 26, 1999. Certificate of registration PI № 77-15892 by the Ministry of Press, Television, Broadcasting and Mass media of the Russian Federation, June 30, 2003.

Chelovek Publishing House

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyi persp. Vassilievsky Island, 26, office 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

Phone/fax: (812) 325-25-64, 328-18-68.

Passed for printing 21.01.2015. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 12,75. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Produced at the IPK Beresta Printing House.

196084, Russian Federation, St. Petersburg, Kolya Tomchak str., 28.

Phone: (812) 388-90-00

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnostics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russia (ORCID, ResearcherID)

Andrei S. Simbirtsev – PhD, MD, Professor, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Director, St. Petersburg, Russia

Viacheslav S. Smirnov – PhD, MD, Professor, “Cytomed” Ltd., Director on Science, St. Petersburg, Russia

Rahim M. Khaitov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Director, Moscow, Russia

Elena R. Chernykh – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Clinical Immunology, Deputy-director on Science, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Chief, Novosibirsk, Russia

Editorial Council

Eugen Feist – PD, MD, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Free University and Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Sophia Khaldoyanidi – PhD, MD, Associate Member, Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

Elena Lasunskaja – PhD, MD, Associated Professor, Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

László Maródi – PhD, MD, Professor, Department of Infectious and Pediatric Immunology, University of Debrecen Medical and Health Science Centre, Debrecen, Hungary

Jaroslav Michálek – PhD., MD, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Dirk Roggenbuck – PhD, MD, Professor, Lausitz University of Applied Sciences, Senftenberg, Germany

Seung-Yong Seong – PhD, MD, Seoul National University, Associate Dean for Planning, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

Yevgeny Tendler – PhD, MD, Department of Clinical Biochemistry, Rambam Medical Center, Haifa, Israel

Since 2001, the Medical Immunology Journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific Journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science

Since 2014 the Medical Immunology Journal is included into international Ulrich's Periodicals Directory database

И.Г. Вена®

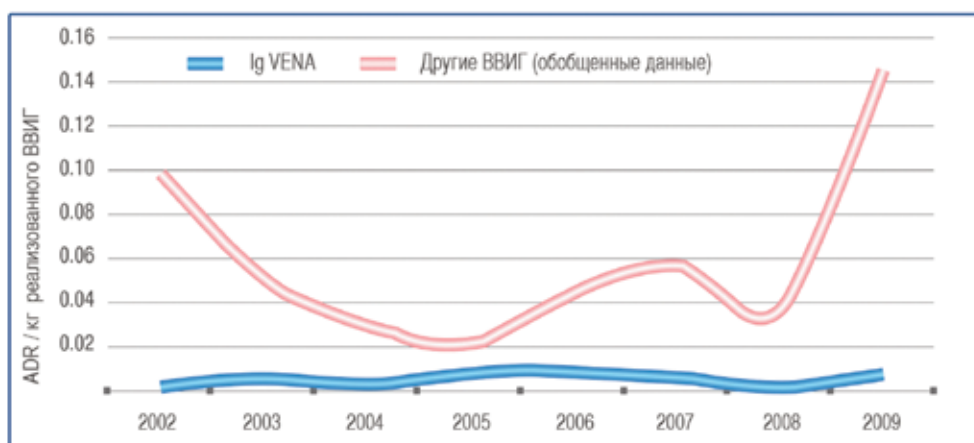
И.Г. Вена® (иммуноглобулин человека нормальный, раствор для инфузий) - препарат компании Кедрион с высоким профилем эффективности, безопасности и переносимости, предназначенный для внутривенного введения.

УЛУЧШЕННЫЙ ПРОФИЛЬ ПЕРЕНОСИМОСТИ

Исследование Dellepiane 2010.

Оценка переносимости и безопасности препарата И.Г.Вена в ходе стандартной клинической практики проводилась Dellepiane в 2010.

Динамика изменения во времени показателя ADR/кг ВВИГ, реализованного в Италии в течение 2002 – 2009 годов (из работы Dellepiane 2010)



Относительный показатель количества зарегистрированных за год в Италии НС для **И.Г. Вена®** всегда ниже, чем аналогичный показатель для всех остальных ВВИГ, реализуемых в Италии. За этот же период наблюдения не сообщалось ни об одном случае тромбоэмболического осложнения при использовании **И.Г. Вена®**.

KEDRION
B I O P H A R M A

Представительство Кедрион С.п.А. Россия 115230, г. Москва, Варшавское шоссе, д 47, к. 4.
Тел.: +7 495 787 87 54 e-mail: s.petrova@kedrion.com

ООО МЕДИПАЛ-ОНКО - официальный дистрибьютор компании KEDRION S.p.A. (Кедрион) на территории Российской Федерации www.medipal-onko.ru



ГАМУНЕКС® - ОПТИМАЛЬНЫЙ ВЫБОР ПРИ ТЕРАПИИ ВНУТРИВЕННЫМИ ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ



Высокая концентрация IgG в препарате Гамунекс® позволяет снизить гемодинамическую нагрузку в 2 раза по сравнению с 5% внутривенными иммуноглобулинами²



Гамунекс® обладает оптимальными свойствами, что позволяет проводить безопасную терапию даже у пациентов с сопутствующими заболеваниями^{2,4}



Гамунекс® значительно снижает частоту возникновения инфекций у пациентов с первичным иммунодефицитом⁵



Гамунекс® обеспечивает быстрое повышение уровня тромбоцитов и его длительное сохранение в пределах нормы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой⁶



Гамунекс® обеспечивает выраженный и длительный клинический эффект при терапии хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии³

Литература: 1. Государственный реестр лекарственных средств 2014; 2. Инструкция по медицинскому применению препарата Гамунекс. ЛСР-002531/08 04.04.2008; 3. Hughes RAC, Donofrio P, Bril V, et al. Intravenous immune globulin (10% caprylate/chromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ICE study): a randomized Placebo-controlled trial. Lancet Neurol.2008; 4. Data on file. Talecris Biotherapeutics inc.; 5. Roifman CM, Schroeder H, Berger M, et al, and the IGIV-C in PID Study Group. Comparison of the efficacy of IGIV-C, 10% (caprylate/chromatography) and IGIV-C, 10% replacement therapy in primary immune deficiency: a randomized double-blind trial. Int Immunopharmacol. 2003;3:1325-1333; 6. Bussel JB, Eldor A, Kelton JG, et al, and the IGIV-C in ITP Study Group. IGIV-C, a novel intravenous immunoglobulin: evaluation of safety, efficacy, mechanisms of action, and impact on quality of life. Thromb Haemost. 2004;91:771-778.



Р-ФАРМ
Инновационные
технологии
здоровья

GRIFOLS

ЗАО «Р-Фарм», 123317, Москва
ул. Тестовская, дом 10
тел: +7-495-956-79-37
факс: +7-495-956-79-38

Доказано наукой. Подтверждено пациентами.

гамунекс®



иммуноглобулин человека
нормальный 100 мг/мл

Детекция РНК в живых клетках

Оставьте сложность и неопределенность привычным методам – совершите прорыв в геномике и клеточной биологии с зондами SmartFlare™

- Определение нативной РНК в живых клетках
- Отсутствие пробоподготовки
- Отсутствие токсичности
- Открытая платформа детекции

Проникновение, связывание, флюоресценция, элиминация



таблетки 1 мг и 10 мг

Ликопид®

Современная иммунотерапия

Применяется в комплексной терапии заболеваний, сопровождающихся вторичным иммунодефицитом:

- ✕ РЕЦИДИВИРУЮЩИЕ ИНФЕКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ
- ✕ ТУБЕРКУЛЕЗ
- ✕ ГЕРПЕСВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ
- ✕ ГНОЙНО - ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ
- ✕ ПСОРИАЗ



СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные статьи

Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Соколова З.А., Ершов Ф.И.

АКТИВАЦИЯ ГЕНОВ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ИММУНИТЕТА: РАЗЛИЧНАЯ ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА К ПРЕПАРАТАМ ИНТЕРФЕРОНОВ И ИНДУКТОРОВ IFN 7

Кудрявцев И.В., Субботовская А.И.

ОПЫТ ИЗМЕРЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОГО СТАТУСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШЕСТИЦВЕТНОГО ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА..... 19

Матвеева Л.В.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОБОСТРЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГАСТРИТА 27

Зурочка А.В., Давыдова Е.В.

ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СПЕКТРА Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У ВЕТЕРАНОВ СОВРЕМЕННЫХ ВОЙН 33

Синельникова Н.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА И АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ.... 39

Шаленкова М.А., Михайлова З.Д., Клишкин П.Ф., Манюкова Э.Т.

УРОВНИ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ 6 И 10 В КРОВИ И МАРКЕРЫ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК В КРОВИ И МОЧЕ ПРИ ОСТРОМ КОРОНАРНОМ СИНДРОМЕ..... 47

Зорина В.Н., Маклакова Т.П., Шелель Т.Т., Бойко О.Н., Зорина Р.М., Зорин Н.А.

КОНЦЕНТРАЦИИ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ, ЦИТОКИНОВ И АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ДИФУЗНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ЗОБЕ..... 53

Найхин А.Н., Доница С.А., Лосев И.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Стукова М.А., Ерофеева М.К., Коншина О.С., Смолоногина Т.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г.

ГОМОЛОГИЧНЫЙ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ И Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ЛЮДЕЙ НА ЖИВЫЕ РЕАССОРТАНТНЫЕ ГРИППОЗНЫЕ ВАКЦИНЫ А(Н5N2) И А(Н7N3)..... 59

Краткие сообщения

Минеев В.Н., Нёма М.А., Сорокина Л.Н.

ЭКСПРЕССИЯ мРНК ФЕРМЕНТА AID В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ..... 71

Скорняков С.Н., Сабадаш Е.В., Медвинский И.Д., Новиков Б.И., Павлов В.А.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ БАЛАНС ПЛАЗМЫ КРОВИ И МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ КАК ФАКТОР, ОТРАЖАЮЩИЙ ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРОЦЕССА..... 75

Манюкова Э.Т., Шаленкова М.А., Михайлова З.Д.

МОДЕЛЬ «CVSACS» ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ КАРДИОВАСКУЛЯРНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ В ГОСПИТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА 81

Ширинский И.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННОГО ОСТЕОАРТРИТА..... 87

Базарный В.В., Михайлова Е.Ю., Парылова Е.А.

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ К АСИАЛОГЛИКОПРОТЕИНЫМ РЕЦЕПТОРАМ В ДИАГНОСТИКЕ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ 93

Юбилей 97

Правила для авторов 99

Авторский указатель 102

Предметный указатель 102

CONTENTS

Original articles

Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Sokolova Z.A., Ershov F.I.

ACTIVATION OF GENES CONTROLLING THE IMMUNE SIGNALING PATHWAYS: DIFFERENTIAL INDIVIDUAL SENSITIVITY OF HUMAN BLOOD CELLS FOR INTERFERON PREPARATIONS AND IFN INDUCERS..... 7

Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I.

APPLICATION OF SIX-COLOR FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS FOR IMMUNE PROFILE MONITORING..... 19

Matveeva L.V.

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE AMONG MAJOR LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS FROM PERIPHERAL BLOOD DURING EXACERBATION OF CHRONIC GASTRITIS..... 27

Zurochka A.V., Davydova E.V.

CYTOMETRIC ANALYSIS OF THE SPECTRUM SUBPOPULATION OF T LYMPHOCYTES IN THE EARLY FORMS OF CHRONIC BRAIN ISCHEMIA VETERANS OF MODERN WARS 33

Sinelnikova N.A., Bychkova N.V., Kalinina N.M.

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE AND BASOPHIL ACTIVATION IN CHILDREN WITH CHRONIC URTICARIA..... 39

Shalenkova M.A., Mikhailova Z.D., Klimkin P.F., Manyukova E.T.

BLOOD LEVELS OF INTERLEUKIN-6 AND INTERLEUKIN-10 IN SERUM AND BIOMARKERS OF ACUTE KIDNEY INJURY IN ACUTE CORONARY SYNDROME 47

Zorina V.N., Maklakova T.P., Sheppel T.T., Boyko O.N., Zorina R.M., Zorin N.A.

CONTENTS OF THYROID HORMONES, CYTOKINES AND α 2-MACROGLOBULIN IN BLOOD SERA AND IN CULTURE SUPERNATES OF BLOOD CELLS FROM THE GRAVES DISEASE PATIENTS 53

Naykhin A.N., Donina S.A., Losev I.V., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Stukova M.A., Erofeeva M.K., Konshina O.S., Smolonogina T.A., Doroshenko E.M., Grigorieva E.P., Rudenko L.G.

HOMOLOGICAL AND HETEROLOGICAL ANTIBODY AND T CELL IMMUNE RESPONSES TO LIVE ATTENUATED INFLUENZA VACCINE A (H5N2) AND A (H7N3)..... 59

Short communications

Mineev V.N., Nyoma M.A., Sorokina L.N.

EXPRESSION OF AID-SPECIFIC mRNA IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN BRONCHIAL ASTHMA 71

Skorniakov S.N., Sabadash E.V., Medvinsky I.D., Novikov B.I., Pavlov V.A.

AMINO ACID BALANCE PLASMA AND MONOCYTES IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS AS A FACTOR, REFLECTS THE SEVERITY OF DEVELOPMENT OF TUBERCULOSIS 75

Manyukova E.T., Shalenkova M.A., Mikhailova Z.D.

"CVCACS" MODEL FOR PREDICTION OF CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS IN HOSPITALIZED PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME 81

Shirinsky I.V., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky V.S.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DIABETES-ASSOCIATED OSTEOARTHRITIS..... 87

Bazarnyi V.V., Mikhailova E.Yu., Partylova E.A.

CLINICAL DIAGNOSTIC VALUE OF AUTOANTIBODIES IN THE DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE LIVER DISEASES..... 93

Anniversary 97

Instructions to Authors 99

Author index 102

Subject index..... 102

АКТИВАЦИЯ ГЕНОВ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ИММУНИТЕТА: РАЗЛИЧНАЯ ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА К ПРЕПАРАТАМ ИНТЕРФЕРОНОВ И ИНДУКТОРОВ IFN

Соколова Т.М.¹, Шувалов А.Н.¹, Шаповал И.М.¹, Соколова З.А.²,
Ершов Ф.И.¹

¹ ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

² ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

Резюме. Исследовали дозовые эффекты препаратов Генфаксон (бета1-IFN), Циклоферон и Иммуномакс (индукторы IFN) на экспрессию 6 генов сигнальных путей иммунитета (TLR3, TLR4, RIG1, IRF3, IPS, B2M) в клетках крови 3-х разных людей методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Обнаружено, что доноры имеют различную чувствительность к исследованным препаратам, возможно, обусловленную конститутивными уровнями активности генов TLR3 и TLR4 и связанную с их иммунной патологией. Генфаксон в дозе 10⁴ МЕ давал сильную стимуляцию экспрессии генов TLR3, TLR4, IRF3 и B2M у двух людей, Иммуномакс в дозе 0,5 единиц имел такие же эффекты только у одного мужчины (с инфекцией вирусом Эпштейна—Барр). Циклоферон стимулировал генную экспрессию значительно слабее у всех доноров. Мы показали обратную корреляцию чувствительности клеток человека к препарату Иммуномакс от конститутивных уровней активности TLR3 и TLR4 генов. Стимулирующие эффекты Иммуномакса были максимальными у человека с очень низкими TLR3/4 генными уровнями. Иммуномакс стимулировал гены нескольких сигнальных путей, включая TLR3, TLR4, но RIG1/IPS генные пути были активированы сильнее. Циклоферон индуцировал генную транскрипцию факторов IRF3 и B2M лучше, чем TLR3, TLR4. Таким образом, наши данные подтверждают IFN-индуцирующие свойства препаратов Генфаксон, Иммуномакс и Циклоферон в клетках крови человека. Тестирование экспрессии генов сигнальных путей иммунитета методом ОТ-ПЦР в реальном времени позволит быстро и с высокой специфичностью оценивать активности препаратов IFN и индукторов IFN без использования биологического метода клеточных культур.

Ключевые слова: индукторы-IFN, сигнальные иммунные гены, клетки крови

Адрес для переписки:

Соколова Татьяна Михайловна
ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (499) 193-43-19.
Факс: 8 (499) 193-61-83.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Address for correspondence:

Sokolova Tatiana M.
Federal State Budgetary Institution "N.F. Gamaleya Federal
Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian
Ministry of Health Care
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18.
Phone: 7 (499) 193-43-19.
Fax: 7 (499) 193-61-83.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Образец цитирования:

Т.М. Соколова, А.Н. Шувалов, И.М. Шаповал, З.А. Соколова,
Ф.И. Ершов, «Активация генов сигнальных путей
иммунитета: различная индивидуальная чувствительность
клеток крови человека к препаратам интерферонов
и индукторов IFN» // Медицинская иммунология, 2015, Т. 17,
№ 1. С. 7-18.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-7-18
© Соколова Т.М. и соавт., 2015

For citation:

T.M. Sokolova, A.N. Shuvalov, I.M. Shapoval, Z.A. Sokolova,
F.I. Ershov, "Activation of genes controlling the immune signaling
pathways: differential individual sensitivity of human blood cells for
interferon preparations and IFN inducers",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2015, Vol. 17, no. 1, pp. 7-18.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-7-18
DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-7-18

ACTIVATION OF GENES CONTROLLING THE IMMUNE SIGNALING PATHWAYS: DIFFERENTIAL INDIVIDUAL SENSITIVITY OF HUMAN BLOOD CELLS FOR INTERFERON PREPARATIONS AND IFN INDUCERS

Sokolova T.M.^a, Shuvalov A.N.^a, Shapoval I.M.^a, Sokolova Z.A.^b, Ershov F.I.^a

^a FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Russian Ministry of Health Care", Moscow, Russian Federation

^b FSBSI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Moscow, Russian Federation

Abstract. We have studied dose effects of several Interferon (IFN) inducers, i.e., Genfaxon (beta-1 IFN), Cycloferon and Immunomax upon expression of six genes controlling the signaling in immune pathways (TLR3, TLR4, RIG1, IRF3, IPS, B2M), by means of real-time RT-PCR, being tested with blood cells from three humans. It is revealed that individual cell samples showed different sensitivity to these drugs, probably, due to constitutive levels of TLR3 and TLR4 gene expression and possible connections with their immune pathology. Genfaxon at a dose of 10^4 ME produced potent stimulation of TLR3, TLR4, IRF3 and B2M genes in two persons. Immunomax, at a dose 0,5 unit, exhibited same effect in one case only (with Epstein-Barr virus infection). Cycloferon stimulated gene expression at much lower levels than Genfaxon in any cases. We have shown a reverse correlation between sensitivity of the cells to Immunomax, and constitutive TLR3 and TLR4 expression. The stimulatory effects of Immunomax were maximal in a person with very low TLR3/4 gene expression. Immunomax boosted the genes from several signaling pathways, including TLR3, TLR4, but genes of RIG/IPS pathway showed higher activation. Cycloferon induced gene transcription of IRF3 and B2M-receptor to higher degree, than expression of TLR3 and TLR4 genes. Hence, our data concerning Genfaxon, Immunomax and Cycloferon confirm their IFN-inducing effects upon human blood cells. The RT-PCR-based evaluation of gene expression related to signaling immune pathways in blood cell populations will enable rapid and highly specific quantitation of IFN and IFN-inducer drugs activities, thus avoiding their biological testing in long-term cell cultures.

Keywords: IFN-inducers, immune signaling genes, blood cells

Введение

Сигнальные реакции иммунного ответа начинаются с рецепторов врожденного иммунитета, расположенных на мембране, в эндосомах клеток (TLRs) и локализованных в цитоплазме RLRs и NRLs [8, 23, 24]. Интерфероны (IFN) типа I стимулируют экспрессию TLRs рецепторов [25, 29]. Эндосомальный рецептор TLR3 узнает двуспиральные РНК (дсРНК) и играет важную роль в антивирусной защите клеток от вирусов. Мембранный рецептор TLR4 реагирует на липополисахариды бактерий, глюкозаминогликаны и компоненты оболочки вирусов. Адаптором TLR3 является белок TRIF, передающий сигнал на гены IFN типа 1. В TLR4 сигнальных путях

участвует белок MyD88, но также может быть включен и белок TRIF [16]. Рецептор RIG1 узнает в цитоплазме короткие дсРНК и 5'-фосфорилированные РНК (5'-pppРНК) и передает сигнал на митохондриальный адапторный белок IPS (также известный как MAVS и VISA). Таким образом, сигнальные TLR3/4 и RIG1 пути имеют общий результирующий этап — активация фактора транскрипции IRF3 и его взаимодействие с промотором гена бета-IFN [24]. Образовавшийся IFN индуцирует каскад STAT1/2-IRF9 сигналов активации множества IFN-зависимых генов [27, 28]. Среди них группа иммунорегуляторных цитокинов и бета-2-микроглобулин (B2M) — корецептор активированных Т-лимфоцитов. В комплексе с белками главного комплекса ги-

стосовместимости В2М обеспечивает специфическое узнавание антигенов и усиливает синтез специфических антител (гуморальный ответ В-лимфоцитов) [21, 22].

Индивидуальная чувствительность к препаратам IFN и их индукторам представляет серьезную медицинскую проблему. Причины различий в индивидуальном ответе людей на лекарства в большинстве случаев остаются неизвестными. Исследованные нами фармпрепараты Генфаксон (бета1-IFN), Иммуномакс и Циклоферон широко применяются как противовирусные и антибактериальные и иммунокорректирующие препараты [2, 6, 7]. Лечебное действие Генфаксона на аутоиммунные процессы объясняют антипролиферативной активностью высоких доз рекомбинантного бета1-IFN и индукцией экспрессии TLR7 в дендритных клетках [19, 20]. Циклоферон (метилглюкаминная соль акриданона) является известным индуктором IFN с широким спектром нозологического применения [7]. Механизм его противовирусного, антибактериального и иммуномодулирующего действия активно изучается, но во многом остается непонятным [30, 31]. На основе ряда полученных производных акриданона создаются эффективные противоопухолевые препараты [3, 18]. По нашим данным, Циклоферон индуцирует транскрипцию мРНК IFN типа 1 в клетках крови человека и является регулятором апоптоза [9, 11, 12]. Иммуномакс (растительный пептидогликан) сочетает иммуномодулирующие и IFN-индуцирующие свойства в клетках человека [1, 14].

Для сравнения сигнальных путей действия бета-1IFN «Генфаксона», иммуномодулятора «Иммуномакс» и IFN-индуктора «Циклоферона» в клетках крови 3-х разных людей впервые проведен количественный анализ экспрессии 6-ти генов (TLR3, TLR4, RIG1, IPS, IRF3 и B2M) методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы

Препараты. Генфаксон — рекомбинантный бета-1a-IFN (производитель Laboratoire TUTEUR S.A.C.I.F.I.A), выпускается в шприцах 0,5 мл (44 мкг) с активностью 12 млн МЕ. Иммуномакс (Иммафарма, Москва) по химической природе является кислым пептидогликаном с молекулярной массой 1000–40000 kDa. По данным производителя, препарат выделен из растений и очищен хроматографическими методами,

содержит 200 ЕД активного вещества, предназначен для внутримышечного введения. Циклоферон — N-метилглюкаминная соль акридонуксусной кислоты, 12,5% водный раствор («Полисан» НТФФ).

Постановка опытов на клетках крови человека. Венозная кровь была взята у 3-х разных людей: мужчина 27 лет, носитель вируса Эпштейна—Барр (донор 1); женщина 65 лет с онкологическим заболеванием 1 стадии (донор 2); женщина 53 лет с сердечно-сосудистой патологией (донор 3). 5 мл свежей крови разводили в 15 мл питательной среде RPMI-1640 с глутамином, содержащей 10% сыворотки телят и антибиотик гентамицин. Разведенную кровь разливали по 1 мл в культуральные стерильные пробирки с герметичными пробками. К ней добавляли приготовленные разведения препаратов по 10 мкл. Исследованные дозы Генфаксона составили 10^5 , 10^4 и 10^3 МЕ/мл, Иммуномакса — 5 и 0,5 ед/мл, Циклоферона — 600 и 125 мкг/мл. Выбор исследованных доз Циклоферона и Иммуномакса сделан исходя из ранее полученных нами данных об их IFN-индуцирующих свойствах в клетках крови человека [9, 12, 14]. Дозы Иммуномакса не вызывали видимых изменений клеточной морфологии и проницаемости (окраска трипановым синим). Инкубацию клеток крови с препаратами проводили 20 ч при 37° С в термостате, затем клетки осаждали при 1000 об/мин на центрифуге. Осадки клеток лизировали в 0,8 мл реагента Purzol (Bio-Rad, США), согласно инструкции, и использовали для выделения РНК и анализа экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Действие Циклоферона в клетках линии Jurkat (Т-клеточный лимфобластоидный лейкоз) получено из РОНЦ им. Н.Н. Блохина. К суспензионной культуре с плотностью 10^6 клеток/мл в питательной среде RPMI-1640 с глутамином, содержащей 10% сыворотки телят и антибиотик гентамицин, добавляли разные дозы препарата на 2 ч при 37 °С. Конечные концентрации Циклоферона варьировали от 2500 до 78 мкг/мл. Затем клетки осаждали центрифугированием и отмывали от препаратов и продолжали инкубацию в свежей питательной среде 24 ч при 37 °С. Из осадков клеток выделяли РНК, как описано выше для клеток крови, и определяли экспрессию генов «домашнего хозяйства» и генов альфа-IFN.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Подробное описание процедуры выделения РНК, обработки

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПЦР-ПРАЙМЕРОВ

Ген/мРНК	Последовательность нуклеотидов 5'-----3'	Размер ПЦР продукта н.п.*
TLR3	П – AGT GCC GTC TAT TTG CCA CA О – GCA TCC CAA AGG GCA AAA GG	149
TLR4	П – GTC AGA CGG TGA TAG CGA GC О – TTA GGA ACC ACC TCC ACG CA	177
RIG1	CCA GAG AAC CAG TTG GGC TT TCT CCA CCA TCT CTG GAC ACC	163
IRF3	П – CTG GGG CCC TTC ATT GTA GA О – GTA GGC CTT GTA CTG GTC GG	270
IPS1	GCA AGA GAC CAG GAT CGA CT TCC GCG AGA TCA ACT AGC TC	152

Примечание. * – нуклеотидные пары.

препарата ДНК-зой, получения кДНК и проведения количественного ПЦР-анализа на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) приведено в нашей более ранней публикации [12]. Структура олигонуклеотидных праймеров, рассчитанных нами, представлена в таблице 1. Праймеры генов «домашнего хозяйства» (18S рибосомальной РНК, глицеральфосфатдегидрогеназы ГФДГ, бета-актина и бета-2-микроглобулина), а также консервативные для генов альфа-IFN опубликованы [10, 12]. Все праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия). Полученный ПЦР-продукт соответствовал расчетному по Т-плавления и подвижности в агарозном геле. Относительная оценка экспрессии генов (дельта Cq) сдела-

на в программе CFX Manager «Gene expression analysis» в автоматическом режиме.

Цитотоксичность препарата Циклоферон исследована в реакции МТТ на клетках аденокарциномы толстого кишечника SW620 (АТТС CCL-227, РОНЦ им. Н.Н. Блохина) согласно описанной методике [5] (табл. 2). Контакт клеток с разными дозами препарата составлял 48 ч при 37 °С, варианты опыта и контроля (без препарата) исследовали в 16 лунках 96-луночного плато. За 5 ч до окончания инкубации в лунки вносили по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, Chemical Co, США). Супернатант удаляли и в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО, растворителя кристаллов формазана на 10 мин при 37 °С, после чего измеряли оптическую плотность раство-

ТАБЛИЦА 2. ДЕЙСТВИЕ ЦИКЛОФЕРОНА НА КЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ

Метод тестирования	Дозы Циклоферона мкг/мл						
	2500	1250	625	312	156	78	контроль
ОТ-ПЦР Cq* (SD)	Экспрессия генов в клетках Jurkat						
18S рибРНК	23	21	20	18	17	17	18
ГФДГ	21	19	17	14	13	13	14
B2M	32	30	29	24	24	24	25
альфа-IFN	38	37	35	34	33	34	32
МТТ	Цитотоксичность в культуре клеток SW620 48 часов						
ОЕ** 540 нм	0,8	1,1	1,2	1,4	1,4	1,4	1,4

Примечание. *Cq – пороговые циклы амплификации, целые средние значения 3-х повторных измерений, SD – стандартные отклонения Cq в пределах 0,1-0,2; ** – ОЕ – оптическая плотность, средние значения 16 повторных измерений.

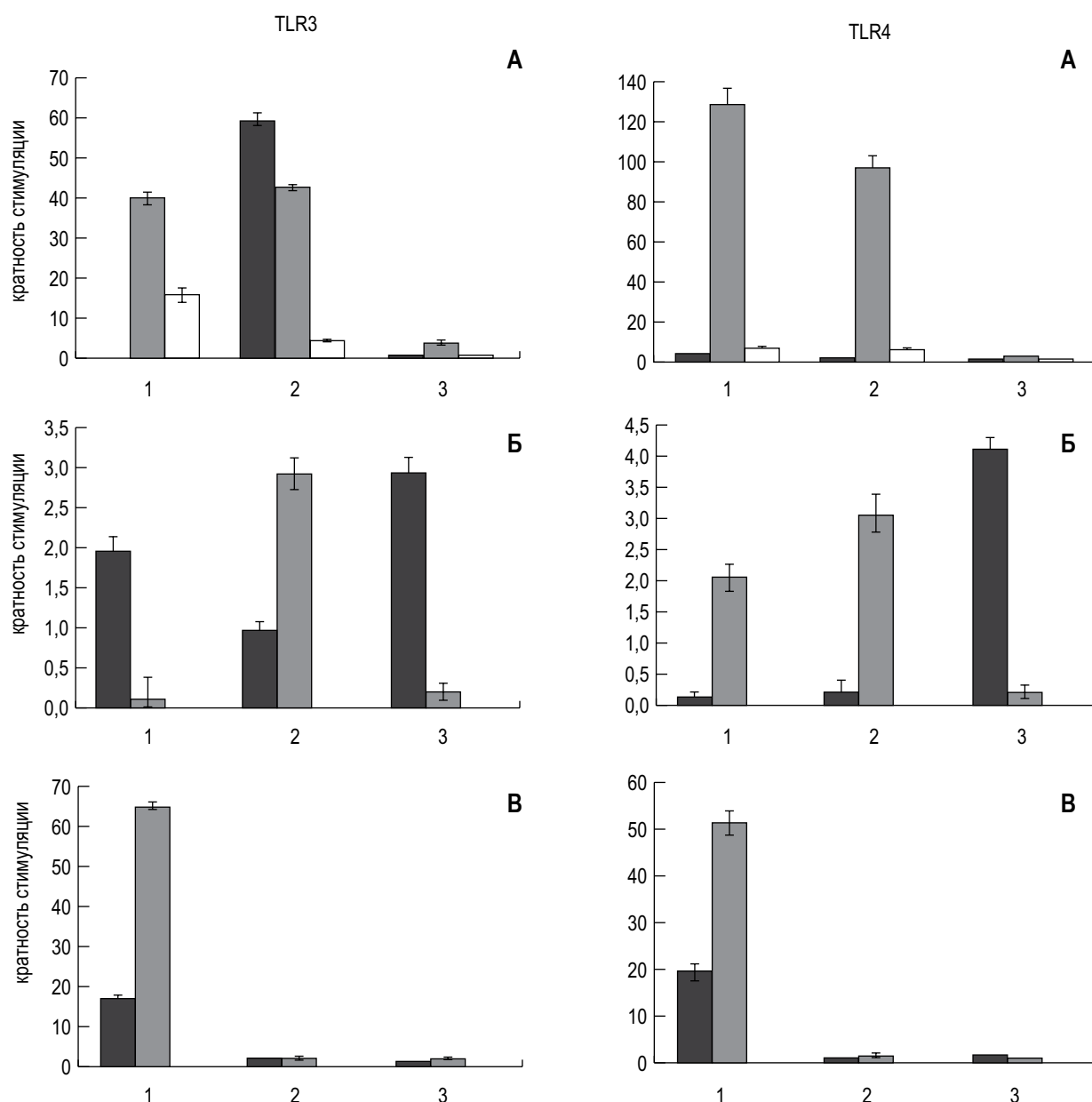


Рисунок 1. Экспрессия генов TLR3 и TLR4 в клетках крови человека, индуцированная препаратами Генфаксон (А), Циклоферон (Б) и Иммуномакс (В)

Примечание. По оси абсцисс: 1 – донор мужчина 27 лет, носитель вируса Эпштейна–Барр; 2 – донор женщина 65 лет с онкологическим заболеванием; 3 – донор женщина 53 лет с сердечно-сосудистой патологией. По оси ординат – кратность стимуляции транскрипции (дельта-Cq) относительно контроля, принятого равным 1. Столбики черные: Генфаксон 10⁵ МЕ/мл, Циклоферон 600 мкг/мл, Иммуномакс 5 ед/мл; столбики серые: Генфаксон 10⁴ МЕ/мл, Циклоферон 125 мкг/мл, Иммуномакс 0,5 ед/мл; столбики белые – Генфаксон 10³ МЕ/мл.

ра на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» АИФР-01 (Россия). Вычисляли средние значения ОЕ при 540 нм. Опухолевые клетки считали чувствительными к Циклоферону, если наблюдалось достоверное снижение значений средних значений ОЕ в опыте относительно контроля клеток (без добавления препарата).

Статистическая обработка. Данные ОТ-ПЦР в реальном времени получены с 3-мя повторными образцами кДНК и представлены как средние значения дельта-Cq со стандартными отклонениями (SD). Величины SD не превышали 10% от значений средних. Значимость различий между образцами оценена по t-критерию

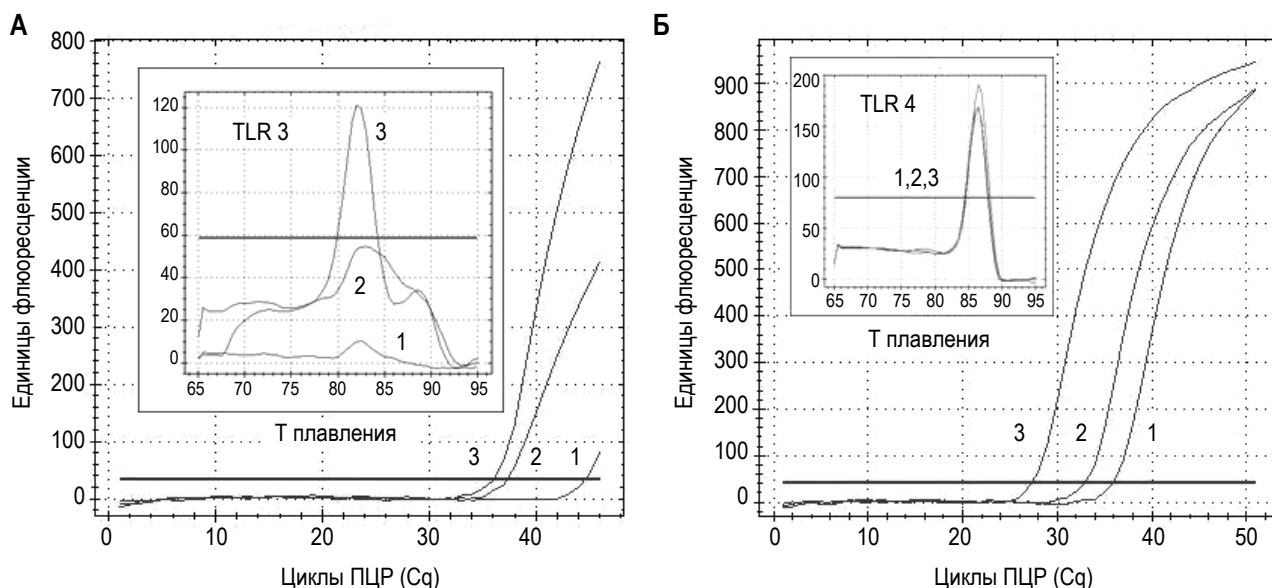


Рисунок 2. Сравнение конститутивных уровней активности генов TLR3 и TLR4 в клетках крови 3-х людей

Примечание. Кривые накопления ПЦР-продуктов в реальном времени. По оси абсцисс – циклы (Cq) и пики Т-плавления специфических амплификатов. По оси ординат – нарастание флуоресцентного сигнала. 1 – донор мужчина 27 лет, носитель вируса Эпштейна–Барр; 2 – донор женщина 65 лет с онкологическим заболеванием; 3 – донор женщина 53 лет с сердечно-сосудистой патологией.

Стьюдента при $p < 0,05$ в программе «Statistica 6.0».

Результаты

Сравнили действие 3-х препаратов Генфаксон, Циклоферон и Иммуномакс на транскрипцию генов сигнальных путей иммунитета TLR3, TLR4, IRF3, B2M, RIG1 и IPS в клетках крови людей разного возраста (доноров) с различной патологией. Данные суммированы и представлены на рисунках 1–4 в виде кратности стимуляции экспрессии генов у доноров 1, 2 и 3 относительно контроля, принятого равным 1.

На рисунке 1 (А, Б, В) показано действие препаратов на экспрессию генов TLR3 и TLR4 в клетках крови 3-х доноров. Высокая доза Генфаксона (10^5 МЕ/мл) ингибировала конститутивную активность TLR4 гена у мужчины (донор 1), но давала 100-кратный рост генной транскрипции у женщины с онкологическим заболеванием (донор 2). При этом у нее наблюдалась прямая дозовая зависимость стимулирующего эффекта Генфаксона на ген TLR3 (рис. 1А). Снижение концентрации Генфаксона до 10^4 МЕ/мл в клетках этих 2-х доноров оказывало на гены TLR3 и TLR4 сильно выраженное стимулирующее действие. Вместе с тем, в клетках крови донора 3 (женщина с сердечно-сосудистой патологией)

Генфаксон проявлял на эти гены слабый стимулирующий эффект.

Стимулирующие эффекты Циклоферона на гены рецепторов TLR3 и TLR4 были низкими и варьировали от 2 до 4 раз (рис. 1Б). Они выявлялись в клетках крови 3-х доноров избирательно в ответ на дозы 600 и 125 мкг/мл. При этом высокие концентрации Циклоферона ингибировали конститутивную экспрессию гена TLR4.

Действие Иммуномакса на гены рецепторов TLR3 и TLR4 было высокостимулирующим и избирательным в клетках крови только донора 1 (рис. 1В). Максимальный эффект наблюдался с низкой дозой препарата 0,5 ед/мл. Клетки крови доноров 2 и 3 либо не реагировали на Иммуномакс или уровни активации генов TLR3 и TLR4 были низкими.

Выявленные различия в действии препаратов на гены TLR3 и TLR4 у 3-х доноров могли быть обусловлены отличиями в исходных конститутивных уровнях генной активности. Пороговые циклы (Cq) логарифмической фазы амплификации генов TLR3 и TLR4 у 3-х доноров значительно варьировали (рис. 2А, Б). Наибольшие значения Cq генов TLR3 и TLR4 были у донора 1, донор 2 имел средние показатели Cq и наименьшие значения Cq наблюдались у донора 3. Это означает, что донор 1 имеет самые низкие уровни экспрессии генов TLR3 и TLR4,

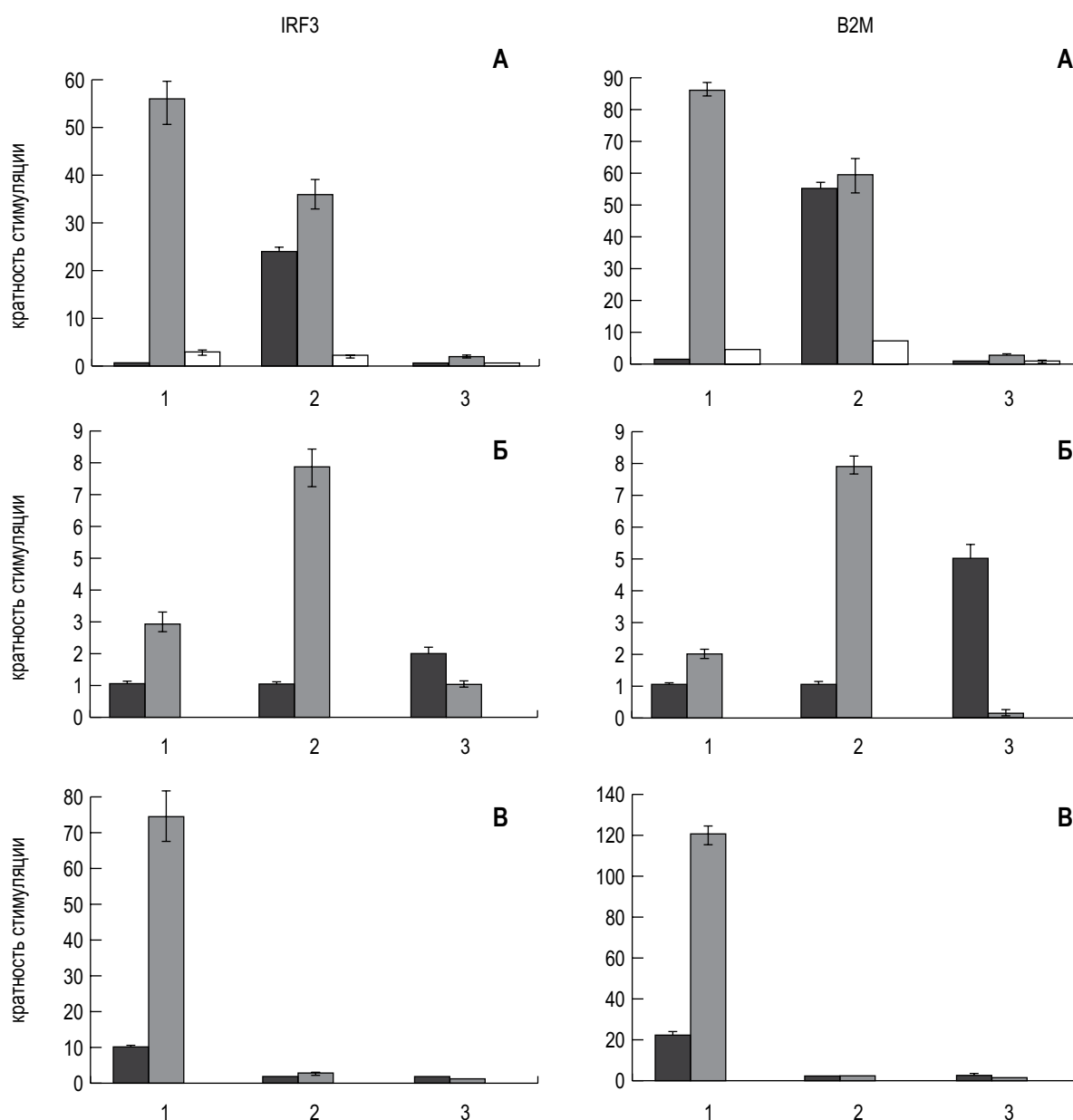


Рисунок 3. Экспрессия генов B2M и IRF3 в клетках крови человека, индуцированная препаратами Генфаксон (А), Циклоферон (Б) и Иммуномакс (В)

Примечание. Обозначения см. на рисунке 1.

а донор 3 — самые высокие. При этом, по данным плавления, у донора 1 отсутствовал специфический амплификат гена TLR3 и, следовательно, конститутивный синтез мРНК TLR3 был не выявляемым, а у донора 2, по данным плавления, содержал дополнительные неспецифические амплификаты (рис. 2А). Различия между донорами в конститутивных уровнях экспрессии для гена TLR4 составили 2^{10} (рис. 2Б). Следует отметить, что ген TLR4, по сравнению с геном TLR3,

в клетках крови всех доноров имел более высокие конститутивные уровни экспрессии (средние значения TLR4 = Cq25 и TLR3 = Cq35). Можно сделать вывод, что донор 1, с более низкими уровнями экспрессии генов TLR3 и TLR4, отличается от доноров 2 и 3 более высокой индивидуальной чувствительностью к препаратам Генфаксон и Иммуномакс. Наоборот, донор 3, с более высокими конститутивными активностями этих генов, имеет низкую чувствительность к пре-

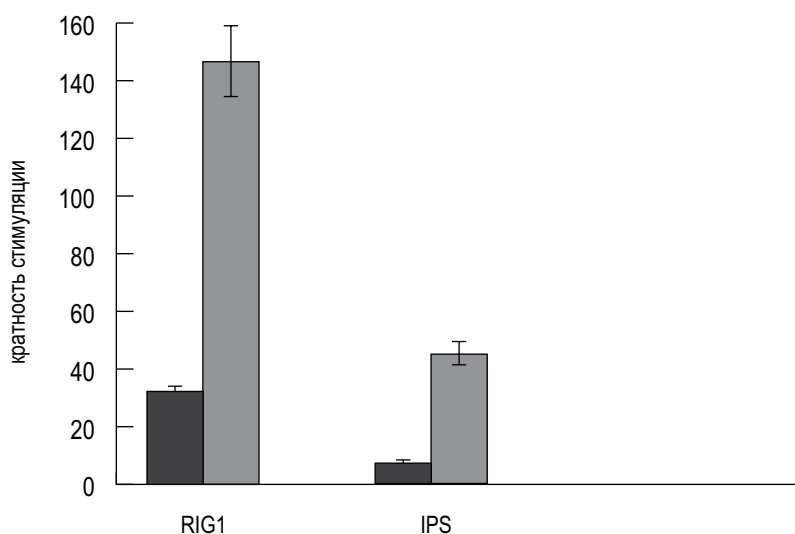


Рисунок 4. Экспрессия генов RIG1 и IPS в клетках крови, стимулированная препаратом Иммуномакс

Примечание. Донор 1 мужчины 27 лет, носитель вируса Эпштейна–Барр. По оси абсцисс название генов. Столбики черные – доза 5 ед/мл, столбики серые – доза 0,5 ед/мл. По оси ординат – кратность стимуляции транскрипции (дельта-Сq) относительно контроля, принятого равным 1.

паратам IFN и их индукторов. По-видимому, в клетках крови существуют эндогенные механизмы регуляции уровней транскрипционной активности генов – рецепторов врожденного иммунитета, которые пока остаются неизвестными.

Дальнейший ПЦР-анализ действия препаратов на экспрессию IFN-зависимых генов – фактора транскрипции IRF3 и B2M подтвердил описанные выше закономерности регуляции генов TLR3 и TLR4 в клетках крови 3-х доноров (рис. 3А, Б, В). По-прежнему гены донора 1 имели наибольшую чувствительность к препаратам Генфаксон и Иммуномакс и гены донора 3 – минимальную. Гены донора 2 проявляли промежуточную чувствительность к рекомбинантному бета1-IFN. Можно лишь предполагать, как наблюдаемые различия у 3-х случайных доноров связаны с имеющейся у них патологией (донор 1 носитель вируса Эпштейна–Барр; донор 2 с онкологическим заболеванием 1 стадии; донор 3 с нарушениями сердечно-сосудистой деятельности). Ответ на эти вопросы требует специальных исследований.

Мы провели дополнительное расширенное исследование влияния разных доз Циклоферона на клеточный метаболизм с помощью 2-х тестов: ОТ-ПЦР и МТТ (табл. 2). По данным 2-х видов анализов (экспрессия генов «домашнего хозяйства» и альфа-IFN) и цитотоксичности на опухолевых клетках Jurkat и SW620 были получены одинаковые значения действующих concentra-

ций. Отличия в дозах Циклоферона от контрольных значений наблюдались до концентрации 312 мкг/мл. Следовательно, доза 125 мкг/мл, использованная нами и активирующая IFN-зависимые гены IRF3 и B2M, не оказывает ингибирующего влияния на клеточный метаболизм. Важно отметить, что активирующее действие Циклоферона на гены IRF3 и B2M более значимое по сравнению с генами рецепторов TLR3 и TLR4 (рис. 1Б и рис. 2Б). Однако, по уровням генной индукции уступает эффектам Генфаксона (рис. 1А). Поэтому Циклоферон обладает свойством индуцировать синтез IFN в клетках крови человека, но уступает по активности Генфаксону и Иммуномаксу.

Стимуляция Иммуномаксом генов IRF3 и B2M в клетках крови была на высоком уровне только у донора 1. Специальный интерес представляет выяснение роли RIG1/IPS сигнального пути в механизме действия этого препарата в связи данными об участии в нем мембранного TLR4 [15]. Результаты действия Иммуномакса на экспрессию этих сигнальных генов представлены на рисунке 4. Видна сильная стимуляция уровней транскрипционной активности генов RIG1 и IPS в клетках крови донора 1, высокочувствительного к препарату. С этим согласуются наши данные об Иммуномаксе как активаторе универсальных факторов транскрипции NF-κB и p53, а также генов IFN в клетках человека [14].

Обсуждение

Исследованные препараты Генфаксон, Циклоферон и Иммуномакс обладают выраженными клиническими эффектами, которые во многом связаны с их иммуномодулирующими и IFN-индуцирующими свойствами. В нашей работе показана способность исследованных препаратов стимулировать экспрессию генов сигнальных рецепторов иммунитета в клетках крови человека, что повышает их чувствительность к патогенам разной природы и вызывает более сильный иммунный ответ в организме. Тем не менее, степень выраженности защитного эффекта препаратов у отдельных людей варьирует, и не всегда удается достичь ожидаемого позитивного результата. Как показано в данной работе, стимуляция препаратами экспрессии генов врожденного и адаптивного иммунитета в клетках крови разных доноров также отличается и не всегда наблюдается активный генный ответ. Возможно, различная чувствительность обусловлена значительными индивидуальными отличиями в конститутивных уровнях активности генов TLR3 и TLR4 в клетках крови 3-х доноров. Низкие конститутивные уровни экспрессии этих генов прямо коррелировали с их высокой чувствительностью к препаратам Генфаксон (бета1-IFN) и Иммуномакс (растительный пептидогликан). Подобная зависимость наблюдалась и для генов IRF3 и B2M. Стимуляция этих генов препаратами Генфаксон и Иммуномакс была выраженной. Препарат Циклоферон, в отличие от Генфаксона и Иммуномакса, вызывал слабую стимуляцию генов TLR3, TLR4, IRF3 и B2M в клетках крови 3-х доноров. До сих пор остается неизвестным, почему Циклоферон индуцирует IFN не во всех типах клеток. Показаны проникновение Циклоферона в человеческие лимфобластоидные клетки и их ядра, взаимодействие препарата с ДНК, индукция альфа-IFN и провоспалительных цитокинов [4]. Препарат оказывает прямое антивирусное действие на репродукцию аденовируса [32] и вирусов герпеса [7]. Можно предположить, что взаимодействие солей акриданона с нуклеиновыми кислотами меняет их структуру. В результате они узнаются цитоплазматическими ДНК- и РНК-сенсорами (хеликазами RIG1, DAI и др.) как чужеродные структуры. Включается сигнальный механизм индукции синтеза IFN типа I и провоспалительных цитокинов [8, 21, 24]. В зараженных вирусами клетках взаимодействие вирусных

РНК и ДНК с Циклофероном может нарушать репликативную активность вируса и процесс сборки полноценных вирионов. Недавно появилось сообщение о способности карбоксиметилакриданона (CMA), подобно c-diGMP (cyclic diguanosine monophosphate) образуемому бактериями, взаимодействовать с белком STING (стимулятор интерферонового гена) [17]. Включение CMA/STING сигнала синтеза IFN эффективно происходит в мышинных макрофагах с участием комплекса TBK1/IRF3, но такой механизм, по данным авторов, не работает в клетках человека. Наши исследования в клетках крови человека показали слабые сигнальные реакции на Циклоферон генов мембранного рецептора TLR4 и эндосомального рецептора TLR3. Вместе с тем, Циклоферон заметно сильнее стимулировал гены фактора транскрипции IRF3 и ко-рецептора B2M. Поэтому механизм индукции им IFN в клетках человека работает, но он, более вероятно, зависит от цитоплазматических ДНК- и РНК-сенсоров. Такой вывод согласуется с результатами масштабного определения IFN-индуцирующей активности Циклоферона у здоровых лиц [13] и нашими данными о стимуляции им генов бета1-IFN и альфа-IFN в клетках крови здорового донора [9].

Иммуномакс, наряду с генами мембранного TLR4 и эндосомального TLR3 рецепторов, в большей степени индуцирует ген цитоплазматического сенсора RIG1. По-видимому, для действия Иммуномакса имеют значения дополнительные цитоплазматические сигнальные пути индукции синтеза IFN с участием митохондриального белка IPS и фактора транскрипции IRF3. Наши данные дополняют имеющуюся информацию относительно участия TLR4 в сигнальном механизме действия Иммуномакса, полученную на клетках с делетированными генами [15]. Проведенные этими авторами исследования не затрагивали гены рецепторов TLR3 и RIG1.

Метод количественного ОТ-ПЦР тестирования экспрессии генов сигнальных реакций иммунитета позволяет быстро и с высокой специфичностью оценить индивидуальную чувствительность клеток к препаратам. Мы предлагаем более широко использовать этот молекулярный подход для оценки эффективности действия IFN-индуцирующих препаратов вместо затратных по времени и более трудоемких биологических методов титрования в культурах клеток.

Список литературы / References

1. Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Шишкова Н.М., Мастернак Т.Б., Малкина Е.Ю., Ульянова Л.И., Стеценко О. Н. Клеточные механизмы иммуномодулирующего действия препарата Иммуномакс // Иммунология, 2005. Т.26, № 2. С. 111-120. [Ataullakhanov R.I., Pichugin A.V., Shishkova N.M., Masternak T.B., Malkina E.Yu., Ulyanova L.I., Stetsenko O.N. Cell mechanisms of the immunomodulating action produced by drug «Immunomax». *Immunologiya = Immunology*, 2005, Vol. 26, no. 2, pp. 111-120. (In Russ.)]
2. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. Справочник (2-е изд.). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006, 312 с. [Ershov F.I. Antiviral preparations]. Moscow: GEOTAR-Media, 2006, 312 p.
3. Деева Е.Г., Павловская Я.В., Киселев О.И., Киселев В.И., Пиотровский Л.Б., Ершов Ф.И. Структурный и функциональный анализ биологически активных производных акридина // Вестник Российской Академии наук, 2004. № 2. С. 29-34. [Deeva E.G., Pavlovskaya Ya.V., Kiselev O.I., Kiselev V.I., Piotrovskii L.B., Ershov F.I. The structural and functional analysis of the biological activity of acridine derivatives. *Vestnik Rossiyskoy Akademii nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2004, no. 2, pp. 29-34. (In Russ.)]
4. Коваленко А.Л., Казаков В.И., Слита А.В., Зарубаев В.В., Сухинин В.П. Исследование внутриклеточной локализации циклоферона, связывание его с ДНК и стимуляции экспрессии цитокинов в клетках при воздействии циклоферона // Цитология, 2000. Т. 42, № 7. С.659-664. [Kovalenko A. L., Kazakov V.I., Slita A.V., Zarubaev V.V., Sukhinin V.P. Intracellular localization of cycloferon, its binding with DNA and stimulation of cytokines expression after exposure to cycloferon. *Tsitologiya = Cytology*, 2000, Vol. 42, no. 7, pp. 659-664. (In Russ.)]
5. Лацерус Л.А., Пинигина И.М., Барышников А.Ю., Огородникова М.В. Цитотоксические и апоптоз-индуцирующие активности препарата Абисилин в отношении опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал, 2010. № 1. С. 9-12. [Latseruz L.A., Pinigina N.M., Baryshnikov A.Yu., Ogorodnikova M.V. The cytotoxic apoptosis-inducing activity of Ambisilin. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapeutic*, 2010, no. 1, pp. 9-12. (In Russ.)]
6. Новиков А.Г., Логунова З.В., Потеев Н.Н. Опыт применения иммуномодулятора «Иммуномакс» // Российский медицинский журнал, 2004, Т. 12, № 13. С. 819-820. [Novikov A.G., Logunova Z.V., Potekaev N.N. Experience of using immunomodulator «Immunomax». *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2004, Vol. 12, no. 13, pp. 819-820. (In Russ.)]
7. Романцов М.Г., Ершов Ф.И., Коваленко А.Л. Циклоферон в лечении инфекционных заболеваний // Антибиотики и химиотерапия, 2008. Т. 53, № 3-4. С. 36-45. [Romantsov M.G., Ershov F.I., Kovalenko A.L. Cycloferon in the treatment of infectious diseases. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotic and Chemotherapy*, 2008, Vol. 53, no. 3-4, pp. 36-45. (In Russ.)]
8. Соколова Т.М. Иммунное узнавание вирусных нуклеиновых кислот приводит к индукции интерферонов и воспалительных цитокинов. Сборник научных трудов «Интерферон-2011» / Под ред. Ершова Ф.И. М.: НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, 2012. С. 52-62. [Sokolova T. M. Immune recognition viral nucleic acids result in interferon and inflammatory cytokines induction. "Interferon-2011". Moscow: NF Gamaleya Institute of Microbiology, Epidemiology and Immunology, 2012, pp. 52-62.]
9. Соколова Т.М., Урываев Л.В., Тазулахова Э.Б., Ершов Ф.И., Малышенкова И.К., Дидковский Н.А. Индивидуальные изменения экспрессии генов системы интерферона в клетках крови человека под влиянием амиксина и циклоферона // Вопросы вирусологии, 2005. № 2. С.32-36. [Sokolova T.M., Uryvaev L.V., Tazulakhova E.B., Ershov F.I., Malysheva I.K., Didkovsky N.A. Individual changes of gene expression in the interferon system in human blood cells due to amixin and cycloferon. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 2005, no. 2, pp. 32-36. (In Russ.)]
10. Соколова Т.М., Федорова Н.Е., Меджидова М.Г., Терехов С.М., Урываев Л.В., Куц А.А. Механизмы клеточной резистентности к цитомегаловирусу связаны с пролиферативным состоянием клеток и транскрипционной активностью генов лейкоцитарного и иммунного интерферона // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 4-5. С.457-466. [Sokolova T.M., Fedorova N.E., Medjidova M.G., Terekhov S.M., Uryvaev L.V., Kushch A.A. Mechanisms of cell resistance to cytomegalovirus are connected with cell proliferation state and transcription activity of leukocyte and immune interferon genes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 4-5, pp. 457-466. (In Russ.)]
11. Соколова Т.М., Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Шувалов А.Н., Чкадуа Г.З., Ершов Ф.И. Эффекты индукторов интерферона на экспрессию генов – регуляторов апоптоза в лимфоцитах человека //

Цитокины и воспаление, 2011. Т.10, № 2. С. 75-81. [Sokolova T.M., Ospelnikova T.P., Kolodyazhnaya L.V., Shuvalov A.N., Chkadua G.Z. Effects of interferon inducers on the expression of apoptosis regulatory genes in human lymphocytes. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2011, Vol. 10, no. 2, pp. 75-81. (In Russ.)]

12. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Телков М.В., Колодяжная Л.В., Ершов Ф.И. Препарат «Ридостин» индуцирует транскрипцию широкого спектра генов системы интерферона в клетках человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 156, № 8. С. 179-182. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Telkov M.V., Kolodyazhnaya L.V., Ershov F.I. Preparation "Ridostin" induces transcription wide genes spectrum of interferon system in human cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, Vol. 156, no. 8, pp. 179-182. (In Russ.)]

13. Суханов Д.С., Романцов М.Г., Смагина Ф.И., Коваленко А.Л., Локтева О.М. Доза зависимая интерферон индуцирующая активность и фармакинетика циклоферона у здоровых лиц // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2012. № 75. С.23-26. [Sukhanov D.S., Romantsov M.G., Smagina A.N., Kovalenko A.L. Lokteva O.M. Dose-dependent interferon induction activity and pharmacokinetics of cycloferon in healthy humans. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2012, Vol. 75, no. 1, pp. 23-26. (In Russ.)]

14. Шувалов А.Н., Соколова Т.М., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Модуляция клеточных генов препаратом Иммуномакс: активация генов интерферонов и интерлейкинов // Иммунология, 2014. № 1. С. 17-21. [Shuvalov A.N., Sokolova T.M., Shapoval I.M., Ershov F.I. Modulation of cellular gene transcription by drug "Immunomax": activation of Interferon and Interleukine genes. *Immunologiya = Immunology*, 2014, no. 1, pp. 17-21. (In Russ.)]

15. Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist Immunomax, as a therapeutic strategy for a metastatic breast cancer. *J. Transl. Med.* 2014, Vol. 12, no. 1, pp. 322-333.

16. Black K.E., Collins S.L., Hagan R.S., Hambin M.J., Chan-Li Y., Hallowell R.W., Powell J.D., Horton M.R.. Hyaluronan fragments induce IFN β via a novel TLR4-TRIF-TBK1-IRF3-dependent pathway. *Journal of Inflammation*, 2013, Vol. 10, pp. 23-32.

17. Calvar T., Deimling T., Ablasser A., Hopfner K-P., Hornung V. Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING. *The EMBO J.*, 2013, Vol. 32, pp.1440-1450.

18. Cholewiriski G., Dzierzbicka K., Kotodziejczyk A.M. Natural and synthetic acridines /acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. *Parmacological Reports*, 2011, Vol. 63, pp. 305-336.

19. Denkow K., Baur J.M.J., Herker M., Paap B.K., Thamilarassan M., Koszan D., Shott E., Deuschle K., Bellman-Strobl J., Paul F., Zettl U.K., Ruprecht K., Lehnard S. Multiple Sclerosis: Modulation of Toll-Like receptors (TLR) expression by interferon - β includes upregulation of TLR7 in plasmacytoid dendritic cells. *Plos one*, 2013, Vol. 8, issue 8, e70626, pp. 1-11.

20. George P.M., Badiger R., Alazawi W., Foster G.R., Mitchell J.A. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Parmacology and Therapeutics*, 2012, Vol. 135, pp. 44-53.

21. Gonzalez-Navajas J.M., Lee J., Daid M., Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 12, no. 2, pp. 125-135.

22. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 2010, Vol. 327, pp. 291-295.

23. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J.Mol.Biol.*, [http:// dx.dos.org/10.1016.jmb.2013.11.024](http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.024).

24. Levy D.E., Marie I., Durbin J.E. Induction and Function of Type I and III Interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol.*, 2011, Vol. 1, no. 6, pp. 476-486.

25. Miettinen M., Sareneva T., Julkunen I., Matikainen S. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes and Immunity*, 2001, Vol. 2, pp. 349-355.

26. Paul-Clark M.J., George P.M., Cateral T., Parzych K., Wright W.R., Crawford D., Bailey L.K., Reed D.M., Mitchell J.A. Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, 2012, Vol. 135, pp. 200-215.

27. Platanias L.C. Mechanisms of type I- and type-II- interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. immunol.*, 2005, Vol. 5, pp. 375-386.
28. Sadler A.J., Williams B.R. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, pp. 559-568.
29. Siren J., Pirhonen J., Julkunen I., Matikainen S. IFN- α regulates TLR-dependent gene expression of IFN- α , IFN- β , IL28 and IL29. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, pp. 1932-1937.
30. Vispe S., Vandenberghe I., Rubin M. Novel tetra-acridine derivatives as dual inhibitors of topoisomerase II and the human proteasome. *Biochem. Pharmacol.*, 2007, Vol. 73, no. 12, pp. 1863-1872.
31. Wang W.G., Ho W.C., Dicker D.T., Mackinnon C., Winkler J.D., Marmorstein R., El-Deiry W.C. Acridine derivatives activate p53 and induce tumor cell death through Bax. *Cancer Biol. Ther.*, 2005, Vol. 4, pp. 893-898.
32. Zarubaev V.V., Slita A.V., Krivitskaya V.Z., Sirotkin A.K., Kovalenko A.L., Chatterjee N.K. Direct antiviral effects of cycloferon (10-carboxymethyl-0-acridanone) against adenovirus type 6 in vitro. *Antiviral Res.*, 2003, Vol. 58, no. 2, pp. 131-137.

Авторы:

Соколова Т.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник; лаборатория интерфероногенеза, ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

Шувалов А.Н. — аспирант, младший научный сотрудник, лаборатория интерфероногенеза, ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

Шаповал И.М. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория интерфероногенеза, ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

Соколова З.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

Ершов Ф.И. — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель отдела интерферонов и лаборатории интерфероногенеза, ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

Authors:

Sokolova T.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

Shuvalov A.N., PhD Fellow, Junior Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

Shapoval I.M., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Interferonogenesis, FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

Sokolova Z.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, FSBSI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Moscow, Russian Federation

Ershov F.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member of Russian Academy of Sciences, Chief, Department of Interferons and Laboratory of Interferonogenesis, FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

Поступила 11.03.2014
Принята к печати 29.03.2014

Received 11.03.2014
Accepted 29.03.2014

ОПЫТ ИЗМЕРЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОГО СТАТУСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШЕСТИЦВЕТНОГО ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Кудрявцев И.В.^{1,2}, Субботовская А.И.³

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

³ ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

Резюме. В статье рассматриваются вопросы использования 6-цветного анализа для исследования параметров иммунного статуса методом проточной цитометрии. Цельная кровь условно здоровых доноров окрашивалась комбинацией моноклональных антител HLA-DR-FITC, CD16⁺56-PE, CD4-ECD, CD19-ECD, CD8-PC5.5, CD3-PC7, CD45-APC (Beckman Coulter, США) по безотмывочной технологии. Для настройки напряжения ФЭУ проточного цитометра использовали пробирки, окрашенные каждым моноклональным антителом по отдельности, оптимальным считали напряжение при нахождении негативной популяции по центру первой декады логарифмической шкалы. Настройка компенсаций осуществлялась в автоматическом режиме программного обеспечения проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США). Также рассматривается оптимальная «стратегия гейтирования» для получения искомым популяций Т-клеток (CD3⁺CD19⁻), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), В-клеток (CD3⁺CD19⁺), НК-клеток (CD3⁺CD56⁺), NKT-клеток (CD3⁺CD56⁺), активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺).

Ключевые слова: проточная цитометрия, многоцветный анализ, иммунофенотипирование лимфоцитов

APPLICATION OF SIX-COLOR FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS FOR IMMUNE PROFILE MONITORING

Kudryavtsev I.V.^{a,b}, Subbotovskaya A.I.^c

^a Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^c E.N. Meshalkin Research Institute of Circulation Pathology, Russian Ministry of Health Care, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The article deals with applications of six-color flow analysis for studying the immune state parameters by means of flow cytometry. Whole blood from healthy donors was stained with combination of monoclonal

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69
Факс: 8 (812) 234-94-89
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences
197376, Russian Federation, St. Petersburg, I. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69
Fax: 7 (812) 234-94-89
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Кудрявцев, А.И. Субботовская, «Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26

© Кудрявцев И.В. и соавт., 2015

For citation:

I.V. Kudryavtsev, A.I. Subbotovskaya, "Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>

antibodies, i.e., HLA-DR-FITC, CD16⁺56-PE, CD4-ECD, CD19-ECD, CD8-PC5.5, CD3-PC7, CD45-APC (Beckman Coulter, USA) using a “no-wash” technology. To adjust the photomultiplier (PMT) voltage, we used the tubes with each of the tested monoclonal antibodies, PMT voltage was considered optimal when the negative population was located in the middle of the first decade at the logarithmic scale. The compensatory adjustment was performed in automatic mode, using Navios software (Beckman Coulter, USA). We discuss an optimal gating strategy in order to assess the populations of interest: total T cells (CD3⁺CD19⁻), T helper cells (CD3⁺CD4⁺), cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺), B cells (CD3⁻CD19⁺), NK cells (CD3⁻CD16⁺CD56⁺), NKT cells (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), activated T lymphocytes (CD3⁺HLA-DR⁺).

Keywords: flow cytometry, multicolor analysis, immunophenotyping

Поддержано Министерством образования и науки РФ, проект № 1326.

Введение

В настоящее время метод проточной цитометрии широко применяется для анализа клеточного состава периферической крови. Существенными преимуществами данного метода перед микроскопией является высокая скорость и точность проводимых исследований, а также статистическая достоверность получаемых результатов. Первые исследования, проведенные на проточных цитофлуориметрах с использованием препаратов моноклональных антител, датируются началом 70-х годов XX века, когда появились первые цитофлуориметры, оснащенные аргоновыми и криптоновыми лазерами, что позволило одновременно детектировать красители, содержащие флуоресцеин и родамин [17]. Однако уже в начале 80-х годов с появлением твердотельных лазеров к спектру применяемых флуорохромов был добавлен абсолютно новый класс соединений — фикобилины [18]. К этой группе соединений относятся фикоэритрин (PE) и аллофикоцианин (APC). Уже в конце 80-х годов на основе PE были созданы новые красители, состоящие из двух соединенных вместе флуоресцентных молекул и получившие наименование «тандемных» красителей. К их числу относятся PE-Texas Red, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7 и некоторые другие [9]. Появление этих красителей позволило на приборах, оснащенных только голубым лазером, анализировать до 5 флуоресцентных параметров одновременно. В 90-е годы появляются новые тандемные красители для красного лазера, синтезированные на основе APC, и первые синтетические красители семейства Alexa Fluor [14]. Благодаря этому широкому кругу исследователей становится доступным многоцветный анализ с использованием антител, конъюгированных с флуорохромами, для которых применяются лазеры с длинами волн 407, 488 и 595 нм [13], что позволяет, помимо параметров прямого и бокового светорассеяния, оценивать уровень связывания восьми

антител в одной пробирке. Дальнейшее развитие технологий привело к появлению работ, в которых число одновременно оцениваемых параметров флуоресценции достигло одиннадцати [7]. Следующим шагом стало изобретение красителей на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов, или «квантовых точек» (Qdots или Quantum Dots), а также сравнительно недавно появившихся на рынке флуорохромов семейства Brilliant Violet™, первые упоминания о которых в литературе датируются началом 2012 года [16]. Развитие приборной базы и появление широкого спектра новых синтетических флуоресцентных красителей привели к тому, что в научно-исследовательской практике появился 18-цветный анализ, позволяющий не только детально описать фенотип клеток интереса, но и исследовать их функциональную активность — например, способность к пролиферации, синтезу различных цитокинов и экспрессии сразу нескольких активационных маркеров [5, 6]. Именно подобного рода исследования в настоящее время считаются апогеем развития проточной цитометрии, так как для дальнейшего развития необходимы принципиальные изменения как в самих проточных цитофлуориметрах (например, развитие «масс-цитометрии»), так и в флуорохромах, применяемых для мечения моноклональных антител [4]. Вместе с тем, в нашей стране самыми распространенными остаются проточные цитофлуориметры, предназначенные для определения четырех, пяти или шести флуоресцентных красителей одновременно. Именно поэтому **целью данного исследования** была разработка стандартных подходов для решения задачи по оценке иммунного статуса на одном из таких приборов.

Материалы и методы

В рамках проведения данного исследования использовали периферическую кровь условно здоровых доноров, полученную путем пункции локтевой вены. 50 мкл цельной ЭДТА-стаби-

лизированной крови окрашивали следующими моноклональными антителами (все антитела производства Beckman Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя: HLA-DR-FITC (кат. № IM1638U), CD16-PE (кат. № A07766), CD56-PE (кат. № A07788), CD4-ECD (кат. № 6604727), CD19-ECD (кат. № A07770), CD8-PC5.5 (кат. № A07758), CD3-PC7 (кат. № 737657), CD45-APC (кат. № IM2473). После внесения антител образцы тщательно перемешивали, затем инкубировали при комнатной температуре 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации при постоянном перемешивании добавляли 500 мкл лизирующего раствора VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США), инкубировали еще 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Анализ образцов проводили на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов набирали не менее 5000 лимфоцитов.

Для настройки напряжения по каналам флуоресценции использовали образцы крови, окрашенные каждым из антител по отдельности. Напряжение выставляли таким образом, чтобы популяции лимфоцитов, не связавшие то или иное антитело, находились ровно по центру первой декады логарифмической шкалы (рис. 1, А-Д). Напряжение по APC – флуорохрому, с которым были конъюгированы антитела против CD45 – выставляли так, чтобы лимфоциты, обладающие самой высокой среди всех лейкоцитов периферической крови плотность CD45 на своей поверхности, находились по центру третьей декады логарифмической шкалы (рис. 1Е). По завершении настройки напряжения на каналах флуоресценции проводили настройку цветовой компенсации. Для данной процедуры также использовали указанные выше образцы периферической крови, окрашенные каждым из антител по отдельности, и частицы Flow Set Pro (кат. № A63492, Beckman Coulter, США). Настройку проводили в автоматическом режиме с исполь-

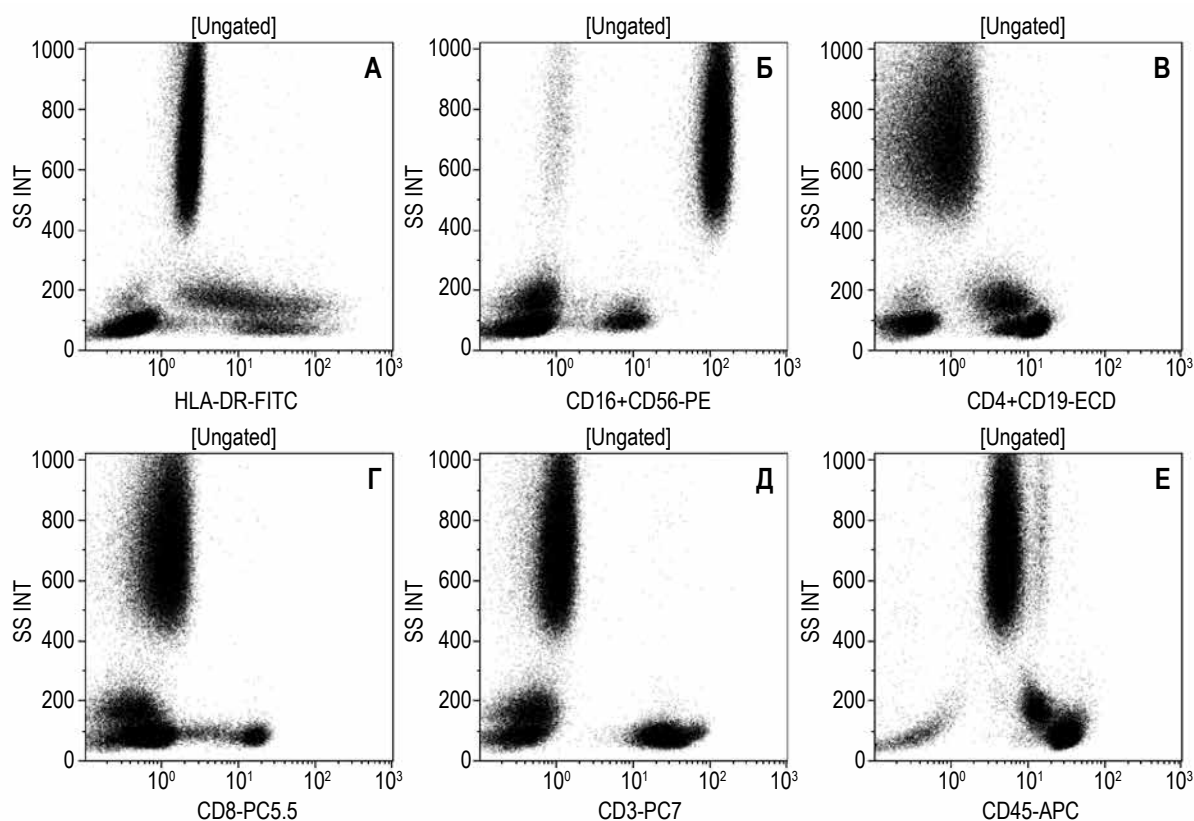


Рисунок 1. Настройка напряжения по каналам флуоресценции

Примечание. По оси абсцисс – боковое светорассеяние (SS), по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против HLA-DR, конъюгированных с ФИТЦ (гистограмма А), против CD16 и CD56, конъюгированных с РЕ (гистограмма Б), против CD4 и CD19, конъюгированных с ECD (гистограмма В), против CD8, конъюгированных с PC5.5 (гистограмма Г), против CD3, конъюгированных с PC7 (гистограмма Д), и против CD45, конъюгированных с APC (гистограмма Е). На гистограммах А-Д напряжение выставлено таким образом, чтобы лимфоциты, не несущие соответствующих антигенов, находились в пределах первой декады логарифмической шкалы; для CD45-APC напряжение установлено так, чтобы популяция лимфоцитов – клеток, обладающих слабым боковым светорассеянием и имеющих высокую плотность CD45 – находилась в третьей декаде логарифмической шкалы флуоресценции.

зованием приложения «AutoSetup Application Definition...» программного обеспечения Navios™ Software v1.2. Проверку корректности настройки параметров цветовой компенсации осуществляли по образцам периферической крови условно здоровых доноров и реагентам Immuno-Trol Cells (кат. № 6607077, Beckman Coulter, США), окрашенными всеми антителами одновременно. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Navios™ Software v1.2 и Kaluza™ v1.2 (Beckman Coulter, США).

Результаты и обсуждение

В понятие оценки «иммунного статуса» или «исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови» [1] при помощи проточной цитофлуориметрии включено определение абсолютного и относительного количества Т-клеток ($CD3^+CD19^-$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), В-клеток ($CD3^-CD19^+$), NK-клеток ($CD3^-CD56^+$), NKT-клеток ($CD3^+CD56^+$).

Однако, любой протокол измерения в проточной цитометрии начинается с выделения популяции «интереса», в нашем случае — это лимфоциты. Существует несколько способов выделить популяцию лимфоцитов. Во-первых, при помощи параметров светорассеяния. Преимуществом данного метода является то, что любой проточный цитометр оснащен детекторами для регистрации параметров прямого и бокового светорассеивания, и подобного рода выделение лимфоцитов не требует дополнительных финансовых затрат. В то же время существует ряд ограничений по использованию данного метода — при некачественном лизисе эритроцитов существуют сложности с отделением популяции лимфоцитов от популяции дебриса [2]. Во-вторых, это применение антител против молекулы CD45, которая является «пан-лейкоцитарным» маркером и представлена на всех лейкоцитах, но с разной интенсивностью мембранной экспрессии. При использовании этой стратегии по гистограмме «боковое светорассеяние против флуоресценции CD45» лимфоцитами является популяция клеток, обладающая самой яркой экспрессией CD45 и наименьшими параметрами бокового светорассеивания. Основным недостатком этого метода является необходимость использования дополнительного моноклонального антитела, что в целом способно увеличить стоимость исследования. Кроме того, это требует задействовать отдельный флуоресцентный канал для измерения интенсивности флуоресценции CD45, что накладывает определенные ограничения в случае работы приборов с малым количеством одновременно анализируе-

мых флуоресцентных сигналов. Преимуществом же является независимость от качества лизиса, так как практически всегда можно выделить популяцию интереса, что и послужило причиной внесения данного подхода выделения лимфоцитов в международные рекомендации по клеточному анализу [12].

Отдельного внимания заслуживает возможность применения антител против CD45 для исключения примеси моноцитов из зоны анализа. Появление в периферической крови большого количества «провоспалительных» моноцитов способно существенно влиять на качество выявления популяции лимфоцитов. Для исключения моноцитов из популяции лимфоцитов необходимо использовать дополнительные моноцитарные маркеры, такие как CD14. Для решения этой проблемы проводилось выделение лимфоцитов в два этапа. Первым этапом было выделение области «CD45⁺⁺⁺» на диаграмме «боковое светорассеяние против флуоресценции CD45» (рис. 2А). Второй этап заключался в удалении моноцитов из зоны анализа по двухпараметрической диаграмме «флуоресценция CD16⁺CD56 против флуоресценции CD4⁺CD19⁺». Данный способ основан на том, что на поверхности моноцитов, как «классических», так и «провоспалительных», представлен CD4, а в случае последних — еще и CD16, тогда как среди лимфоцитов не встречаются клетки, способные одновременно экспрессировать оба этих маркера. В дальнейшем был сделан «логический» гейт, включающий в себя клетки, наиболее ярко экспрессирующие CD45 и при этом не экспрессирующие на своей поверхности CD4 и CD16 одновременно. В стандартном программном обеспечении цитометра Navios это выглядит следующим образом: «LY = CD45⁺⁺⁺ AND Lymphocyte AND (NOT Mono)». В дальнейшем клетки, отвечающие указанным выше условиям, рассматриваются в качестве популяции лимфоцитов (рис. 2, А-В).

После того, как популяция клеток интереса — лимфоцитов — получена, имеет смысл переходить к ее анализу. На качество анализа или чистоту выделения популяций лимфоцитов в этом случае существенное влияние может оказывать выбор флуорохромов, с которыми конъюгированы антитела. На сайтах производителей антител и в зарубежной литературе приведены основные принципы формирования панелей для исследований [10, 11], на основании которых и была сформирована приводимая в данной статье комбинация антител. Во-первых, антитела для «пан-лейкоцитарных» маркеров (CD45) и маркеров, применяемых для выделения отдельных субпопуляций клеток (CD3), были конъюгированы с флуорохромами (APC и PC7 соответственно),

которые не обладают какой-либо значимой засветкой на остальные каналы флуоресценции, то есть коэффициенты компенсации равны нулю (рис. 2Г). Во-вторых, пары взаимоисключающих маркеров, ко-экспрессия которых в норме на клетках не наблюдается или крайне незначительна (например, CD56 и CD19 или CD4 и CD8), помещены на соседние каналы с сильной перекрестной засветкой (PE и ECD или ECD и PC5.5 соответственно). В-третьих, активационный маркер с низким и к тому же переменным уровнем экспрессии, как это характерно для HLA-DR на Т-клетках, помещен на канал (FL1 для регистрации флуоресценции ФИТЦ), который не подвергается неспецифическому влиянию со стороны флуорохромов с других каналов. Данное обстоятельство позволяет получать наиболее адекватные данные об уровне экспрессии данного маркера на клетках интереса вне зависимо-

сти от настроек цветовой компенсации и уровня экспрессии антигенов, расположенных на соседних каналах. Кроме того, для FL1 (антитела против HLA-DR, конъюгированные с ФИТЦ) и FL2 (антитела против CD16 и CD56, конъюгированные с PE) также учитывается принцип взаимоисключающей экспрессии маркеров, детектируемых на соседних каналах флуоресценции. Соблюдение указанных выше принципов создания комбинаций антител для анализа позволяет существенно упростить как настройку цветовой компенсации, так и дальнейший контроль за стабильностью данных параметров настройки прибора при проведении серий исследований.

Для выделения основных популяций лимфоцитов периферической крови был использован следующий алгоритм («тактика гейтирования»), основанный на применении двухпараметрических гистограмм «флуоресценция-против-флу-

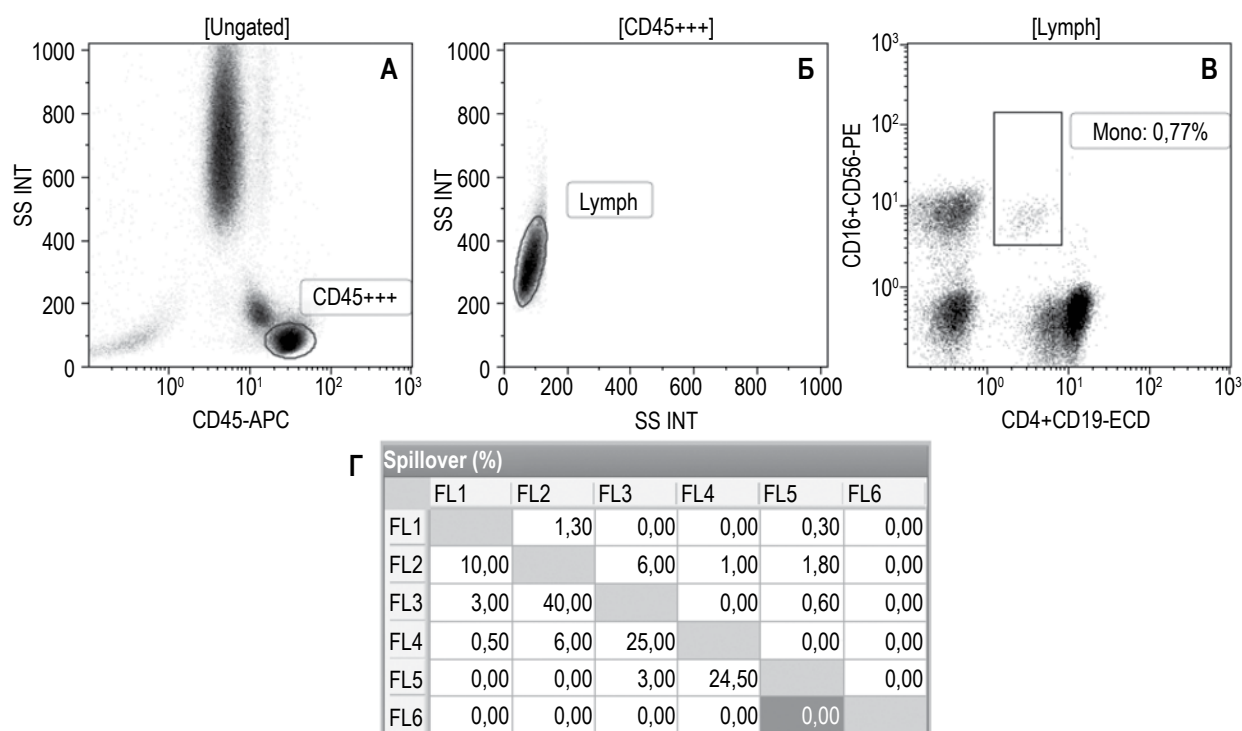


Рисунок 2. «Тактика гейтирования» лимфоцитов и пример матрицы цветовой компенсации

Примечание. Гистограмма А: выделение популяции лимфоцитов по параметрам бокового светорассеяния (ось ординат) и уровню экспрессии CD45 (ось абсцисс), выделенная область «CD45+++» содержит лимфоциты. Гистограмма Б: по оси абсцисс – боковое светорассеяние, по оси ординат – прямое светорассеяние; показаны только клетки из области «CD45+++» гистограммы А; в области «Lymph» находятся клетки с низкой интенсивностью флуоресценции по FS и SS (при помощи этого региона из зоны анализа исключаются разрушенные и слипшиеся лимфоциты, а также большинство моноцитов). Гистограмма В: по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD4 и CD19, по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против CD16 и CD56; на гистограммы показаны клетки, находящиеся в областях «CD45+++» гистограммы А и области «Lymph» гистограммы Б; область «Моно» – «провоспалительные» моноциты с фенотипом CD4^{low}CD16⁺, которые не удалось исключить из зоны анализа при помощи последовательного иммунологического гейтирования, показанного на гистограммах А и Б. Г – пример матрицы цветовой компенсации, полученной при настройке проточного цитофлуориметра: каналы FL1, FL2, FL3, FL4, FL5 и FL6 предназначены для регистрации флуоресценции антител, конъюгированных с ФИТЦ, PE, ECD, PC5.5, PC7 и APC соответственно. По горизонтали в процентах показаны коэффициенты компенсации засветки флуорохромов из вертикальных столбцов в данный канал.

оресценции». В первую очередь была построена диаграмма, где по оси абсцисс приведена флуоресценция антител против CD3, а по оси ординат — флуоресценция антител против CD19 и CD4 (рис. 3А). Использование данной гистограммы позволяет идентифицировать популяции В-лимфоцитов как CD3 негативные, но позитивные по CD4⁺19 клетки (12,32% от общего числа лимфоцитов в приведенном примере исследования), а также популяцию Т-хелперов как дважды позитивные клетки (51,94% от общего числа лимфоцитов). Использование антител против поверхностных антигенов, характерных для разных популяций клеток (никогда не ко-экспрессирующихся ни в норме, ни при большинстве патологических состояний — CD4 для Т-хелперов и CD19 для В-лимфоцитов), но конъюгированных с одним и тем же флуорохромом (в нашем случае — ECD, для регистрации которого используется канал FL3), возможно лишь в том случае, когда для разделения данных популяций клеток применяется как минимум еще одно антитело (CD3 как маркер для выделения популяции Т-хелперов). Причем для детектирования последнего используется отдельный канал флуоресценции (в нашем случае — канал FL5 для регистрации флуоресценции PC7). Примеры подобного рода исследований встречаются как на старых «малоцветных» приборах [8], для кото-

рых они, собственно, и были разработаны, так и не потеряли своей актуальности и в настоящее время при десяти- и более многоцветном анализе [3]. Хотя в нашей стране такой подход не получил должного распространения, особенно если принять во внимание приборную базу отечественных лабораторий. Особое внимание следует уделить тому, что при использовании на одном флуоресцентном канале антител против CD4 и CD19 крайне важно провести «логическое» гейтирование лимфоцитов с исключением примеси популяции моноцитов. Если этого сделано не будет, то примесь моноцитов, которые слабо позитивны по CD4 и не несут CD3, будет ложно отнесена к В-клеткам, что скажется на качестве получаемых результатов.

На рисунке 3 также приведены примеры остальных гистограмм, которые используются для выделения основных популяций лимфоцитов периферической крови. На гистограмме Б (флуоресценция CD3 против флуоресценции CD8) выделяются цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD3⁺CD8⁺, содержание которых в данном образце составляет 16,69% от общего числа лимфоцитов. Далее на гистограмме В выделяют популяции натуральных киллеров (14,46% от общего числа лимфоцитов), негативных по CD3 и позитивных по CD16 и CD56, а также NKT-клетки, экспрессирующие одновременно CD3

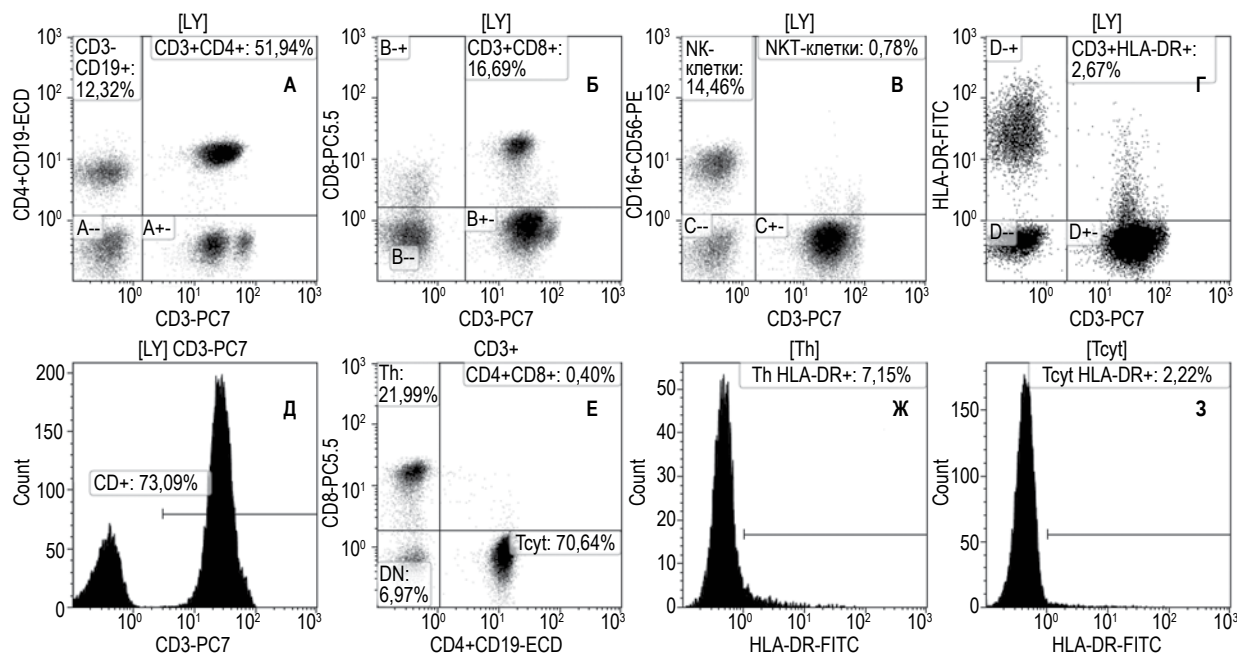


Рисунок 3. Гистограммы, необходимые для выделения основных популяций лимфоцитов периферической крови

Примечание. На гистограммах А-Д в процентах приведено содержание основных популяций лимфоцитов периферической крови от общего числа лимфоцитов, выделенных при помощи последовательного гейтирования, приведенного на рисунке 2 (гистограммы А-В). Гистограмма Е — распределение Т-лимфоцитов (показаны только CD3-позитивные клетки, выделенные на гистограмме Д) по уровню экспрессии CD4 и CD8. Гистограммы Ж и З — экспрессия HLA-DR Т-хелперами (область «Th» гистограммы Е) и цитотоксическими Т-клетками (область «Tc» гистограммы Е) соответственно. Комментарии в тексте.

и маркеры, характерные для НК-клеток. Кроме того, наличие в составе панели антител против HLA-DR, рассматриваемого в качестве маркера «поздней активации» Т-лимфоцитов, позволяет определить процент активированных Т-клеток, который в данном образце равен 2,67% от общего числа лимфоцитов. Для определения общего числа Т-клеток в проанализированном образце можно использовать однопараметрическую гистограмму (рис. 3Д), где по оси абсцисс — интенсивность флуоресценции антител против CD3, а на оси ординат — количество клеток, обладающих тем или иным уровнем экспрессии CD3. Как уже отмечалось выше, при настройке напряжения негативные клетки помещались в пределы первой декады логарифмической шкалы, поэтому особого труда выделить CD3-позитивные клетки не составляет (73,09% от лимфоцитов).

Особое внимание при проведении иммунофенотипирования следует уделить подсчету контрольных сумм, характеризующих качество и достоверность проведенного исследования. Пожалуй, главной из них является сумма Т-, В- и НК-клеток [15], которая должна находиться в пределах 100% ($100\% \pm 5\%$). В приведенном на рисунке 3 примере Т-лимфоциты составляют 73,09%, В-лимфоциты — 12,32%, натуральные киллеры — 14,46%. При помощи нехитрых подсчетов контрольная сумма будет равна 99,87%, что полностью соответствует нормативным значениям. Еще одним «внутренним» контролем может являться то положение, что сумма Т-хелперов, выделенных при помощи CD3 и CD4, и цитотоксических Т-клеток с фенотипом $CD3^+CD8^+$ должна равняться общему числу CD3-позитивных клеток $\pm 5\%$ [12]. Хотя даже в рамках приведенных выше рекомендаций допускается расхождение не более 10% из-за при-

сутствия в образце $\gamma\delta$ Т-клеток (увеличение числа дважды-негативных клеток в образце, что сопровождается уменьшением суммарного показателя Т-лимфоцитов) или наличия большого числа клеток, одновременно экспрессирующих CD4 и CD8. В последнем случае сумма $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ может существенно превосходить общее число $CD3^+$ клеток и выходить за прописанные в рекомендациях нормативы. Поэтому при помощи дополнительной гистограммы распределения Т-клеток по уровню экспрессии CD4 и CD8 можно более точно выделить не только Т-хелперы (рис. 3Е, область «Th») и цитотоксические Т-клетки (рис. 3Е, область «Тсyt»), но и популяции Т-лимфоцитов, несущие как оба антигена одновременно (область « $CD4^+CD8^+$ »), так и лишенные их обоих (область «DN»). Клиническая значимость этих параметров в настоящее время обсуждается при широком круге патологических состояний [2]. Кроме того, с использованием гистограмм распределения Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток по уровню экспрессии HLA-DR (рис. 3Ж и 3 соответственно) можно оценить процент активированных клеток среди данных популяций Т-лимфоцитов.

Таким образом, применение шестицветного цитофлуориметрического анализа не только способно сократить время и себестоимость постановки реакции, увеличить пропускную способность прибора, но и существенно расширить спектр результатов, получаемых при анализе одного образца. При этом в данной работе не рассматриваются такие показатели, как экспрессия CD56 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках, равно как и экспрессия CD8 натуральными киллерами, имеющие в настоящее время больше научное, чем клинико-диагностическое значение.

Список литературы / References

1. Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Хайдуков С.В. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С.255-268. [Bađun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Khaidukov S.V. Stadartizovannaya tekhnologiya "issledovanie subpopuliasionnogo soslava limphocytov pirifericheskoy krovi s primeneniem protochnih cytophluorimetrov-analizatorov" (proekt). *Meditinskaya immunologia = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no.3. pp. 255-268. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А.. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрОРАН, 2013. 552 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in medicine and biology]. Ekaterinburg: RIO UrORAN, 2013. 552 p.
3. Autissier P., Soulas C., Burdo T.H., Williams K.C. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A*, 2010, Vol. 77. pp. 410-419.
4. Bendall S.C., Nolan G.P., Roederer M., Chattopadhyay P.K. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, pp. 323-332.
5. Chattopadhyay P.K., Price D.A., Harper T.F., Betts M.R., Yu J., Gostick E., Perfetto S.P., Goepfert P., Koup R.A., De Rosa S.C., Bruchez M.P., Roederer M. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12, pp. 972-977.

6. Chattopadhyay P.K., Roederer M. Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods*, 2012, Vol. 57, pp. 251-258.
7. De Rosa S.C., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A., Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat. Med.*, 2001, Vol. 7, pp. 245-248.
8. Horvatinovich J.M., Sparks S.D., Mann K.P. Establishing a pure lymphocyte gate for subset analysis by flow cytometry. *Cytometry*, 1996, Vol. 26, pp. 172-177.
9. Lansdorp P.M., Smith C., Safford M., Terstappen L.W., Thomas T.E. Single laser three color immunofluorescence staining procedures based on energy transfer between phycoerythrin and cyanine 5. *Cytometry*, 1991, Vol. 12, pp. 723-730.
10. Maecker H.T., Frey T., Nomura L.E., Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A*, 2004, Vol. 62, pp. 169-173.
11. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.*, 2007, Vol. 27, pp. 469-485.
12. Mandy F.F., Nicholson J.K., McDougal J.S.; CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4⁺ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm. Rep.*, 2003, Vol. 52, RR-2, pp. 1-13.
13. Roederer M., De Rosa S., Gerstein R., Anderson M., Bigos M., Stovel R., Nozaki T., Parks D., Herzenberg L., Herzenberg L. 8 color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. *Cytometry*, 1997, Vol. 29, pp. 328-339.
14. Roederer M., Kantor A.B., Parks D.R., Herzenberg L.A. Cy7PE and Cy7APC: bright new probes for immunofluorescence. *Cytometry*, 1996, Vol. 24, pp. 191-197.
15. Schenker E.L., Hultin L.E., Bauer K.D., Ferbas J., Margolick J.B., Giorgi J.V. Evaluation of a dual-color flow cytometry immunophenotyping panel in a multicenter quality assurance program. *Cytometry*, 1993, Vol. 14, pp. 307-317.
16. Soghoian D.Z., Jessen H., Flanders M., Sierra-Davidson K., Cutler S., Pertel T., Ranasinghe S., Lindqvist M., Davis I., Lane K., Rychert J., Rosenberg E.S., Piechocka-Trocha A., Brass A.L., Brenchley J.M., Walker B.D., Streeck H. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci. Transl. Med.*, 2012, Vol. 4, pp. 123-125.
17. Steinkamp J.A., Orlicky D.A., Crissman H.A. Dual-laser flow cytometry of single mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 1979, Vol. 27, pp. 273-276.
18. Telford W.G. Lasers in flow cytometry. *Methods Cell. Biol.*, 2011, Vol. 102, pp. 375-409.

Авторы:

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, отдел иммунологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург; доцент школы биомедицины, Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

Субботовская А.И. — к.м.н., младший научный сотрудник, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg; Associate Professor, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Subbotovskaya A.I., PhD (Medicine), Junior Research Associate, E.N. Meshalkin Research Institute of Circulation Pathology, Russian Ministry of Health Care, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 29.04.2014
Принята к печати 10.06.2014

Received 29.04.2014
Accepted 10.06.2014

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОБОСТРЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГАСТРИТА

Матвеева Л.В.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Резюме. Цель работы — выявить и оценить особенности иммунного реагирования основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови при обострении хронического гастрита в зависимости от стадии атрофии слизистой оболочки желудка. Проведено комплексное обследование 122 больных с обострением хронического гастрита. У больных хроническим очагово-атрофическим и атрофическим гастритом в стадии обострения в периферической крови определялись увеличение количества $CD3^+$ лимфоцитов, $CD4^+$, $CD8^+$ и $CD16^+$ клеток, снижение содержания $CD19^+$ лимфоцитов. При обострении неатрофического гастрита повышение количества $CD4^+$ и $CD16^+$ клеток сочеталось с уменьшением численности $CD8^+$ и $CD19^+$ лимфоцитов. Одновременное повышение численности $CD4^+$ клеток и уровня IL-2 и IFN γ в периферической крови больных свидетельствует об активации клеточного иммунитета, индуцирующими факторами которой могут являться как дисплазия слизистой оболочки желудка, так и хеликобактер-герпесвирусная микст-инфекция. Превалирование повышения количества IL-2 и IFN γ над уровнем IL-4 и IL-10 указывает на Th1-направленность иммунного ответа. Иммунорегуляторный индекс при обострении неатрофического гастрита превышал значения клинически здоровых лиц и больных атрофическим гастритом. Статистически значимые различия между группами больных в зависимости от наличия и выраженности атрофии слизистой оболочки желудка определялись по количеству $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ лимфоцитов, иммунорегуляторному индексу, а также сывороточному уровню IL-2.

Ключевые слова: субпопуляции лимфоцитов, интерлейкины, интерферон, хронический гастрит, атрофия слизистой оболочки желудка

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE AMONG MAJOR LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS FROM PERIPHERAL BLOOD DURING EXACERBATION OF CHRONIC GASTRITIS

Matveeva L.V.

N.P. Ogarev Mordovsky State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to identify and evaluate the features of immune response for main subpopulations of peripheral blood lymphocytes during exacerbation of chronic gastritis, depending on

Адрес для переписки:

Матвеева Любовь Васильевна
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»
430032, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Ульянова, 26а.
Тел.: 8 (8342) 35-25-16.
Факс: 8 (8342) 32-19-83.
E-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Address for correspondence:

Matveeva Lubov' V.
N.P. Ogarev Mordovsky State University
430032, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,
Ulyanov str., 26a.
Phone: 7 (8342) 35-25-16.
Fax: 7 (8342) 32-19-83.
E-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Образец цитирования:

Матвеева Л.В., «Особенности иммунного реагирования основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови при обострении хронического гастрита» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 27-32.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-27-32
© Матвеева Л.В., 2015

For citation:

L.V. Matveeva, "Features of immune response among major lymphocyte subpopulations from peripheral blood during exacerbation of chronic gastritis", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 27-32.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-27-32
DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-27-32>

the severity of gastric mucosal atrophy. A comprehensive survey of 122 patients with acute exacerbation of chronic gastritis was performed. The patients with chronic focal-atrophic and atrophic gastritis in acute stage were characterized by increased numbers of CD3⁺ lymphocytes, CD4⁺, CD8⁺ and CD16⁺ cell populations, decreased CD19⁺ lymphocyte counts in peripheral blood. During exacerbation of non-atrophic gastritis, an increase of CD4⁺ and CD16⁺ cell counts was associated with a decrease in the CD8⁺ and CD19⁺ lymphocytes. A concomitant increase in CD4⁺ cell numbers, as well as elevated IL-2 and IFN γ levels in peripheral blood of patients may reflect activation of cellular immunity, which could be induced by the dysplasia of gastric mucosa and co-infection with *Helicobacter/herpesvirus*. Domination of increased IL-2 and IFN γ over IL-4 and IL-10 levels suggests the Th1-profile of cellular immune response. Upon exacerbation of non-atrophic gastritis, the immunoregulatory index exceeded the values of clinically healthy subjects and those of patients with atrophic gastritis. We observed statistically significant differences for CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ lymphocytes, immunoregulatory index, and serum levels of IL-2, depending on presence and severity of gastric mucosal atrophy.

Keywords: lymphocyte subpopulations, interleukins, interferon, chronic gastritis, gastric mucosa atrophy

Введение

Актуальность исследования иммунопатогенетических особенностей течения хронического гастрита определяется ростом заболеваемости населения болезнями органов пищеварения [3] и выявляемостью при них иммунных изменений. Так, в Республике Мордовия количество лиц с впервые установленным диагнозом гастрита и дуоденита на 100 000 населения в 2005 г. составляло 438, а в 2010 г. — 475. Считается [2, 7, 10], что хронический гастрит вследствие сочетания иммунной дисфункции и нарушения архитектоники слизистой оболочки желудка (СОЖ) может являться предъязвенным состоянием, а при развитии метаплазии и неоангиогенеза — предраковым. Ранее при хроническом гастрите установлена корреляционная связь длительности заболевания и содержания в периферической крови CD3⁺, CD4⁺ лимфоцитов (отрицательная), CD8⁺ и CD19⁺ клеток (положительная) [5]. Имеются результаты исследований иммунных изменений при хроническом хеликобактерном гастрите [2]: уменьшение у больных численности CD4⁺ клеток с хелперной активностью (Th) и CD19⁺ лимфоцитов на фоне увеличения количества CD3⁺, CD8⁺ и CD16⁺ лимфоцитов, особенно у обследуемых с выраженными изменениями хелик-теста. Представленные клинко-иммунологические данные не учитывают наличие и выраженность атрофического процесса СОЖ, поэтому определение субпопуляционного состава лимфоцитов крови и их функциональной активности (продукция иммуноцитоклинов) в зависимости от стадии атрофии СОЖ у больных хроническим гастритом имеет научно-практический интерес.

Цель исследования — выявить и оценить особенности иммунного реагирования основных субпопуляций лимфоцитов периферической

крови при обострении хронического гастрита в зависимости от стадии атрофии СОЖ.

Материал и методы

Проведено комплексное клинко-лабораторное и инструментальное обследование после получения информированного согласия 122 больных хроническим гастритом в стадии обострения. Мужчины составили 55,7%, женщины — 44,3%, средний возраст — 43,9 $\pm$ 7,5 года, длительность заболевания — 13,2 $\pm$ 5,1 года. Больные были разделены на группы в зависимости от стадии атрофии, определенной морфологически [1]. 1-ю группу составили 42 пациента с хроническим неатрофическим гастритом, 2-ю — 40 больных очагово-атрофическим (I–II ст.) гастритом, 3-ю — 40 пациентов с распространенным атрофическим (III–IV ст.) гастритом.

В контрольную группу по принципу случайной выборки вошли 40 здоровых добровольцев (мужчины — 52,5%, женщины — 47,5%, средний возраст — 36,2 $\pm$ 10,3 года), не имеющих на момент обследования признаков обострения гастропатологии.

Взятие крови на иммунологическое исследование проводилось в утренние часы натощак из локтевой вены в объеме 3 мл в пробирку с ЭДТА, 3 мл — в пробирку без консервантов. Иммунофенотип лимфоцитов по CD-антигенам (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45, CD56) определяли иммунофлуоресцентным методом на проточном цитометре Cytomics FC 500 с применением моноклональных антител производства «Beckman Coulter» (США), меченных FITC (изотиоцианат флуоресцеина), PE (фикоэритрин), PC5 (комплекс PE с цианином-5) и ECD (комплекс PE с техасским красным). Для удале-

ния эритроцитов пробоподготовку проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора OptiLyse C (Beckman Coulter, США). В сыворотке крови иммуноферментным методом на анализаторе «Personal Lab TM» (Adaltis Italia S.p.A., Италия) исследовали количества IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ с применением наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов непараметрического анализа программы Microsoft Excel 7.0. Результаты отражали в виде медиан (Me), 25 и 75 перцентилей. Сравнение показателей проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Значимыми различия между группами считали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Относительное количество CD3⁺ лимфоцитов у обследованных больных 1-й группы при

сравнении с данными клинически здоровых лиц проявляло тенденцию к увеличению, 2-й и 3-й групп – повышалось (табл. 1). Количество показателя у больных 1-й, 2-й и 3-й групп в пределах значений нормы (60-80%) определилось в 83,3, 75 и 70% случаев соответственно, повышалось – в 9,52, 17,5 и 15% случаев.

Абсолютные значения CD3⁺ клеток были меньше нижней границы нормы ($1,1 \times 10^9/\text{л}$) у 9,52, 10 и 15% больных 1-й, 2-й и 3-й групп, превышали верхнюю границу ($2,8 \times 10^9/\text{л}$) у 12,5 и 10% больных 2-й и 3-й групп. Показатель у больных очагово-атрофическим гастритом был большим, чем при обострении неатрофического гастрита ($p < 0,05$).

Относительное количество CD4⁺ лимфоцитов у больных превышало значения клинически здоровых лиц ($p < 0,01-0,05$), а при неатрофическом гастрите – и значения 3-й группы ($p < 0,01$). Абсолютная численность CD4⁺ клеток в 1-й, 2-й и 3-й группах была меньше нижней границы нор-

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ (Me [Q25; Q75])

Показатели		Контрольная группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Т-клетки (CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺)	%	66 [62; 72]	70,0 [62; 75]	74 [70; 79]*	71,0 [66; 75]*
	$\times 10^9/\text{л}$	1,350 [1,158; 1,624]	1,527 [1,294; 1,856]*	1,950 [1,469; 2,241]* #	1,780 [1,389; 2,143]*
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	%	41 [35; 48]	48 [43; 56]*	46 [41; 54]*	44 [38; 52]* #
	$\times 10^9/\text{л}$	0,838 [0,762; 1,018]	1,290 [0,907; 1,435]*	1,240 [0,896; 1,405]*	1,065 [0,825; 1,245]*
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	%	24 [16; 27]	20 [13; 25]*	27 [16; 30]* #	28 [19; 32]* #
	$\times 10^9/\text{л}$	0,580 [0,426; 0,620]	0,300 [0,257; 0,487]*	0,690 [0,428; 0,730]* #	0,700 [0,437; 0,749]* #
Индекс соотношения (Т-хелперы / Т-цитотоксические)		1,86 (1,75; 2,08)	2,85 [2,08; 3,59]*	2,25 [1,78; 3,05]*	1,80 [1,56; 2,57]* #
NK-клетки (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺)	%	13 [11; 16]	16 [12; 22]*	17,5 [12; 23]*	20 [14; 22]*
	$\times 10^9/\text{л}$	0,300 [0,206; 0,412]	0,500 [0,393; 0,575]*	0,680 [0,479; 0,720]*	0,950 [0,646; 1,224]*
В-клетки (CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺)	%	15,0 [10; 19]	13,0 [9; 16]	9,0 [6; 12]* #	10,5 [7; 13]* §
	$\times 10^9/\text{л}$	0,330 [0,205; 0,422]	0,260 [0,151; 0,316]	0,191 [0,085; 0,245]* #	0,240 [0,173; 0,297]* §

Примечание. Статистически значимые различия: * – относительно контрольной группы, # – 1-й группы, § – 2-й группы.

мы ($0,75 \times 10^9/\text{л}$) у 7,14, 7,5 и 10% больных, превышала верхнюю границу ($1,2 \times 10^9/\text{л}$) у 42,9, 42,5 и 40% обследуемых. Имеются данные [6] об увеличении лизосомального компартмента у части CD4^+ лимфоцитов здоровых доноров при их дифференцировке аналогично процессам в CD8^+ клетках, что сопровождается повышением уровня перфорина и способности к дегрануляции, TCR-зависимой цитотоксичности. Превалирование численности CD4^+ лимфоцитов у больных над значениями здоровых лиц свидетельствует об участии Th в воспалительном и атрофическом процессах в СОЖ.

У больных хроническим атрофическим гастритом количество CD8^+ лимфоцитов статистически значимо превышало значения контрольной и 1-й групп. Абсолютные значения Т-клеток с цитотоксическим потенциалом были меньше нижней границы нормы ($0,3 \times 10^9/\text{л}$) у 28,6, 12,5 и 10% больных 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно, больше верхней границы ($0,7 \times 10^9/\text{л}$) у 7,14, 20 и 25% больных.

Индекс соотношения $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ в 1-й группе больных превышал значения контрольной и 3-й групп, соответствуя индивидуальным изменениям Т-лимфоцитов с хелперной и цитотоксической активностью.

Численность CD16^+ клеток в периферической крови обследованных больных превышала значения показателя здоровых лиц и возрастала с увеличением стадии атрофии СОЖ. Известно, что CD16^+ рецептор участвует в реализации антителозависимой клеточной цитотоксичности. Установлено [8], что при обострении хронического гастрита у больных выявляются повышенные титры IgG к антигенам герпесвирусов, суммарных антител (САТ) к *CagA Helicobacter pylori*. Количество серопозитивных лиц по антителам к антигенам герпесвирусов и их титру возрастало с увеличением стадии атрофии СОЖ, по САТ к *CagA Helicobacter pylori* — уменьшалось. Увеличение численности CD16^+ лимфоцитов при обострении хронического гастрита может быть обусловлено хеликобактер-герпесвирусной микст-инфекцией, а реализация их цитотоксичности — способствовать атрофии СОЖ. Значимых различий между группами больных по количеству естественных киллерных клеток не наблюдалось, что, возможно, связано с изменениями инфекционного компонента воспалительного процесса.

Относительное и абсолютное количество CD19^+ лимфоцитов во всех группах больных было меньше значений контрольной группы ($p < 0,05$ —

0,01), что характерно для активного воспалительного процесса и согласуется с имеющимися научными данными [2, 9]. Абсолютные значения показателя меньше нижней границы нормы ($0,1 \times 10^9/\text{л}$) определились у 7,14, 30 и 17,5% больных 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно, выше верхней границы ($0,5 \times 10^9/\text{л}$) — у 10 и 17,5% больных 2-й и 3-й групп.

Пролиферация, дифференцировка и функциональная активность субпопуляций лимфоцитов регулируются ауто-, пара- и эндокринным действиями цитокинов.

Сывороточная концентрация IL-2 у обследованных больных превышала ($p < 0,001$) значения здоровых лиц. Статистически значимое увеличение уровня исследуемого цитокина определено у больных 3-й группы относительно 1-й — на 170% ($p < 0,01$) и 2-й групп — на 117% ($p < 0,05$). Повышение IL-2, медиатора пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов, максимальное при распространенном атрофическом гастрите, может индуцировать повреждающее действие цитотоксических лимфоцитов. Имеются данные о стимуляции IL-2 продукции гастрина и гистамина клетками СОЖ, что усиливает кислото- и пепсинообразование, уменьшает продукцию гастромукопротеидов [10]. С другой стороны, индуцированная IL-2 секреция гастрина, ацетилхолина может повышать уровень Ca^{2+} в клетках СОЖ, способствуя увеличению количества цГМФ и активации синтеза ДНК, тем самым клеточной пролиферации; последующее накопление цАМФ стимулирует дифференцировку клеток [7].

Концентрация IFN γ в сыворотке крови больных превышала ($p < 0,001$) значения клинически здоровых лиц: в 1-й группе — на 256%, во 2-й — на 154,8%, в 3-й — на 222%. IFN γ может способствовать активации CD8^+ лимфоцитов, усилению цитотоксичности CD16^+ клеток, поглотительной, киллинговой, презентирующей функций макрофагов, экспрессии молекул МНС II класса эпителиоцитами, выработки IgG $_2$ плазматическими клетками [11].

Уровень IL-4 в 1-й группе больных был выше значений здоровых лиц в 1,8 раза, во 2-й — в 2,2 раза ($p < 0,05$), в 3-й — в 2,3 раза ($p < 0,05$). Исследование содержания IL-10 у обследованных больных выявило тенденцию к его увеличению относительно значений контрольной группы, статистически значимых отличий между группами не наблюдалось. Ранее установлено, что IL-4 и IL-10 могут ингибировать цитотоксичность

макрофагов и секрецию нейтрофилами провоспалительных цитокинов за счет уменьшения специфичных мРНК на поздней стадии процесса активации нейтрофилов [8], стимулировать ангиогенез [3], способствуя тем самым восстановлению архитектоники СОЖ при стихании воспалительного процесса.

Заключение

У больных хроническим очагово-атрофическим и распространенным атрофическим гастритом в стадии обострения определялись изменения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови: увеличение количества $CD3^+$ лимфоцитов, $CD4^+$, $CD8^+$, и $CD16^+$ клеток, снижение содержания $CD19^+$ лимфоцитов. При обострении неатрофического гастрита повышение количества $CD4^+$ и $CD16^+$ клеток сочеталось с уменьшением численности $CD8^+$ лимфоцитов. Одновременное повышение численности $CD4^+$ клеток и уровня IL-2 и IFN γ в периферической

крови больных свидетельствует об активации клеточного иммунитета, индуцирующими факторами которой могут являться как дисплазия СОЖ, так и хеликобактер-герпесвирусная микстинфекция. Превалирование повышения количества IL-2 и IFN γ над уровнем IL-4 и IL-10 указывает на Th1-направленность иммунного ответа. Индекс $CD4^+/CD8^+$ при обострении неатрофического гастрита превышал значения клинически здоровых лиц и больных распространенным атрофическим гастритом. Статистически значимые различия между группами больных в зависимости от наличия и выраженности атрофии СОЖ определялись по количеству $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ лимфоцитов, иммунорегуляторному индексу, а также сывороточному уровню IL-2.

Полученные результаты частично не согласуются с данными ряда научных исследований [2, 5, 12], что объясняется группированием обследуемых по морфологическому признаку, а не по инфекционному, а также возрастными особенностями иммунного статуса.

Список литературы / References

1. Аруин Л.И., Кононов А.В., Мозговой С.И. Новая классификация хронического гастрита. М., 2009. [Aruin L.I., Kononov A.V., Mozgovoy S.I. New classification of chronic gastritis]. Moscow, 2009.
2. Дворкин М.И., Дворкин И.М. Клинико-иммунологические сдвиги у хелик-скомпрометированных больных гастритом // Аллергология и иммунология, 2010. Т. 11, № 1. С. 59-62. [Dvorkin M.I., Dvorkin I.M. Clinical and immunological shifts in helika-compromised patients with gastritis. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology*, 2010, Vol. 11, no. 1, pp. 59-62. (In Russ.)]
3. Матвеева Л.В., Мосина Л.М., Митина Е.А. Интерлейкиновый профиль крови в сопоставлении с выраженностью воспалительного, атрофического и язвенного процессов в слизистой оболочке желудка // Фундаментальные исследования, 2013. № 7, Ч. 1. С. 133-137. [Matveeva L.V., Mosina L.M., Mitina E.A. Interleukin profile blood in comparison with the severity of inflammation, atrophic and ulcerous processes in the gastric mucosa. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Studies*, 2013, no. 7, ch. 1, pp. 133-137. (In Russ.)]
4. Матвеева Л.В., Стенина М.А., Мосина Л.М. Выявляемость специфических вируснейтрализующих и противобактериальных антител при заболеваниях желудка // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2013. № 1. С. 73-78. [Matveeva L.V., Stenina M.A., Mosina L.M. Detectability of specific virusneutralizing in antibacterial antibodies and stomach diseases. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergy, Infectology*, 2013, no. 1, pp. 73-78. (In Russ.)]
5. Митракова Н.Н. Биоаминные и иммунологические показатели в оценке степени активности процесса при хроническом гастрите // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 2007. № 30. С. 105. [Mitrakova N.N. Bioamines and immunological parameters in assessing the activity of the process in chronic gastritis. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2007, no. 30, p. 105. (In Russ.)]
6. Пашенков М.В., Муругина Н.Е., Муругин В.В., Пинегин Б.В. Выявление и характеристика цитолитических $CD8^+$ - и $CD4^+$ -Т-клеток // Иммунология, 2010. № 1. С. 4-12. [Pashhenkov M.V., Murugina N.E., Murugin V.V., Pinegin B.V. Identification and characterization of cytolytic $CD8^+$ - and $CD4^+$ -T cells. *Immunologiya = Immunology*, 2010, no. 1, pp. 4-12. (In Russ.)]
7. Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.

8. Степченко А.А., Филиппенко Н.Г., Прибылова Н.Н., Поветкин С.В. Уровень про- и противовоспалительных цитокинов, фенотип окислительного метаболизма у больных язвенной болезнью, ассоциированной с различными штаммами *Helicobacter pylori* // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2010. № 3. С. 134-139. [Stepchenko A.A., Filippenko N.G., Pribilova N.N., Povetkin S.V. The level of pro-and antiinflammatory cytokines, the phenotype of oxidative metabolism in patients with peptic ulcer disease associated with different strains of *Helicobacter pylori*. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorov'e"* = *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and his Health"*, 2010, no. 3, pp. 134-139. (In Russ.)]
9. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская иммунология. 2009. Т. 11, № 2-3. С. 227-238. [Khajdukov S.V., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Chereshev V.A. Major and small populations lymphocytes peripheral blood human and their normative values (using multicolor cytometric analysis). *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 227-238. (In Russ.)]
10. Чернин В.В. Болезни пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки. М.: МИА, 2010. 528 с. [Chernin V.V. Diseases of the esophagus, stomach and duodenum]. Moscow: MIA, 2010. 528 p.
11. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
12. Helmin-Basa A., Michalkiewicz J., Gackowska L., Kubiszewska I., Eljaszewicz A., Mierzwa G., Bala G., Czerwionka-Szaflarska M., Prokurat A., Marszalek A. Pediatric *Helicobacter pylori* infection and circulating T-lymphocyte activation and differentiation. *Helicobacter*, 2011, Vol. 16, no. 1, pp. 27-35.

Автор:

Матвеева Л.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии, Медицинский институт, ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Author:

Matveeva L.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Medical Institute, N.P. Ogarev Mordovsky State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Поступила 27.08.2014

Отправлена на доработку 30.08.2014

Принята к печати 10.09.2014

Received 27.08.2014

Revision received 30.08.2014

Accepted 10.09.2014

ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СПЕКТРА Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У ВЕТЕРАНОВ СОВРЕМЕННЫХ ВОЙН

Зурочка А.В.¹, Давыдова Е.В.²

¹ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

² ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. Формирование ранних форм хронической ишемии мозга у ветеранов современных войн сопровождается ростом в системном кровотоке популяции Т-лимфоцитов и моноцитов, отражающим активацию центральных механизмов лимфопоэза. На стадии дисциркуляторной энцефалопатии имеет место увеличение в кровотоке пула Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней позитивной активации, что отражает готовность клеток к IL-2 зависимой пролиферации. При прогрессировании хронической ишемии мозга отмечено снижение в кровотоке уровня Т-регуляторных клеток, что может отражать нарушение ауто толерантности по отношению к антигенам мозга.

Ключевые слова: ранние формы хронической ишемии мозга, гемограмма, Т-лимфоциты

CYTOMETRIC ANALYSIS OF THE SPECTRUM SUBPOPULATION OF T LYMPHOCYTES IN THE EARLY FORMS OF CHRONIC BRAIN ISCHEMIA VETERANS OF MODERN WARS

Zurochka A.V.^a, Davydova E.V.^b

^a Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russian Federation

^b South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Formation of the earliest forms of chronic brain ischemia veterans of modern wars accompanied by an increase in the systemic circulation of the population of T lymphocytes and monocytes, reflecting the activation of central mechanisms lymphopoiesis. In step vascular encephalopathy is an increase in circulating pool of T lymphocytes expressing the activation markers early positive reflecting readiness cells to IL-2 dependent proliferation. When progressirovani chronic brain ischemia decreased levels of circulating T-regulatory cells, which may reflect a violation of self-tolerance in relation to brain antigens.

Keywords: early forms of chronic brain ischemia, hemogram, T lymphocytes

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет»
454005, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Eugeniya V.
South Ural State Medical University
454005, Russian Federation, Chelyabinsk,
Vorovskogo str., 64.
Phone: 7 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Зурочка, Е.В. Давыдова, «Цитометрический анализ субпопуляционного спектра Т-лимфоцитов при ранних формах хронической ишемии мозга у ветеранов современных войн» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 33–38.

doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-33-38

© Зурочка А.В. и соавт., 2015

For citation:

A.V. Zurochka, E.V. Davydova, "Cytometric analysis of the spectrum subpopulation of T lymphocytes in the early forms of chronic brain ischemia veterans of modern wars", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 33–38.

doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-33-38

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-33-38

Введение

В России цереброваскулярная патология является у 20% больных активного трудоспособного возраста [1]. В структуре заболеваемости лидирующие позиции занимают ранние формы хронической ишемии мозга (ХИМ) — до 60-76% случаев, включающие начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга (НПНКМ) и дисциркуляторную энцефалопатию 1 стадии (ДЭП-1) [2]. Триггерным фактором формирования ранних форм ХИМ может являться боевое стрессорное расстройство, проявляющееся в последствии соматизацией психовегетативных реакций [3]. Ведущими факторами риска развития ХИМ традиционно считаются гипертензионное и атеросклеротическое поражение сосудов церебрального и прецеребрального бассейнов. Ишемически-гипоксическое повреждение церебральных сосудов приводит к повышению проницаемости ГЭБ и увеличению иммунного присутствия на территории мозга. В современной литературе накоплено немало сведений об участии иммунных механизмов в прогрессии ХИМ, что в значительной степени определяется степенью поражения гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и уровнем иммунной аутоагрессии в отношении тканей головного мозга. Выход в кровь нейрон-специфических белков (НСБ), являющихся аутоантигенами, в силу формирования антенатальной толерантности к тканям ЦНС, способствует реализации аутоиммунных механизмов, направленных против тканей мозга. Известно, что развитие аутоиммунных процессов сопровождается снижением количества Т-регуляторных клеток [4], обладающих супрессорной активностью в отношении иммунных клеток. Естественные Т-регуляторные клетки предупреждают развитие аутоиммунных реакций и принимают непосредственное участие в обеспечении «периферической толерантности», в том числе и к мозговым антигенам. В связи с этим представляет особый интерес исследование наиболее гетерогенной популяции иммунных клеток — Т-лимфоцитов, принимающих непосредственное участие в механизмах иммунного реагирования на снижение толерантности к мозговым антигенам при прогрессии ранних форм ХИМ.

Цель исследования: изучение показателей системы крови, субпопуляционного спектра Т-лимфоцитов, экспрессии маркеров ранней и поздней активации иммунных клеток у ветеранов современных войн с ранними формами хронической ишемии мозга.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе ГБУЗ «Челябинский областной клинический терапевтиче-

ский госпиталь ветеранов войн» и лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии». Обследовано 98 ветеранов современных войн с ранними формами ХИМ в возрасте от 30 до 50 лет. Первую группу (I) составили 42 мужчины с НПНКМ (ср. возраст $48,99 \pm 3,48$ лет); вторую группу (II) — 32 мужчины с диагнозом ДЭП-1, средний возраст $49,3 \pm 2,64$; группу контроля (III) составили 24 здоровых мужчин без субъективных и объективных проявлений цереброваскулярной патологии (средний возраст $45,96 \pm 4,14$ лет). Диагнозы НПНКМ и ДЭП-1 стадии были установлены в соответствии с клинической классификацией сосудистых поражений головного мозга Шмидта Е.В. и соавт. (1974) [5], на основании клинических симптомов заболевания и данных инструментального обследования с помощью ультразвуковой доплерографии магистральных сосудов, транскраниальной доплерографии и электроэнцефалографии. Кровь для исследования забирали из локтевой вены, в утренние часы, спустя 12-14 часов после приема пищи.

Имунофенотипирование клеток крови

Подсчет общего числа лейкоцитов проводился с использованием технологии гетерогенного гейтирования с применением калибровочных частиц Flow — Count Fluorespheres, подсчет процентного соотношения гранулоцитов анализировали на гематологическом анализаторе Coulter LH 500 фирмы Beckman Coulter, США. Дополнительно проводили микроскопию сухих и окрашенных по Романовскому—Гимзе мазков крови.

Имунофенотипирование проводили методом проточной цитометрии на цитометре FC-500 (Beckman Coulter, USA). Лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов производили с использованием лизирующего комплекта реагентов Immuno-Prep™. Для детекции иммунных клеток использованы двух- и четырехпараметрические реагенты серии IOTest: CD3-FITC/CD19-PE/CD4-PE/CD8-PE/CD (16+56+)/CD25-PE/CD HLA-DR-PE/CD95-PE/CD127-PE [6].

Статистическая обработка материала

Для статистической обработки материала использовали пакет прикладных программ Statistica for Windows vers. 6.0. фирмы StatSoft Inc. (США), с определением средней арифметической вариационного ряда (М) и ошибки средней арифметической (m). Достоверность различий оценивали согласно критериям непараметрической статистики (Колмогорова—Смирнова, U-test Манна—Уитни), статистически значимыми считались изменения при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для детального изучения состояния клеточного компартмента иммунной системы пациентов

с ранними формами ХИМ нами были изучены показатели развернутой гемограммы, представленные в таблице 1.

Анализ таблицы 1 показал отсутствие достоверных различий, касающихся показателей красной крови, среди изучаемых групп пациентов с ранними формами ХИМ. Среди клеток лейкоцитарного ряда, отмечено достоверное повышение относительного и абсолютного числа лимфоцитов и абсолютного количества моноцитов в группе пациентов с ДЭП-1 в сравнении с показателями I и III групп, на фоне отчетливой тенденции к повышению общего числа лейкоцитов во II группе, что может отражать активацию центральных механизмов лейкопоэза. Во II группе ветеранов с ХИМ показано повышение показателя тромбоцитокрита, на фоне роста числа тромбоцитов, на уровне тенденции не достигающей степени статистической достоверности.

Определение субпопуляционного спектра Т-лимфоцитов и экспрессии активационных маркеров на Т-лимфоцитах у пациентов с ранни-

ми формами ХИМ показало следующие особенности, представленные в таблице 2.

По результатам исследования (табл. 2), установлено абсолютное повышение в циркуляции общего числа Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и цитотоксических клеток ($CD8^+$) в группе ветеранов с ДЭП-1 в сравнении с I и III группами, отражающее активацию Т-лимфопоэза на уровне костного мозга. Отмечено снижение относительного числа клеток в циркуляции в I и II группах пациентов, возможно, связанное с перераспределительными изменениями пула Т-хелперов и миграцией определенных клонов в патологическую зону при формировании ХИМ. Однако, нами не обнаружено снижения абсолютного количества Т-хелперов и $CD4/CD8$ соотношения в I, II группах, следовательно, продукция хелперных клеток в костном мозге не изменена. Для идентификации Т-НК клеток используется комбинация маркеров Т-популяции и натуральных киллеров ($CD56$). Данный антигенный маркер представляет собой изоформу N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule)

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ КРОВИ ВЕТЕРАНОВ С НПНКМ И ДЭП-1 СТАДИИ

Параметры	Группа I Ветераны с НПНКМ	Группа II Ветераны с ДЭП-1 стадии	Группа III контрольная	p
	M±m	M±m	M±m	
Лейкоциты, $\times 10^9$ л	7,35±0,50	8,84±1,73	7,28±0,83	-
Эритроциты, $\times 10^{12}$ л	4,97±0,10	5,18±0,11	4,84±0,21	-
Hb, г/л	138,2±2,2	135,3±9,17	139,8±4,36	-
Гематокрит (Ht), %	45,2±0,78	46,3±0,36	44,2±0,72	-
Средний корпускулярный объем (СКО), fL	90,8±1,27	89,3±1,61	87,9±1,18	-
Средний корпускулярный объем Hb, пг	29,8±0,44	29,8±0,60	29,6±0,48	-
Средняя концентрация корпускулярного Hb, г/л	319,1±12,69	334,0±12,08	310,0±11,94	-
Тромбоциты (Tr), $\times 10^9$ л	255,6±13,6	293,6±8,3	250,8±11,6	-
Лимфоциты, %	28,6±4,05	34,3±3,60	30,4±3,36	0,04 ₂₋₁
Моноциты, %	9,06±3,54	10,6±2,88	8,0±3,14	-
Сегментоядерные нейтрофилы, %	48,5±2,2	44,6±6,3	53,2±4,1	-
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,75±0,41	4,0±1,0	3,4±0,50	-
Эозинофилы, %	3,68±0,46	4,0±1,52	3,8±0,66	-
Базофилы, %	0,43±0,12	0,33±0,03	0,6±0,02	-
Юные нейтрофилы, %	0,0	0,0	0,0	-
Лимфоциты, $\times 10^9$ л	2,84±0,17	3,41±0,13	2,18±0,24	0,02 ₁₋₂ 0,01 ₂₋₃
Моноциты, $\times 10^9$ л	0,86±0,16	0,92±0,03	0,71±0,09	0,03 ₂₋₃
Гранулоциты, $\times 10^9$ л	4,2±0,36	4,8±1,3	3,06±0,33	-
Ширина распределения клеток красной крови, % CV	14,08±0,1	13,3±0,27	13,7±0,28	-
Тромбоцитокрит, %	0,27±0,02	0,31±0,02	0,26±0,02	0,04 ₂₋₃
Средний объем тромбоцита, fL	10,08±0,34	10,7±0,15	10,02±0,40	-
Ширина распределения тромбоцита, %	14,04±0,17	14,4±0,18	13,7±0,37	-

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СПЕКТРА Т-ЛИМФОЦИТОВ И АКТИВАЦИОННЫХ МАРКЕРОВ У ВЕТЕРАНОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХИМ

Параметры	Группа I Вeterаны с НПНКМ	Группа II Вeterаны с ДЭП-1	Группа III контрольная	p
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻), %	74±2,71	77±3,33	74,2±2,34	—
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻), абс.	1874,7±75,2	2391,1±112,2	1742,3±60,8	0,04 ₁₋₂ 0,03 ₂₋₃
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	35,9±0,69	32,8±0,33	40,1±2,8	0,03 ₁₋₃ 0,01 ₂₋₃
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), абс.	883,7±57,1	1023,8±141,1	963,3±79,6	—
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	26,5±0,94	34,9±0,44	27,44±1,61	0,03 ₁₋₂
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺), абс.	654,2±41,4	871,3±37,1	542,1±44,2	0,04 ₁₋₂ 0,01 ₂₋₃
CD4/CD8, абс.	1,47±0,08	1,56±0,37	1,78±0,09	—
Т-NK лимфоциты, %	1,90±0,12	1,69 ±0,33	2,10±0,28	—
Т-NK лимфоциты, абс.	53,3±6,04	51,8±12,2	58,1±6,9	—
NK-лимфоциты, %	7,72±0,13	7,76±0,29	6,16±0,20	0,04 ₁₋₃ 0,03 ₂₋₃
NK-лимфоциты, абс.	189,1±5,9	241,2±32,02	233,3±22,6	—
CD25 ⁺ Т-лимфоциты, %	11,6±0,85	15,7±1,23	8,5±0,52	0,04 ₁₋₂ 0,003 ₂₋₃
CD25 ⁺ Т-лимфоциты, абс.	294,03±33,05	499,1±97,7	86,06±9,24	0,0003 ₂₋₃ 0,015 ₁₋₂ 0,003 ₁₋₃
HLA Dr ⁺ Т-лимфоциты, %	5,1±0,22	5,4±1,56	4,7±0,82	—
HLA Dr ⁺ Т-лимфоциты, абс.	130,99±8,85	155,81±27,2	130,06±17,5	—

и экспрессируется отдельными субпопуляциями Т-лимфоцитов. В свою очередь, циркулирующие зрелые NK-клетки имеют фенотип CD3⁺CD56⁺CD16⁺CD2^{dim} и отличаются от Т-клеток отсутствием Т-клеточного рецептора и CD3. Наличие на поверхности натуральных киллеров активационных молекул (CD25⁺) позволяет им отвечать клональной экспансией на воздействие IL-2. Кроме того, часть натуральных киллеров со слабой экспрессией CD16⁺ (около 10-20%) способна в ответ на воздействие IL-2 секретировать IFN γ , TNF β , IL-10, IL-13, GM-CSF, т.е. участвует в реализации адаптивного иммунитета [4]. Популяция NK-лимфоцитов с высокой экспрессией CD16⁺ (80-90%), напротив, обладает выраженной цитолитической активностью, что свойственно врожденным механизмам защиты [4]. Наши исследования показали четкую тенденцию к снижению популяции Т-NK клеток у ветеранов с ранними формами ХИМ, не достигающую степени статистической достоверности в силу большого разброса показателей внутри изучаемых групп. Напротив, нами отмечен достоверный рост в циркуляции относительного количества натуральных киллеров у ветеранов с ранними формами хронической ишемии мозга в отличие от контрольной

группы, что может отражать наличие миграционных перераспределительных процессов со стороны иммуноцитов при формировании данной патологии, а также свидетельствовать о реализации врожденного иммунного ответа.

Изучение экспрессии активационных маркеров на Т-лимфоцитах показало увеличение в циркуляции пула лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней позитивной активации (CD25⁺), у пациентов с более выраженными проявлениями хронической ишемии мозга, причем как относительного, так и абсолютного их количества, что отражает наличие активации иммуноцитов и готовность клеток к пролиферации. В то же время число Т-клеток с маркерами поздней позитивной активации, экспрессирующих молекулярные продукты HLA-системы (Dr⁺), среди изучаемых групп не имело достоверных различий.

Из литературных источников известно, что регуляция клеточного иммунного гомеостаза осуществляется посредством Т-регуляторных клеток (Treg-клеток), конститутивно экспрессирующих молекулу CD25 и осуществляющих супрессорное влияние на метаболизм иммунных клеточных популяций, ингибируя их гиперактивацию [4]. Популяция пула Т-регуляторных клеток гетерогенна

по функциональным свойствам и фенотипическим признакам. Она включает в себя популяции пролиферирующих $CD45RA^+CD4^+CD25^{low}$ и «регуляторных» Treg (N-regulatory) $CD45R0^+CD4^+CD25^{high}$ Т-лимфоцитов [7]. В условиях снижения популяции Т-регуляторных лимфоцитов развиваются предпосылки для формирования аутоиммунных процессов. Основной механизм супрессорной активности Treg предполагает участие в негативном контроле разных форм иммунного ответа. Наличие на мембране молекулы CD25 (α -цепи рецептора для IL-2) позволяет этим клеткам выполнять роль акцептора IL-2, тем самым ингибируя активацию других Т-клеток. Понижая концентрацию IL-2, Treg вызывают апоптоз IL-2 зависимых клеток [8]. Также эти клетки экспрессируют транскрипционный фактор подавления — FoxP3, который вовлечен в ингибирование клеточной активности. Наличие на мембране Treg эктоэнзимов CD39 и CD73 дает возможность модулировать ингибирование клеток посредством активации эндогенных сигнальных молекул (аденозина, АТФ) [8]. Известно, что уровень экспрессии CD39 контролирует прогрессию воспалительных аутоиммунных заболеваний [9]. Результаты цитофлюориметрической детекции популяции Т-регуляторных клеток у пациентов с ранними формами ХИМ представлены в таблице 3.

Идентификация Treg в периферической крови пациентов с ранними формами ХИМ выявила (см. табл. 3) статистически значимое снижение этой популяции клеток в системной циркуляции в группе пациентов с ДЭП-1 в сравнении с контрольной группой и группой пациентов с НПНКМ, что может служить лабораторным критерием нарушения аутоотолерантности по отношению к антигенам мозга у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией.

Сравнительно недавно появились данные об адаптерной молекуле CD127 (IL-7R)

на Т-регуляторных клетках [4,10], играющих важную роль в пролиферации и дифференцировке зрелых Т-регуляторных клеток. После активации Т-регуляторных клеток ее экспрессия резко снижается и параллельно нарастает экспрессия FoxP3, что приводит к повышению супрессивной активности клеток. Нами показано, что при ранних формах ХИМ нарастает число Т-хелперов, экспрессирующих молекулу CD127, что также может отражать низкую супрессивную активность клеток и нарушение аутоотолерантности иммунной системы к собственным антигенам. Функциональную активность Т-хелперов отражает повышение количества активационных маркеров на мембране клетки. Исследование числа активированных Т-хелперов, имеющих фенотип $CD4^+CD25^+CD127^+$, у пациентов с ранними формами ХИМ выявило статистически недостоверное повышение абсолютного количества данных клеток в группе пациентов с ДЭП-1 в сравнении с группой условно здоровых лиц, предположительно за счет субпопуляций хелперных клеток, отвечающих за аутоиммунизацию, например Th17-типа.

Таким образом, сравнительная характеристика показателей гемограммы, субпопуляций Т-лимфоцитов, маркеров позитивной и негативной активации Т-лимфоцитов у ветеранов современных войн с ранними формами хронической ишемии мозга показало отсутствие изменений со стороны красной крови. При прогрессии ХИМ, т.е. на стадии ДЭП 1, установлено повышение в циркуляции абсолютно общего числа лимфоцитов, субпопуляции Т-лимфоцитов и моноцитов, что отражает активацию центральных механизмов лейкопоэза, и в частности Т-лимфопоэза. Рост в циркуляции у пациентов с ДЭП 1 пула лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней позитивной активации (CD25), а также НК-клеток, отра-

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК У ВЕТЕРАНОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

Параметры	Группа I Ветераны с НПНКМ	Группа II Ветераны с ДЭП-1	Группа III Контрольная	p
Treg ($CD45R0^+CD4^+CD25^{high}CD127^-$), %	2,6±0,2	1,9±0,05	2,3±0,1	0,03 ₂₋₁ 0,001 ₂₋₃
Treg ($CD45R0^+CD4^+CD25^{high}CD127^-$), абс.	49,8±2,7	41,6±1,3	47,6±1,1	0,03 ₂₋₁ 0,02 ₂₋₃
Т-хелперы ($CD4^+CD25^+CD127^+$), %	77,08±1,45	73,8±3,37	92,2±5,72	0,0002 ₁₋₃ 0,0003 ₂₋₃
Т-хелперы ($CD4^+CD25^+CD127^+$), абс.	1963,9±113,4	1420,2±198,1	1601,2±350,2	—
Т-хелперы (активированные) ($CD4^+CD25^+CD127^+$), %	2,07±0,1	2,53±0,19	2,3±0,05	—
Т-хелперы (активированные) ($CD4^+CD25^+CD127^+$), абс.	51,8±5,7	59,0±4,8	49,8±7,56	—

жают готовность клеток к IL-2 зависимой пролиферации и активацию как врожденных, так и адаптивных механизмов иммунного ответа. Кроме того, снижение в кровотоке при ДЭП-1

уровня Т-регуляторных клеток может служить дополнительным лабораторным маркером нарушения аутоотолерантности по отношению к антигенам мозга.

Список литературы / References

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001. 327с. [Gusev E.I., Skvortsova V.I. Cerebral ischemia]. Moscow: Meditsina, 2001. 327 p.
2. Виленский Б.С., Семенова Г.М., Широков Е.А. Патогенез сосудистых поражений мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова, 1996. № 5. С.14-18. [Vilensky B.S., Semenova G.M., Shirokov E.A. Patokinez vascular lesions of the brain. *Zhurnal neurologii i psikhiatrii im. Korsakova = Journal of Neurology and Psychiatry. Korsakov*, 1996, no. 5, pp. 14-18. (In Russ.)]
3. Григорьева В.Н., Густов А.В., Котова О.В., Жирнова Е.В., Лаптев А.В. Роль эмоционального напряжения в развитии начальных форм хронической цереброваскулярной недостаточности // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова, 2000. Т. 100, № 3. С. 148. [Grigoryeva V.N., Gustov A.V., Kotova O.V., Zhirnova E.V., Laptev A.V. The role of emotional stress in the development of early forms of chronic cerebrovascular insufficiency. *Zhurnal neurologii i psikhiatrii im. Korsakova = Journal of Neurology and Psychiatry. Korsakov*, 2000, Vol. 100, no. 3, pp. 14-18. (In Russ.)]
4. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН. 2014. 2 изд., доп. и расшир. 576 с. [Zurochka A.V., Haydukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in medicine and biology. Ekaterinburg: RIO RAS, 2014. 2 edition additions and extensions. 576 p.
5. Шмидт Е.В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова, 1985. № 9. С.1281-1288. [Schmidt E.V. Classification of vascular lesions of the brain and spinal cord. *Zhurnal neurologii i psikhiatrii im. Korsakova = Journal of Neurology and Psychiatry. Korsakov*, 1985, no. 9, pp. 1281-1288. (In Russ.)]
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian A.A. Standardized technology "Research subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometry analyzers." *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 974-992. [In Russ.]]
7. Shevach E.M. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, no. 2 (6), pp. 389-400.
8. Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J., Enk A.H. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 2001, no. 193 (11), pp. 1285-1294.
9. Zaunders J.J., Dyer W.B., Munier M.L., Ip S., Liu J., Amyes E., Rawlinson W., De Rose R., Kent S.J., Sullivan J.S., Cooper D.A., Kelleher A.D. CD127⁺CCR5⁺CD38⁺ CD4⁺ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2⁺ memory CD4⁺ T cells. *J. Virol.*, 2006, Vol. 80 (20), pp. 10151-10161.
10. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203 (7), pp. 1701-1711.

Авторы:

Зурочка А.В. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Давыдова Е.В. — к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russian Federation

Davydova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 12.07.2014

Отправлена на доработку 12.08.2014

Принята к печати 21.12.2014

Received 12.07.2014

Revision received 12.08.2014

Accepted 21.12.2014

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА И АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ

Синельникова Н.А.¹, Бычкова Н.В.², Калинина Н.М.²

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

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

Резюме. С целью уточнения механизмов поддержания хронической крапивницы были изучены особенности активации базофилов в периферической крови у детей с различными типами хронической крапивницы. Изложены результаты сравнительных исследований спонтанной активации базофилов, уровня общего иммуноглобулина Е и Т-хелперов 2 типа. Обследовано 47 детей с хроническим течением крапивницы, 70 детей с атопическим дерматитом в стадии обострения с разной степенью тяжести заболевания, 15 здоровых детей без проявлений аллергии и псевдоаллергии. Установлено, что у детей с обострением атопического дерматита (группа сравнения) наблюдалась высокая спонтанная активация базофилов, которая отличалась от группы здоровых детей и группы детей с хронической крапивницей. В группе пациентов с хронической крапивницей спонтанная активация базофилов была выше, чем у здоровых лиц, что определялось иммунными и неиммунными факторами в патогенезе заболевания. Показана положительная парная корреляция между уровнем общего иммуноглобулина Е и относительным количеством Т-хелперов 2 типа в периферической крови пациентов с хронической крапивницей, что подтверждает девиацию иммунного ответа в сторону Т-хелперного 2 типа. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов хронической крапивницы у детей.

Ключевые слова: хроническая крапивница, базофилы, CD203c, IgE, Т-хелперы 2 типа

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE AND BASOPHIL ACTIVATION IN CHILDREN WITH CHRONIC URTICARIA

Sinelnikova N.A.^a, Bychkova N.V.^b, Kalinina N.M.^b

^a St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b All-Russian Center of Extremal and Radiation Medicine, Russian Ministry of Extreme Situations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Some features of peripheral blood basophil activation were studied in children with different types of chronic urticaria, in order to specify the sustaining mechanisms of chronic urticaria. This study presents comparative data concerning spontaneous basophil activation, IgE level and Th2 helper cells. We observed forty-seven children with chronic urticaria, seventy children with exacerbated atopic dermatitis with different

Адрес для переписки:

Синельникова Надежда Алексеевна
Санкт-Петербургский государственный педиатрический
медицинский университет
198097, Россия, Санкт-Петербург, пр. Стачек, 32, кв. 42.
Тел.: 8 (921) 302-28-00.
Факс: 8 (812) 542-80-14.
E-mail: N_Sinelnikova@mail.ru

Address for correspondence:

Sinelnikova Nadezhda A.
St. Petersburg State Pediatric Medical University
198097, Russian Federation, St. Petersburg, Stachek pr., 32-42.
Phone: 7 (921) 302-28-00.
Fax: 7 (812) 542-80-14
E-mail: N_Sinelnikova@mail.ru

Образец цитирования:

Н.А. Синельникова, Н.В. Бычкова, Н.М. Калинина,
«Особенности иммунного ответа и активации базофилов
у детей с хронической крапивницей» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 39-46.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-39-46
© Синельникова Н.А. и соавт., 2015

For citation:

N.A. Sinelnikova, N.V. Bychkova, N.M. Kalinina, "Features
of immune response and basophil activation in children with
chronic urticaria", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 39-46.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-39-46
DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-39-46

disease severity, fifteen healthy children without signs of allergy, or pseudo-allergy. High degree of the basophil activation was detected in children with exacerbation of atopic dermatitis (a comparison group), which was different from the groups of healthy children and patients with chronic urticaria. Spontaneous basophile activation was higher in children with chronic urticaria than in healthy children, as influenced by immune and non-immune pathogenetic factors of the disease. A positive pairwise correlation was shown between total IgE level, and Th2 helper cell numbers in peripheral blood in patients with chronic urticaria, thus confirming a Th2 immune shift. The results obtained contribute to our understanding of immune pathology in chronic urticaria.

Keywords: chronic urticaria, basophils, IgE, CD203c, type 2 T-helper cells

Введение

Данные последних лет расширили представления о роли базофилов в иммунной защите и показали значение этой популяции клеток в патогенезе хронической крапивницы. Известно, что распространенность хронической крапивницы колеблется от 1 до 5% в общей популяции и составляет 25-30% от общего числа всех форм крапивницы. В детском возрасте эта патология встречается реже, чем у взрослых [1]. По этой причине представления о патогенезе и участии иммунных механизмов при хроническом течении заболевания у взрослых часто являются основой суждений об иммунологических особенностях у детей, в том числе и об особенностях активации базофилов при данной патологии.

Тучным клеткам и базофилам принадлежит центральная роль в патогенезе всех форм крапивницы. Их активация реализуется через специфические рецепторы на мембране клеток. Дегрануляция базофилов сопровождается появлением активационных молекул — CD203c и CD63. Высокую экспрессию CD203c ряд авторов считает косвенным признаком аутоиммунного ответа при определенных особенностях течения хронической крапивницы и результатах обследования [2, 3].

Определение количества активированных базофилов является новым и весьма перспективным тестом для выявления аллергии и псевдоаллергии [4].

Тест дает возможность как оценки спонтанной активации базофилов периферической крови пациента, так и ремоделирования *in vitro* контакта с предполагаемым аллергеном (спонтанная и индуцированная активация базофилов). Этот тест рекомендован для диагностики и подтверждения как IgE-зависимой аллергии, так и псевдоаллергических реакций в случаях противоречивых или отрицательных результатов кожных тестов и специфических IgE, что актуально при хронической крапивнице, этиология которой часто остается неясной.

Данные о преобладающей роли клеточного либо гуморального иммунного ответа при хро-

нической крапивнице противоречивы, так же как направление развития иммунного ответа по Th1-/Th2-типу [5, 6].

Целью исследования было изучение возможности применения теста активации базофилов при диагностике разных типов крапивницы.

Материалы и методы

Обследовано 47 пациентов с хронической крапивницей от 9 месяцев до 18 лет (средний возраст $9,4 \pm 0,72$ года), госпитализированных в клинику Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета (СПбГПМУ), которые составили основную группу. Пациенты получали лечение в разных педиатрических отделениях клиники — аллерго-пульмонологическом, дерматовенерологическом, гастроэнтерологическом, кардиоревматологическом, нефрологическом и отделении эндокринологии. Забор крови из вены проводили в период обострения хронической крапивницы по стандартным правилам.

Группу сравнения для обследованных детей с крапивницей составили 15 человек аналогичного возраста, ранее не имевших клинических проявлений крапивницы и не страдающих сопутствующей аллергопатологией. Вторую группу сравнения для детей с крапивницей составили 70 пациентов с обострением атопического дерматита от 1 года до 13 лет (средний возраст $4,3 \pm 3,5$ года) с разной степенью тяжести заболевания.

Для уточнения возрастных особенностей активации базофилов в исследование было включено 15 здоровых лиц без проявлений аллергии и крапивниц в анамнезе в возрасте от 18 до 60 лет (средний возраст 45 ± 5 лет).

Критериями включения пациентов в исследование являлись наличие рецидивирующего течения крапивницы на протяжении не менее 6 недель, сохранение сыпи в течение не более 24 часов. Критериями исключения были наличие клинических признаков системного процесса и ревматических заболеваний — характеристика кожного синдрома — резидуальные геморрагии, пурпура, наличие лихорадок при обострении

крапивницы, суставной синдром, лабораторные признаки «параклинической» активности воспалительного процесса [7, 8].

Первичное клинико-лабораторное исследование проводилось в клинике СПбГПМУ и включало в себя сбор анамнеза, общеклиническое обследование, копрологическое, паразитологическое исследование, изучение биохимических показателей крови, бактериологическое исследование (посев из зева, носа на флору), определение IgE общего методом твердофазного иммуноферментного анализа (ХемаМедика), вирусологическое исследование крови на наличие антител к вирусам Эпштейна–Барр, цитомегаловирусу, герпес-вирусам 1 и 2 типов, микоплазме и хламидиям *pneumoniae*. Проводилось УЗИ-исследование органов брюшной полости, почек и щитовидной железы. Определение гормонов щитовидной железы, тиреоидных антител, половых гормонов проводилось по показаниям.

С целью уточнения характера крапивницы, кроме изучения анамнеза и лабораторных исследований, детям, достигшим 7 лет, при согласии родителей и эмоциональной стабильности ребенка проводились провокационные пробы.

Методы проведения провокационных тестов

Внутрикожная проба с аутосывороткой

Кожная проба с аутосывороткой информативна как скрининговый тест для выявления аутоиммунной крапивницы. За 48 часа до постановки пробы отменяли прием антигистаминных препаратов. Образцы крови забирали в стерильных условиях из кубитальной вены в вакуумные пробирки без гепарина. Кровь оставляли при комнатной температуре в течение 30 минут, затем центрифугировали при 400 g в течение 20 минут. При постановке кожной пробы использовали свежую сыворотку крови в объеме 50 мкл, которую вводили внутрикожно на внутренней поверхности предплечья с помощью 0,5–1,0 мл шприца практически параллельно поверхности кожи (под углом 5–15°). Введение аутосыворотки продолжали до образования волдыря, обычно 2–3 мм в диаметре. В качестве контроля в том же объеме внутрикожно вводили гистамин в концентрации 10 мкг/мл (положительный контроль) и физиологический раствор (отрицательный контроль). Волдырь и гиперемию оценивали через 30 минут. Диаметр волдыря и эритемы, записанные в миллиметрах, сравнивали с размерами начального волдыря и/или отрицательным тест-контролем. Положительной считалась кожная проба, если диаметр волдыря превышал на 2 мм и более отрицательный тест-контроль.

Кожные тесты, основанные на воздействии холода, давления

Для диагностики холодовой крапивницы использовали холодовой тест с кубиком льда (Дункан-тест). Кубик льда в пластиковом пакете располагали на коже пациента в области передней поверхности предплечья на 5–20 минут. Положительной считалась проба, при которой через несколько минут после удаления стимула и согревания кожи появлялся волдырь и эритема в месте экспозиции кубика льда.

Для диагностики замедленной крапивницы от давления проводили провокации грузом от 2,5 до 7 кг, который подвешивали на плечо, бедро или предплечье в течение 15 минут. Положительной проба считалась при появлении отсроченного красного пальпируемого отека кожи, волдыря в месте давления. Реакция оценивалась через 6 часов после окончания провокации.

Методы исследования спонтанной активации базофилов, CD3, Th2 (CD3-CRTH2⁺)

Иммунологические исследования проводили на базе лаборатории клинической иммунологии Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России (ВЦЭРМ). Изучение активации базофилов проводили методом проточной цитометрии в цельной геперинизированной крови с использованием набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, BECKMAN-COULTER), в котором идентификация базофилов осуществлялась с помощью маркеров CD3-CRTH2⁺ (CRTH2-хемоаттрактантный рецептор, присутствующий как на Т-хелперах 2, так и на базофилах), а выявление активации базофилов — по увеличению содержания клеток с высокой экспрессией CD203c. У каждого пациента исследовали спонтанную активацию базофилов — долю клеток CD3-CRTH2⁺CD203c⁺⁺ от общего количества базофилов в пробе с буферным раствором. Методика постановки активации базофилов с применением данного реагента позволяла одновременно в той же пробе дополнительно определить относительное количество Т-лимфоцитов (CD3⁺) и Т-хелперов 2 (CD3⁺CRTH2⁺) в многопараметрическом анализе на основании позитивного гейтирования лимфоцитов по маркерам CD3 и CRTH2.

Методика теста активации базофилов Allergenicity kit: 50 мкл цельной периферической крови окрашивали тройным коктейлем моноклональных антител CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7 в присутствии буферного раствора в течение 15 минут при 37 °С в темноте. Далее проводили лизис эритроцитов лизирующим фиксиру-

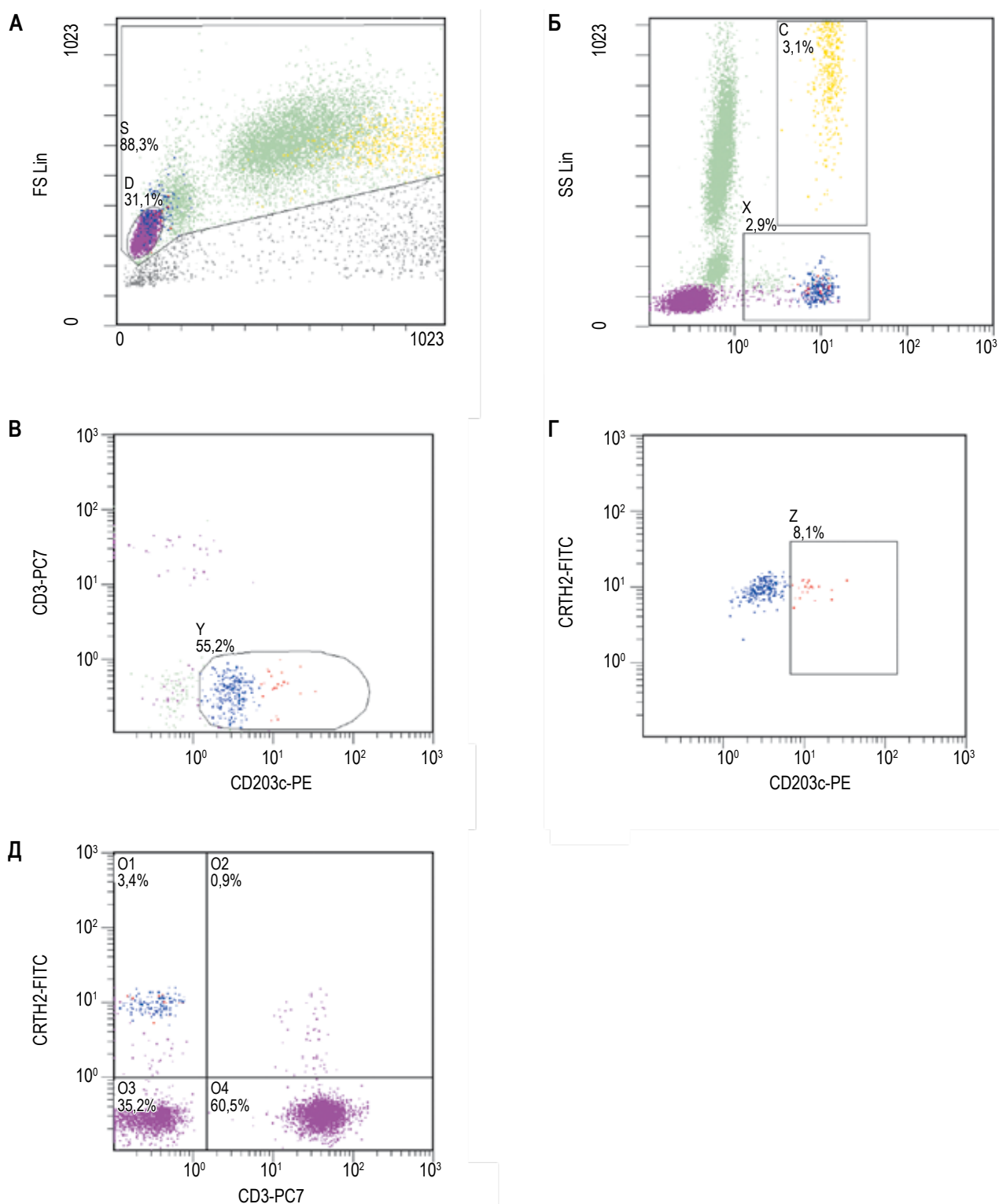


Рисунок 1. Мультипараметрический протокол с многоэтапным гейтированием

Примечание. А. Регион S включает все лейкоциты и исключает дебрис.

Б. Гейтирование по региону S. В регионе X все CRTh2⁺ лейкоциты, исключая эозинофилы.

В. Гейтирование по S и X. В регионе Y CRTh2⁺CD203c⁺ лейкоциты (базофилы), исключая эозинофилы и Т-клетки.

Г. Гейтирование по S, X and Y. В регионе Z активированные базофилы CRTh2⁺CD203c⁺⁺.

Д. Гейтирование по региону Lymph. В регионе O2 Т-хелперы 2 CD3⁺CRTh2⁺.

ющим реагентом, входящим в набор Allergenicity kit. Оценивали 500 базофилов методом проточной цитометрии в мультипараметрическом протоколе с многоэтапным гейтированием (рис. 1 А-Г).

Методы статистической обработки полученных результатов

Для статистической обработки результатов использовали формализованные карты пациентов, выполненные в формате Windows Microsoft Excel 7.0, которые включали данные анамнеза, клинические и лабораторные характеристики обследуемой группы больных. Статистический анализ проводили в программе Statistica 6.0 с определением средних значений, стандартной ошибки и вариационного размаха. Достоверность различий в группах и связь показателей оценивали при помощи непараметрических критериев Манна-Уитни, Вилкоксона и корреляционного анализа Спирмена с применением методов визуализации таблиц и гистограмм. Достоверными различиями сравниваемых параметров считали значения $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Обследуемая группа детей, страдающих хронической крапивницей, была неоднородна по возрастному составу, что потребовало условно ее разделить с учетом возрастных иммунологических особенностей: от 0 до 2 лет — 7 человек (15%), от 2 до 5 лет — 11 человек (24%) и от 5 до 17 лет — 29 человек (61%).

До момента включения пациентов в исследование длительность заболевания в среднем составила 2 года у 24 человек (52%), двое детей (4%) имели наибольшие по длительности сроки болезни — 7 и 11 лет, а у 21 пациента (44%) крапивница рецидивировала менее года.

Клинически 28 человек (60%) имели сочетание крапивницы и ангиоотечков, у 19 пациентов (40%) были только проявления крапивницы.

Для уточнения характера крапивницы в обследуемой группе больных проводили анализ данных анамнеза. Было установлено, что у 27 больных (58%) отмечалась отягощенная наследственность по аллергии и псевдоаллергии, включая крапивницу и ангиоотеки. При этом у 16 пациентов (34%) родственники страдали такими аллергическими заболеваниями, как атопический дерматит, аллергический ринит, бронхиальная астма без проявлений крапивницы и ангиоотечков, а у 11 пациентов (24%) отягощенная наследственность включала сочетание аллергопатологии с наличием крапивниц и ангиоотечков в анамнезе.

Провоцирующими факторами обострений крапивницы были инфекционные и интеркуррентные заболевания, физические воздействия и стресс, идиопатические причины и сочетание перечисленных триггеров. При возникновении обострений на фоне инфекций, механических, стрессовых, холодовых факторов у 34 обследованных (72%) также отмечались эпизоды обострений с неустановленными причинами.

Инфекционные факторы провоцировали появление крапивницы у 13 человек (27%) и включали преимущественно респираторные заболевания (ОРВИ), которые в некоторых случаях были первичными в дебюте болезни и диагностировались как течение ВЭБ-инфекции у 3 человек (6%), цитомегалии у 4 человек (8%), респираторного микоплазмоза у 6 человек (13%). Обострения хронической соматической патологии являлись триггерами у 22 пациентов (46%) и включали преимущественно аллергопатологию у 9 человек (19%) и хроническую патологию ЖКТ у 13 наблюдаемых (27%).

В структуре физической крапивницы у 22 человек (72%) отмечались появления сыпи при механических раздражениях, у 16 пациентов (51%) при стрессе и физической активности, у 5 человек (16%) при воздействии холодом и водой и у 4 человек (13%) обострения возникали при провокации солнцем. Отмечалась сочетанность физической крапивницы с другими формами крапивниц практически у каждого пациента. Изолированно физическая крапивница была диагностирована лишь у одного ребенка с холодовой крапивницей и положительным Дункан-тестом (2%). Провокационные тесты были положительными не в каждом анамнестически доказанном случае физической крапивницы. Положительные результаты проб коррелировали со степенью выраженности обострения в момент проведения провокационных тестов.

При изучении спонтанной активации базофилов в группе пациентов с крапивницей было выявлено повышение этого показателя у 25 человек (47%) (референтный интервал 0-8%), а у 9 пациентов (19%) активация была более 16,5% с максимальными значениями до 68%, что, по данным литературы, расценивается как косвенный признак аутоиммунной крапивницы [9, 10]. Для подтверждения аутоиммунного генеза крапивницы 20 детям (42%) старше 6 лет были проведены внутрикожные пробы с аутосывороткой. У 15 пациентов (75%) проба с аутосывороткой была положительная, что коррелировало со степенью повышения активации базофилов.

ТАБЛИЦА 1. ЗАВИСИМОСТЬ СПОНТАННОЙ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ И УРОВНЯ ОБЩЕГО IgE ОТ ВОЗРАСТА У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ ($M \pm m$)

Возраст	Спонтанная активация базофилов, %	Референтные значения спонтанной активации базофилов, %	Уровень общего IgE, МЕ/мл	Референтные значения общего IgE, МЕ/мл
0-2 лет	4,15±0,2	0-8	6,1±1,8	0-17,4
2-5 лет	8,9±1,9	0-8	48,7±13	0-70
5-17 лет	13,89±3,1	0-8	171±37	0-110

ТАБЛИЦА 2. ЗАВИСИМОСТЬ СПОНТАННОЙ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ($M \pm m$)

Показатель	Длительность заболевания		p < 0,05
	Менее года	Более года	
	1	2	
Спонтанная активация базофилов, %	16,9±0,8	8,8±0,9	1/2

ТАБЛИЦА 3. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ ($M \pm m$)

Показатель	Здоровые дети	Дети с хронической крапивницей	Дети с обострением атопического дерматита	Референтные значения	p < 0,05
	1	2	3		
Спонтанная активация базофилов, %	7,92±1,2	12,67±2,5	29,1±3,2	0-8%	1/2, 1/3, 2/3
CD3 ⁺ CRTh2 ⁺ , %	0,3±0,04	0,5±0,04	1,1±0,05	0,2-0,6	1/3, 2/3
CD3, %	69±1,5	71,26±1,05	75±1,3	65-73%	

При анализе зависимости спонтанной активации базофилов от возраста пациентов было показано возрастание уровня спонтанной активации базофилов с увеличением возраста детей с хронической крапивницей. Средние значения данного показателя в разных возрастных группах представлены в таблице 1 (табл. 1).

При остром начале заболевания активация базофилов зависела от типа иммунной активации, характерной для данного пациента. Максимальные значения активации базофилов были больше в группе пациентов с длительностью заболевания менее 9 недель, что, по всей вероятности, определяется индивидуальными особенностями ребенка на стрессорное воздействие. У детей с хронической крапивницей, рецидивирующей более года, активация базофилов была меньше по сравнению с группой пациентов с течением хронической крапивницы менее года, что, возможно, указывает на уменьшение спонтанной активации базофилов при более длительном, хроническом

течении заболевания ввиду включения адаптационных механизмов (табл. 2). У 13 человек (33%) не выявлено повышения активации базофилов, что свидетельствует о преобладании других иммунных механизмов в воспалительных реакциях изучаемой патологии.

В группах сравнения (дети и взрослые без аллергопатологии и псевдоаллергии) спонтанная активация базофилов не превышала референтные значения, но в первой группе сравнения, у здоровых детей, средние значения спонтанной активации были выше, чем в группе сравнения здоровых взрослых. В группе сравнения детей с обострением атопического дерматита наблюдалась высокая спонтанная активация базофилов, которая отличалась от группы здоровых детей и группы детей с хронической крапивницей (табл. 3).

Уровень общего иммуноглобулина Е превышал референтные значения у 14 пациентов (30%) с хронической крапивницей. В среднем уровень

общего IgE выходил за рамки референтного интервала исключительно в старшей возрастной группе (табл. 1), что, вероятно, соответствовало возрастным особенностям и более длительному течению сопутствующей аллергопатологии.

При изучении корреляционных связей между показателями общего IgE и спонтанной активацией базофилов выявлена статистически достоверная положительная корреляция между этими показателями в группах пациентов с крапивницей и с обострением атопического дерматита, что указывает на общую направленность иммунного ответа. Значительное повышение иммуноглобулина Е в сыворотке крови приводит к связыванию IgE с его высокоаффинным рецептором на базофилах. Комплекс аллерген-специфический иммуноглобулин Е-рецептор к IgE запускает каскад активации базофилов, приводящий к дегрануляции клеток с высвобождением медиаторов аллергического воспаления.

Показана и положительная парная корреляция между уровнем общего IgE и относительным количеством Th2, что подтверждает девиацию иммунного ответа в сторону Th2.

В группе детей с хронической крапивницей корреляционный коэффициент был меньше ($r = 0,3$), чем в группе пациентов с атопическим дерматитом ($r = 0,6$), что отличает хроническую крапивницу от IgE-зависимых реакций, характерных для атопической патологии.

При оценке относительного количества Т-лимфоцитов (CD3) в основной (дети с хронической крапивницей) и группах сравнения (здоровые дети и дети с обострением атопического дерматита) были выявлены следующие изменения: относительное количество Т-лимфоцитов (CD3) у пациентов с хронической крапивницей не отличалось от этого показателя у здоровых детей и было в пределах нормы; у детей с обострением атопического дерматита относительное количество Т-лимфоцитов (CD3) было выше, чем в других группах, и выходило за рамки референтного интервала (табл. 3).

При оценке относительного количества Th2 в исследуемых группах детей были выявлены следующие результаты: относительное количество Th2 у детей с хронической крапивницей не превышало референтного значения у 42 человек (90%), у 5 пациентов (10%) этот показатель был повышен и колебался от 0,7 до 1,1; уровень Th2 в группе сравнения здоровых детей находился в пределах нормы; у пациентов с обострением атопического дерматита относительное количество Th2 было самым высоким и достоверно отличалось от данного показателя в группе здо-

ровых детей и от количества Th2 в группе детей с хронической крапивницей (табл. 3).

Заключение

В ходе исследования показана гетерогенность хронической крапивницы у детей, установлено участие сопутствующей аллергопатологии и других интеркуррентных заболеваний в обострении крапивницы и поддержании воспалительных процессов, неблагоприятно влияющих на общесоматический фон и способствующих хронизации изучаемой патологии.

Результаты внутрикожного тестирования и положительная корреляция со степенью выраженности активации базофилов позволили у старших детей в 75% случаев диагностировать аутоиммунную форму хронической крапивницы.

В процессе исследования показано, что в группе пациентов с хронической крапивницей спонтанная активация базофилов была выше, чем у здоровых лиц, что определяется иммунными и неиммунными факторами в патогенезе заболевания.

Процентное содержание Т-хелперов 2 в группе больных хронической крапивницей превышало данный показатель у здоровых лиц, но было меньше, чем относительное количество Th2 у детей с обострением атопического дерматита, что указывает на промежуточное положение исследуемой патологии в ряду аллергических заболеваний, отличая иммунные механизмы при хронической крапивнице от IgE-зависимых реакций.

Согласно литературным данным, содержание Т-клеток, несущих CRTH2, в периферической крови невелико, но степень их активации выше, чем у негативных по CRTH2. Полученные данные свидетельствуют о повышенном содержании активированных эффекторных Т-хелперов в периферической крови пациентов с хронической крапивницей, иммунный ответ у которых развивается преимущественно по Т-хелперному 2 типу.

Тест на активацию базофилов *in vitro* — доступный и перспективный метод исследования гиперчувствительности немедленного типа. Он подходит как для экспериментальных и фармакологических исследований, так и для диагностики в клинической практике. Определение дальнейших перспектив терапии возможно благодаря возможности оценки степени активности заболевания в момент исследования, что необходимо при рецидивирующем течении хронической крапивницы, требующей длительной медикаментозной терапии.

Список литературы / References

1. Church M.K., Weller K., Stock P., Maurer M. Chronic spontaneous urticaria in children: Itching for insight. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2011, Vol. 22, pp. 1-8.
2. Siracusa M.C., Kim B.S., Spergel J.M., Artis D. Basophils and allergic inflammation Glossary. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, Vol. 132, pp. 789-801.
3. Konstantinou G.N., Asero R., Ferrer M., Knol E.F., Maurer M., Raap U., Schmid-Grendelmeier P., Skol P. S., Grattan C. E. H. EAACI taskforce position paper: evidence for autoimmune urticaria and proposal for defining diagnostic criteria. *Allergy*, 2013, Vol. 68, pp. 27-36.
4. Kang M.G., Song W.J., Park H.K., Lim K.H., Kim S.J., Lee S.Y., Kim S.H., Cho S.H., Min K.U., Chang Y.S. Basophil Activation Test with Food Additives in Chronic Urticaria Patients. *Clinical Nutrition Research*, 2014, Vol. 3, pp. 9-16.
5. Gao J., Yang A., Chen M., Li A., Yao X., Li Y., Xie S., Yang X., Zhong L., Chen Z. mRNA profiles of cytokine receptors in unstimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic idiopathic urticaria. *The Journal of Biomedical Research*, 2011, Vol. 25, pp. 141-147.
6. Santos J.C., de Brito C.A., Futata E.A., Azor M.H., Oriei N.M., Maruta C.W., Rivitti E.A., Duarte A.J.S., Sato M.N. Up-regulation of chemokine C-C ligand 2 (CCL2) and C-X-C chemokine 8 (CXCL8) expression by monocytes in chronic idiopathic urticaria. *Clinical and Experimental Immunology*, 2012, Vol. 167, pp. 129-136.
7. Maurer M., Magerl M., Metz M., Zuberbier T. Revisions to the international guidelines on the diagnosis and therapy of chronic urticaria. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2013, Vol. 11, pp. 971-978.
8. Machura E., Jońska-Golus M., Krakowczyk H., Kasperska-Zajac A., Ziora K. Etiology and clinical course of urticaria in hospitalized children. *Med Wieku Rozwoj*, 2013, Vol. 17, pp. 64-71.
9. Sand F.L., Thomsen S.F. TNF-Alpha Inhibitors for Chronic Urticaria: Experience in 20 Patients. *Journal of Allergology*, 2013, Vol. 2013, pp. 1-4.
10. Grattan C.E.H., Sabroe R.A., Greaves M.W. Chronic urticaria. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2002, Vol. 46, pp. 645-657.

Авторы:

Синельникова Н.А. — аспирант кафедры факультетской педиатрии, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Бычкова Н.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Калинина Н.М. — д.м.н., профессор, руководитель НИО клинической иммунологии, Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Sinelnikova N.A., PhD Candidate, Department of Faculty Pediatrics, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Bychkova N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, All-Russian Center of Extremal and Radiation Medicine, Russian Ministry of Extreme Situations, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Research Department of Clinical Immunology, All-Russian Center of Extremal and Radiation Medicine, Russian Ministry of Extreme Situations, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 28.04.2014

Отправлена на доработку 20.05.2014

Принята к печати 21.05.2014

Received 28.04.2014

Revision received 20.05.2014

Accepted 21.05.2014

УРОВНИ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ 6 И 10 В КРОВИ И МАРКЕРЫ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК В КРОВИ И МОЧЕ ПРИ ОСТРОМ КОРОНАРНОМ СИНДРОМЕ

Шаленкова М.А., Михайлова З.Д., Климкин П.Ф., Манюкова Э.Т.

ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38», г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. Внимание исследователей привлекают данные о корреляции изменения уровней цитокинов с дисфункцией почек и прогностическая роль повышения некоторых из них в отношении развития острого повреждения почек (ОПП) при различных формах ишемической болезни сердца (ИБС). Нами у 98 больных ИБС (93 – острый коронарный синдром [ОКС] и 5 – стабильная стенокардия [СтСт] II-III функционального класса) был изучен уровень интерлейкинов (IL)-6 и IL-10 в крови и их взаимосвязь с содержанием креатинина (sCr) в крови и липокалина (u-NGAL) в моче. У больных ОКС, по сравнению со СтСт, выявлено более высокое содержание IL-6 и IL-10, sCr, u-NGAL. Содержание IL-6 и IL-10 было выше при ОКС без подъема сегмента ST (ОКСбпST) и при развитии ОПП. ОПП по уровню sCr чаще выявляли у пациентов с ОКСбпST. Уровень u-NGAL был выше при ОКС с подъемом сегмента ST (ОКСпST).

Ключевые слова: интерлейкины, креатинин, NGAL, острый коронарный синдром, острое повреждение почек

BLOOD LEVELS OF INTERLEUKIN-6 AND INTERLEUKIN-10 IN SERUM AND BIOMARKERS OF ACUTE KIDNEY INJURY IN ACUTE CORONARY SYNDROME

Shalenkova M.A., Mikhailova Z.D., Klimkin P.F., Manyukova E.T.

Municipal Clinical Hospital N 38, N. Novgorod, Russian Federation

Abstract. Certain correlations between changes of cytokine levels and kidney dysfunction, as well as their prognostic significance for development of acute kidney injury (AKI) in different clinical forms of ischemic heart disease (IHD) seem to be worth of further studies. The levels of IL-6 and IL-10 and their correlation with serum creatinine (sCr) and lipocalin levels in urine (u-NGAL) were studied in 98 IHD patients, of them 93 presented with acute coronary syndrome (ACS) and 5, with stable angina pectoris. ACS patients were found to have increased levels of IL-6, IL-10, sCr, u-NGAL. IL-6 and IL-10 contents proved to be increased in cases of non-ST-segment elevation ACS (NSTEMI-ACS), and during AKI development. According to serum creatinine levels, AKI was more frequently revealed in patients with NSTEMI-ACS. Urinary NGAL levels were found to be higher in ACS with ST segment elevation.

Keywords: interleukins, creatinine, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), acute coronary syndrome, acute kidney injury

Адрес для переписки:

Михайлова Зинаида Дмитриевна
ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38»
603000, Россия, г. Нижний Новгород,
ул. Чернышевского, 22.
Phone: 7 (8312) 430-34-42, 434-20-45.
Fax: 7 (8312) 433-35-44.
E-mail: zinaida.mihailowa@yandex.ru

Address for correspondence:

Mikhailova Zinaida D.
Municipal Clinical Hospital N 38
603000, Russian Federation, N. Novgorod,
Chernyshevsky str., 22.
Phone: 7 (8312) 430-34-42, 434-20-45.
Fax: 7 (8312) 433-35-44.
E-mail: zinaida.mihailowa@yandex.ru

Образец цитирования:

М.А. Шаленкова, З.Д. Михайлова, П.Ф. Климкин,
Э.Т. Манюкова, «Уровни интерлейкинов 6 и 10 в крови
и маркеры острого повреждения почек в крови и моче при
остром коронарном синдроме» // Медицинская иммунология,
2015. Т. 17, № 1. С. 47-52.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-47-52
© Шаленкова М.А. и соавт., 2015

For citation:

M.A. Shalenkova, Z.D. Mikhailova, P.F. Klimkin,
E.T. Manyukova, "Blood levels of interleukin-6 and interleukin-10
in serum and biomarkers of acute kidney injury in acute coronary
syndrome", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 47-52.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-47-52
DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-47-52

Введение

Острый коронарный синдром (ОКС) ассоциирован с высоким риском развития не только сердечно-сосудистых осложнений, но и острого повреждения почек (ОПП). В литературе обсуждается диагностическое и прогностическое значение маркеров воспаления при различных формах ИБС, операциях на сердце, ожирении, метаболическом синдроме, сахарном диабете, гломерулонефритах в отношении развития ОПП [1-3, 5, 6, 8, 9]. Однако данные о корреляции изменения уровней цитокинов с дисфункцией почек и прогностическая роль повышения некоторых из них (интерлейкин (IL) – 6, TNF-альфа и СРБ) в отношении развития ОПП с исходом в острую почечную недостаточность противоречивы, в том числе у больных ОКС [6, 9].

По данным различных авторов (Thomas Nickolas, Max Delbruck, Helios Clinics, 2012), ОПП в 25-80% завершается смертью [10]. Именно поэтому продолжается поиск биомаркеров ОПП на ранних этапах его развития для выявления более тяжелых больных с возможностью определения необходимости начала диализа во время госпитализации. В настоящее время открыты и изучаются более десятка биомаркеров: липокалин, ассоциированный с желатиной нейтрофилов (NGAL), цистатин С, молекула повреждения почек – 1, белок, связывающий печеночные жирные кислоты L типа, интерлейкин-18, N-ацетил-B(D)-глюкозаминидаза, глутатион-S-трансферазы, α -1-микроглобулин, β -2-микроглобулин, CD11b нейтрофилов, пропредсердный натрийуретический пептид, кластерин, ретинол-связывающий белок и др. [11, 12]. В ряде работ NGAL был более точным в диагностике ОПП, предсказывал продолжительность и тяжесть заболевания, являлся наиболее точным предиктором смерти [10]. Однако, недостаточно данных о значимости NGAL в моче (u-NGAL) у больных ОКС [11, 12].

Цель работы: определить содержание IL-6 и IL-10, креатинина в крови и NGAL в моче у больных ОКС.

Материалы и методы

В исследование включены 98 больных ИБС (70 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 31 до 76 лет (средний возраст 60 ± 9 лет), доставленных в инвазивный и неинвазивный стационар. Основная группа – 93 больных ОКС: 25 с подъемом сегмента ST (ОКСпST) и 68 – без подъема сегмента ST (ОКСбпST); при наблюдении в клинике инфаркт миокарда (ИМ) развился у 53 и нестабильная стенокардия (НС) – у 40. Группа сравнения – 5

больных стабильной стенокардией (СтСт) II-III функционального класса.

Критериями исключения из исследования было наличие: сердечной недостаточности IIБ-III стадии; тяжелой дыхательной и/или почечной и/или печеночной недостаточности; заболеваний эндокринной и/или центральной нервной систем; острых инфекционных процессов; злокачественных новообразований; психической патологии лиц, не подписавших информированного согласия на участие в исследовании.

Диагноз ОКС, СтСт устанавливали в соответствии с рекомендациями ВНОК (2010) [4]. ОПП диагностировали согласно рекомендациям KDIGO (2012). Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) рассчитывали по формуле CKD-EPI (2011). Стадию хронической болезни почек (ХБП) определяли согласно Национальным рекомендациям (2012) [7].

У всех пациентов в 1-3 день госпитализации натошак забиралась венозная кровь с определением в ней содержания IL-6 и IL-10 (пг/мл) иммуноферментным методом с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия), согласно инструкции фирмы-изготовителя; креатинина (sCr) (мкмоль/л) колориметрическим методом (кинетика) на анализаторе «AU400» фирмы «Beckman Coulter» (США). Повторно определяли уровень sCr при ИМ и НС через 24-72 ч. В моче определяли u-NGAL (нг/мл) также в 1-3 день госпитализации иммуноферментным методом (Human Lipocalin-2/NGAL Quantikine ELISA, R&D Systems, США).

Всем больным выполняли клинический анализ крови и мочи, биохимические показатели в соответствии с общепринятыми стандартами. Инструментальное обследование и лечение пациентов проводилось в соответствии с рекомендациями ВНОК (2010) и утвержденными стандартами [4].

Статистическая обработка осуществлялась с помощью специализированного пакета прикладных программ SPSS 17.0. В случаях сравнения групп по значениям отдельных признаков при несвязанных выборках для сравнения количественных данных использовался U-тест Манна–Уитни. Для сравнения зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона, для сравнения качественных данных – точный критерий Фишера. Корреляционный анализ проводился по методу Спирмена. Для описательной статистики рассчитывались средние значения (Me – медиана) в виде Me (Q_{25} ; Q_{75}), где Q_{25} и Q_{75} – нижний и верхний квартили; относительные показатели в %. При приближенно нормальном распределении данные представлены в виде

среднего арифметического (М) и стандартного отклонения ($\pm$ SD). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Группы больных ИБС были сопоставимы по основным характеристикам: пол, возраст, данные анамнеза. Однако, в группе СтСт (80%) в сравнении с ОКС (28%) был чаще перенесенный ИМ ($p = 0,03$).

В крови максимальные уровни IL-6 и IL-10 выявлены при ОКС по сравнению со СтСт ($p < 0,009$ и $p < 0,022$) (табл. 1).

Уровни IL-6 в группах ОКСпСТ и ОКСбпСТ были в 2,7 ($p = 0,015$) и 6 ($p = 0,01$) раз, а IL-10 при ОКСбпСТ — в 26 ($p = 0,011$) раз выше, чем при СтСт. Содержание IL-6 и IL-10 было ниже при ОКСпСТ в сравнении с ОКСбпСТ, что, видимо, связано с тактикой ведения данных пациентов. Им проводили (при отсутствии противопоказаний) тромболитическую терапию (ТЛТ) (на догоспитальном этапе и/или в первые часы госпитального периода) и значительно чаще выполняли чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) на инфаркт-зависимой артерии, что позволило уменьшить зону повреждения миокарда. Так, из 25 больных ОКСпСТ 8 пациентам проводили только ТЛТ, 1 — только ЧКВ, 5 — ТЛТ и ЧКВ. Высокий уровень циркулирующих IL-6 и IL-10 при ОКСбпСТ отражал более выраженную системную воспалительную реакцию, чаще на фоне неинвазивного лечения.

У больных разными формами ИБС проведен анализ величины sCr (мкмоль/л) при поступлении (sCr1) и в динамике (sCr2) через 24-72 ч (табл. 1).

В группе СтСт концентрация sCr была незначимо ниже, чем при ОКС ($p > 0,05$). Исходно уровень sCr (sCr1) был значимо выше при ОКСбпСТ, чем при ОКСпСТ ($p = 0,005$). У больных ОКС, как при ОКСпСТ ($p = 0,022$), так и при ОКСбпСТ ($p = 0,01$), наблюдалось достоверное повышение Me sCr в динамике в сравнении с СтСт. Уро-

вень sCr (sCr2) также был значимо выше при ОКСбпСТ, чем при ОКСпСТ ($p = 0,012$).

ОПП диагностировали с помощью базального (расчетного — раннее ОПП) sCr, соответствующего СКФ 75 мл/мин/1,73 м² и оценивали его в сравнении с sCr1. По расчетному sCr ОПП было диагностировано у 13 (14%) больных ОКС (ОКСпСТ — у 2, ОКСбпСТ — у 11). Из них ОПП 1 стадии — у 11, 2 стадии — у 2 пациентов. У этих пациентов ОПП развилось на фоне ХБП С2-4: С2 диагностирована у 2, С3а — у 6, С3б — у 3, С4 — у 2 больных. У 2 больных сохранялось ОПП и в динамике (sCr2 был больше sCr1, т.е. прогрессировало). По уровню sCr ОПП (позднее ОПП) в динамике (у всех больных 1 стадия) выявлено еще у 6 (6,4%) пациентов ОКС (по нарастанию креатинина, sCr2 > sCr1). Таким образом, по уровню sCr ОПП было диагностировано у 19 (20,4%) больных ОКС (ОКСпСТ — у 2, ОКСбпСТ — у 4). У этих пациентов ОПП также развилось на фоне ХБП, но более легкого течения — С1-2: С1 диагностирована у 4, С2 — у 2 больных.

Один пациент с ОКСпСТ и ОПП 2 стадии, развившимся в подостром периоде ИМ, умер в стационаре от ОНМК.

Уровень u-NGAL был выше при ОКС, в большей степени (в 1,9 раза) при ОКСпСТ, в сравнении со СтСт, однако различия были статистически незначимыми.

При ОКС установлена прямая корреляция между уровнем IL-6 и величинами IL-10 ($R = 0,653$; $p < 0,0001$), sCr1 ($R = 0,341$; $p < 0,001$) и sCr2 ($R = 0,280$; $p = 0,025$); между содержанием IL-10 и sCr1 ($R = 0,455$; $p < 0,0001$) и sCr2 ($R = 0,475$; $p < 0,0001$); между уровнем u-NGAL и IL-6 ($R = 0,338$; $p = 0,027$).

Диагностика ОПП по почасовому диурезу не осуществлялась, так как не было показаний для катетеризации мочевого пузыря.

У больных ОКС проведен анализ уровня IL-6 и IL-10 и u-NGAL при ОПП и без ОПП (табл. 2).

Me IL-6 ($p = 0,065$) была выше в группе пациентов с ОПП, с максимальными значениями

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ IL-6, IL-10, sCr1 И sCr2, u-NGAL У БОЛЬНЫХ РАЗНЫМИ ФОРМАМИ ИБС, Me (Q_{25} ; Q_{75})

Показатели	Форма ИБС			
	ОКС (n = 93)	ОКСпСТ (n = 25)	ОКСбпСТ (n = 68)	СтСт (n = 5)
IL-6, пг/мл	8,45 (1,6; 16,06) ^a	3,92 (1,64; 13,27) ^a	8,85 (1,58; 16,84) ^a	1,46 (0,1; 1,54) ^a
IL-10, пг/мл	2,01 (0,1; 3,14) ^a	0,1 (0,1; 2,55) ^b	2,63 (0,1; 3,14) ^{ab}	0,1 (0,1; 0,1) ^a
sCr1, мкмоль/л	89,6 (73,8; 105) ^c	76,3 (63,7; 90,5) ^{bc}	94,6 (82,0; 105) ^{bc}	87,3 (78,5; 90,1)
sCr2, мкмоль/л	97,0 (80,7; 105) ^c	80,6 (73,2; 100,1) ^{bc}	97,0 (82,8; 105) ^{bc}	-
u-NGAL, нг/мл (n = 44)	3,9 (1,82; 9,66)	7,08 (1,41; 15,4)	3,57 (1,89; 5,3)	3,71 (2,16; 7,22)

Примечание. ^a — значимые различия при сравнении со СтСт; ^b — значимые различия между ОКСпСТ и ОКСбпСТ; ^c — значимые различия в группе ОКС между sCr1 и sCr2, $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ IL-6 И IL-10 У БОЛЬНЫХ ОКС С ОПП И БЕЗ ОПП, Ме (Q₂₅; Q₇₅)

Показатели	Больные ОКС (n = 93)			
	ОПП (n = 19)	Расчетное (раннее) ОПП (n = 13)	ОПП в динамике (позднее) (n = 6)	Без ОПП (n = 74)
IL-6, пг/мл	9,56 (7,66; 23,28)	9,56 (8,29; 17,26)	10,91 (0,75; 64,84)	6,85 (1,54; 14,21)
IL-10, пг/мл	2,9 (2,51; 3,59) *	3,13 (2,52; 3,59) *	2,78 (0,57; 22,78)	0,18 (0,1; 3,05) *
u-NGAL, нг/мл	97,78 (3,72; 100,7)	97,78	52,21 (3,72; 100,7)	3,72 (1,81; 7,23)

Примечание. * – значимые различия при сравнении с группой без ОПП, p < 0,05.

у лиц с ОПП, развившемся в динамике (3-5 сутки госпитального периода), чем у больных без него. Содержание IL-10 (p = 0,007) было значимо выше у лиц с ОПП, диагностированным по уровню sCr, с максимальными значениями в группе с расчетным (ранним) ОПП (p = 0,017), в сравнении с пациентами без него.

Уровень u-NGAL у лиц с ОПП (n = 19), диагностированным по sCr, был незначимо (p = 0,063) выше, чем у лиц без ОПП. Согласно инструкции производителя, референсное значение уровня u-NGAL, позволяющее диагностировать ОПП, составляет > 72 нг/мл. Значения u-NGAL выше указанного уровня имели только 3 пациента ОКС. Лишь у 2 из них ОПП было диагностировано по уровню sCr (у 1 – по расчетному и сохранялось в динамике, у другого – в динамике). Один пациент из 3-х имел субклиническое ОПП (при отсутствии диагностического повышения sCr).

При уровне u-NGAL более 72 нг/мл чувствительность и специфичность метода для диагностики ОПП составили 66,7 и 97,6%.

У больных разными формами ИБС диагностирована ХБП С1-4 (додиализные стадии), причем чаще диагностировали С2, независимо от формы ИБС (ОКС (49,5%), в том числе ОКСбпST (55,9%) и СтСт (80%)). Напротив, при ОКСпST в исследуемой выборке преобладала ХБП С1 (48%).

Проанализированы уровни IL-6, -10 у больных ИБС с различными стадиями ХБП (табл. 3).

Ме IL-6 и IL-10 у пациентов ОКС при ХБП С2 была достоверно больше, чем у больных СтСт. У больных ОКС величина IL-6 и IL-10 имела прямую зависимость с тяжестью ХБП.

Таким образом, у больных ОКС выраженность воспалительной реакции, подтверждаемой с помощью измерения концентрации IL-6 и IL-10 в крови, коррелировала с уровнем креатинина

ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ IL-6, IL-10 У БОЛЬНЫХ ИБС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ХБП (СКД-ЕР), Ме (Q₂₅; Q₇₅)

Форма ИБС	IL, пг/мл	Стадия ХБП				
		С1	С2	С3а	С3б	С4
СтСт (n = 5)	IL-6	0,1	1,5 (0,4; 1,54) ^c	–	–	–
	IL-10	0,1	0,1 (0,1; 0,1) ^c	–	–	–
ОКС (n = 93)	IL-6	1,86 (0,1; 9,61) ^a	7,9 (1,61; 14,24) ^{ac}	11,6 (8,61; 24,47) ^a	18,29 (0,1; 30,65)	8,61 (1,66; 14,16)
	IL-10	0,1 (0,1; 0,14) ^b	2,29 (0,1; 3,13) ^{bc}	2,95 (2,52; 4,05) ^b	1,9 (0,1; 3,95)	2,9 (0,1; 3,59)
ОКСпST (n = 25)	IL-6	4,76 (1,03; 15,06)	2,89 (1,67; 11,54)	7,9 (1,89; 61,41)	–	1,66
	IL-10	0,1 (0,1; 0,22) ^a	0,1 (0,1; 3,02)	2,55 (1,49; 22,84) ^a	–	0,1
ОКСбпST (n = 68)	IL-6	0,98 (0,1; 5,46) ^b	8,69 (1,58; 16,15) ^b	13,52 (8,77; 24,47) ^b	18,29 (0,1; 30,65)	11,39 (8,61; 14,16)
	IL-10	0,1 (0,1; 0,47) ^c	2,62 (0,1; 3,13) ^c	2,95 (2,59; 4,05) ^c	1,9 (0,1; 3,95)	3,25 (2,9; 3,59) ^c

Примечание. 1) в группе ОКС: ^a – между С1 и С3а, p = 0,002; С2 и С3а, p = 0,032 (IL-6); ^b – между С1 и С2, p = 0,005; С1 и С3а, p < 0,001; С2 и С3а, p = 0,044 (IL-10); 2) ^c – между ОКС и СтСт при С2: IL-6 (p = 0,019), IL-10 (p = 0,042); 3) в группе ОКСпST: ^a – между С1 и С3а, p = 0,016 (IL-10); 4) в группе ОКСбпST: ^b – между С1 и С2, p = 0,011; С1 и С3а, p < 0,001; С2 и С3а, p = 0,027 (IL-6); ^c – между С1 и С2, p = 0,01; С1 и С3а, p = 0,001; С1 и С4, p = 0,021 (IL-10).

в крови и липокалина 2 (NGAL) в моче, была более выраженной у лиц с ОПП и имела линейную зависимость с тяжестью ХБП.

Заключение

У больных ОКС, по сравнению с пациентами СтСт, выявлено более высокое содержание IL-6 и IL-10, креатинина в крови и NGAL в моче. Уровни IL-6 и IL-10 в крови были выше у лиц с ОПП в сравнении с пациентами без ОПП. ОПП чаще диагностировали по уровню креатинина в крови, как по расчетному (раннее ОПП), так и в динамике (позднее ОПП). Раннее ОПП развивалось чаще у пациентов ОКС с более тяжелым течени-

ем ХБП (С3-4 у 84,6%), напротив, позднее ОПП развивалось у лиц с ХБП С1-2 (100%). Величина IL-6 и NGAL позволяла чаще выявлять субклиническое ОПП. Получена линейная зависимость содержания IL-6 и IL-10 в крови с тяжестью ХБП у больных ОКС.

Уровень IL-6 и IL-10 в крови может быть использован в качестве дополнительных диагностических критериев для оценки выраженности системной воспалительной реакции при ОКС, ОПП. Уровни креатинина в крови и NGAL в моче позволяют диагностировать раннее и позднее ОПП, как клинически выраженное, так и субклиническое.

Список литературы / References

1. Аляви А.Л., Низомов А.А., Касимова Г.М. Клинико-диагностическое значение активации цитокинов и возможности коррекции выявленных нарушений у больных острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST // Тезисы Российского национального конгресса кардиологов, 2012. № 0024. С. 43-44. [Alyavi A.L., Nizomov A.A., Kasimova G.M. Clinico-diagnostic significance of cytokin activation and possibilities of correction of the detected disorders in patients with acute coronary syndrome with elevation of ST segment. *Tezisy Rossiyskogo natsional'nogo kongressa kardiologov* = In: *Proceedings of the Russian National Congress of Cardiologists, 2012, no. 0024, pp. 43-44.* (In Russ.)]
2. Киприна Е.С., Веремеев А.В., Шмидт Е.А., Барбараш О.Л., Бернс С.А. Медиаторы системного воспаления у больных острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST после проведения коронарной ангиопластики // Приложение 1 к журналу «Кардиоваскулярная терапия и профилактика», 2010. № 9 (4). С. 6-7. [Kiprina E.S., Veremeev A.V., Shmidt E.A., Barbarash O.L., Berns S.A. Mediators of the systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome with elevation of ST segment after performing coronary angioplastics. *Prilozhenie 1 k zhurnalu "Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika"* = *Supplement 1 to the Journal "Cardiovascular Therapy and Prevention"*, 2010, no. 9 (4), pp. 6-7. (In Russ.)]
3. Коротчаева Ю.В., Козловская Л.В., Гордовская Н.Б., Сперанский А.И. Уровень интерлейкина-6 в сыворотке крови и моче в оценке активности криоглобулинемического васкулита у больных хроническим гепатитом С с поражением почек // Терапевтический архив, 2011. Т. 83, № 2. С. 52-56. [Korotchaeva Yu.V., Kozlovskaya L.V., Gordovskaya N.B., Speransky A.I. An IL-6 level in the serum and urine in estimation of cryoglobulinemic vasculitis activity in patients with chronic hepatitis C associated with renal damage. *Terapevticheskiy arkhiv* = *Therapeutic Archive*, 2011, no. 2, pp. 52-56. (In Russ.)]
4. Национальные клинические рекомендации. Сборник / Под. ред. Р.Г. Оганова. 3-е издание. М.: Изд-во «Силиция-Полиграф», 2010. 592 с. [National clinical recommendations. Collection of articles / edited by R. Oganov. 3rd edition]. Moscow: Cilycea-Polygraph Publishing, 2010. 592 p.
5. Палеев Ф.Н., Абудеева И.С., Москалец О.В., Белокопытова И.С. Изменение интерлейкина-6 при различных формах ишемической болезни сердца // Кардиология, 2010. № 2. С. 69-72. [Paleev F.N., Abudeeva I.S., Moskalets O.V., Belokopytova I.S. Changes of Interleukin-6 in Various Forms of Ischemic Heart Disease. *Kardiologiya* = *Cardiology*, 2010, no. 9 (4), pp. 6-7. (In Russ.)]
6. Савушкина Т.Н., Табакьян Е.А., Федорова Т.В., Васильева О.А., Домогатский С.П., Лепилин М.Г. Оценка применимости маркеров системного воспаления – интерлейкина-6, альфа-фактора некроза опухоли и С-реактивного белка – для прогнозирования острого повреждения почек при операциях на сердце // Кардиологический вестник, 2010. Т. V (XVII), № 2. С. 16-21. [Savushkina T.N., Tabakyan E.A., Fedorova T.V., Vasilyeva O.A., Domogatsky S.P., Lepilin M.G. Assessment of the applicability of the systemic inflammation markers IL-6, TNF- α , C-reactive protein in the prediction of acute kidney injury during heart surgery. *Kardiologicheskiy vestnik* = *Cardiology Bulletin*, 2010, Vol. V (XVII), no. 2, pp. 16-21. (In Russ.)]
7. Рабочая группа Научного общества нефрологов России. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные положения, определение, диагностика, скрининг, подходы к профилактике и лечению. <http://journal.nephrolog.ru/ckd/> [Russian nephrologists Scientific Society Workgroup. National recommendations. Chronic kidney disease: fundamentals, definition, diagnostics, screening, prevention and treatment approaches. <http://journal.nephrolog.ru/ckd/>].
8. Шварц В. Двойственная роль интерлейкина-6 в развитии инсулинрезистентности // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2010. № 1. С. 40-47. [Schwarz V. Dual role of interleukin-6 for development of

insulin resistance. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2010, no. 1, pp. 40-47. (In Russ.).

9. Шевченко О.П., Слесарева Ю.С., Эль-Бустани С., Бугров А.В., Шевченко А.О. Диагностическое и прогностическое значение PAPP-A и маркеров воспаления при различных формах ишемической болезни сердца. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2010. № 3. С. 23-28. [Shevchenko A.O., Slesareva Yu.S., Al-Bustani S., Bugrov A.V., Shevchenko O.P. Diagnostic and prognostic role of PAPP-A and inflammatory markers in various forms of coronary heart disease. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2010, no. 3, pp. 23-28. (In Russ.).]

10. Acute Kidney Injury In Emergency Cases – Using Biomarkers. *Journal of the American College of Cardiology*, 2012, no. 1, 12.

11. Cruz D.N., Gaiao S., Maisel A., Ronco C., Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of cardiovascular disease: a systematic review. *Clin Chem Lab Med.*, 2012, no. 50 (9), pp. 1533-45.

12. Helánová K., Pařenica J., Dlouhý V., Pávková Goldbergová M., Cermáková Z., Gottwaldova J., Spinar J. The importance of NGAL and cystatin C biomarkers in cardiovascular diseases. *Vnitr Lek.*, 2012, no. 58 (4), pp. 286-90.

Авторы:

Шаленкова М.А. — д.м.н., консультант, ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38», г. Нижний Новгород, Россия

Михайлова З.Д. — к.м.н., консультант, ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38», г. Нижний Новгород, Россия

Климкин П.Ф. — врач, ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38», г. Нижний Новгород, Россия

Манюкова Э.Т. — врач, ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38», г. Нижний Новгород, Россия

Authors:

Shalenkova M.A., PhD, MD (Medicine), Consulting Physician, Municipal Clinical Hospital N 38, N. Novgorod, Russian Federation

Mikhailova Z.D., PhD (Medicine), Consulting Physician, Municipal Clinical Hospital N 38, N. Novgorod, Russian Federation

Klimkin P.F., Physician, Municipal Clinical Hospital N 38, N. Novgorod, Russian Federation

Manyukova E.T., Physician, Municipal Clinical Hospital N 38, N. Novgorod, Russian Federation

Поступила 06.07.2014

Отправлена на доработку 20.05.2014

Принята к печати 21.05.2014

Received 06.07.2014

Revision received 20.05.2014

Accepted 21.05.2014

КОНЦЕНТРАЦИИ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ, ЦИТОКИНОВ И АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ДИФФУЗНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ЗОБЕ

Зорина В.Н., Маклакова Т.П., Шепель Т.Т., Бойко О.Н., Зорина Р.М., Зорин Н.А.

ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» МЗ РФ, г. Новокузнецк, Россия

Резюме. Изучено содержание ТТГ, Т4-своб., $\text{TNF}\alpha$, IL-6, $\text{IFN}\gamma$ и $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови и супернатантах краткосрочных культур клеток крови при ДТЗ на фоне обострения и после достижения эутиреоидного состояния в сравнении со здоровыми. Установлено, что в сыворотке крови при обострении не только достоверно повышен Т4-своб., при сниженном ТТГ, но и увеличено содержание IL-6, $\text{IFN}\gamma$, а также транспортирующего и регулирующего их синтез $\alpha 2$ -МГ. Лечение Тиамазолом нормализовало гормональный профиль и снижало уровни $\alpha 2$ -МГ, IL-6, $\text{IFN}\gamma$ в крови, но не нормализовало их полностью, а содержание $\text{TNF}\alpha$ даже повышалось. В супернатантах суточных культур клеток крови до лечения снижена активность митоген-индуцированного синтеза $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$, увеличена спонтанная продукция $\text{IFN}\gamma$. После достижения эутиреоидного состояния на фоне приема Тиамазола, в супернатантах нестимулированных клеток сохранялись повышенные уровни $\text{IFN}\gamma$, дополнительно снижался синтез IL-6, а при митогенной стимуляции — нормализовался синтез $\text{IFN}\gamma$, но сохранялась сниженная активность секреции $\text{TNF}\alpha$ по сравнению с контролем. Уровень $\alpha 2$ -МГ в супернатантах был стабилен и намного ниже, чем в сыворотке крови. Таким образом, купирование тиреотоксикоза Тиамазолом нормализует гормональный фон, но не способно нормализовать синтез цитокинов и регуляторно-транспортного $\alpha 2$ -МГ, что способствует рецидивированию воспалительных реакций и реактивации аутоиммунных процессов.

Ключевые слова: диффузный токсический зоб, цитокины, альфа-2-макроглобулин, культуры клеток крови, супернатант, митогенная стимуляция, Тиамазол

Адрес для переписки:

Зорина Вероника Николаевна
ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» МЗ РФ
654005, Россия, Кемеровская обл., г. Новокузнецк, пр. Строителей, 5.
Тел.: 8 (3843) 45-84-18.
E-mail: macroglobulin@yandex.ru

Address for correspondence:

Zorina Veronika N.
Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine
654005, Russian Federation, Novokuznetsk, Stroiteley pr., 5.
Phone: 7 (3843) 45-84-18.
E-mail: macroglobulin@yandex.ru

Образец цитирования:

В.Н. Зорина, Т.П. Маклакова, Т.Т. Шепель, О.Н. Бойко, Р.М. Зорина, Н.А. Зорин, «Концентрации тиреоидных гормонов, цитокинов и альфа-2-макроглобулина в сыворотке крови и супернатантах культур клеток крови при диффузном токсическом зобе» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 53–58.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-53-58
© Зорина В.Н. и соавт., 2015

For citation:

V.N. Zorina, T.P. Maklakova, T.T. Sheppel, O.N. Boyko, R.M. Zorina, N.A. Zorin, "Contents of thyroid hormones, cytokines and $\alpha 2$ -macroglobulin in blood sera and in culture supernates of blood cells from the Graves disease patients", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 53–58.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-53-58
DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-53-58>

CONTENTS OF THYROID HORMONES, CYTOKINES AND α 2-MACROGLOBULIN IN BLOOD SERA AND IN CULTURE SUPERNATES OF BLOOD CELLS FROM THE GRAVES DISEASE PATIENTS

Zorina V.N., Maklakova T.P., Sheppel T.T., Boyko O.N., Zorina R.M., Zorin N.A.

Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Novokuznetsk, Russian Federation

Abstract. We had investigated levels of TTG, T4, TNF α , IL-6, IFN γ , and α 2-MG in blood serum and supernates of short-term blood cultures in the patients with verified Graves disease before treatment and after reaching of euthyroid status, as compared with healthy controls. We have revealed that initial blood concentrations of free T4 in the patients were increased, along with decrease in TSH, higher IL-6, IFN γ levels, as well as concentrations of α 2-MG which participates in cytokine transport and synthesis. Thiamazole treatment normalized the hormonal profile and reduced blood levels of IL-6, IFN γ and α 2-MG, however, without complete normalization, along with increase of serum TNF α contents. It was shown, that the patients before treatment had decreased *in vitro* response of cells to the mitogenic stimulation as shown by decreased induction of TNF α and IFN γ production, along with, increased spontaneous IFN γ levels. When reaching euthyroid state after Thiamazole administration, we observed an increased spontaneous IFN γ synthesis, decreased IL-6 production in resting cultures. In mitogen-stimulated cell cultures from the treated patients, IFN γ contents became normal, however, TNF α secretion remained lower than in controls. The α 2-MG levels in supernates were stable and significantly lower, than in serum. We may presume that thyrotoxicosis treatment with Thiamazole causes stabilization of the endocrine state, however, being not sufficient for normalized production of cytokines, as well as α 2-MG, with its regulatory and transporter functions, thus promoting recurrence of disease and reactivation of autoimmune events.

Keywords: Graves disease, cytokines, α 2-macroglobulin, blood cells cultures, supernatant, mitogen stimulation, Thiamazole

Введение

Диффузный токсический зоб (ДТЗ), или болезнь Грейвса, является распространенным орган-специфическим аутоиммунным заболеванием. [6]. Развитие иммунологической толерантности приводит к инфильтрации тканей лимфоцитами, продукции аутоантител, в том числе против тиреоид-стимулирующего гормонального рецептора, что минимизирует стимулирующее действие ТСГ, гипертиреозу и диффузной гиперплазии тканей щитовидной железы [4, 6]. Дисгормональные проявления ДТЗ успешно купируются адекватной терапией [4], но аутоиммунные процессы зачастую сохраняются, что приводит к рецидивирующему течению болезни. Существенную роль в развитии аутоиммунных процессов играют нарушения молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий, осуществляемых цитокинами, которые вовлечены в индуцирование эффекторной фазы иммунного ответа и развитие воспаления, стимулируют выброс NO и простагландинов, а также могут на-

прямую повреждать клетки щитовидной железы, их уровни коррелируют с активностью заболевания и снижаются при лечении [4, 6]. Секретция, транспорт и презентация цитокинов в свою очередь зависят от α 2-макроглобулина (α 2-МГ) [1], однако его роль при ДТЗ до настоящего времени не изучалась.

Целью нашего исследования было изучение соотношения тиреоидных гормонов, некоторых цитокинов и α 2-МГ в сыворотке крови и супернатантах краткосрочных культур клеток крови при ДТЗ на фоне обострения и после достижения эутиреоидного состояния.

Материалы и методы

Группа больных ДТЗ состояла из пациенток эндокринологического отделения в возрасте $42,7 \pm 2,8$ лет. Диагноз основывался на клинических признаках, результатах лабораторных анализов и данных УЗИ – у 60% ДТЗ установлен впервые, у 40% верифицирован рецидив заболе-

вания. Критериями исключения были наличие сопутствующих аутоиммунных либо воспалительных заболеваний иного генеза, подострого амиодарониндуцированного тиреоидита и узловых новообразований в щитовидной железе. Исследование проводилось на фоне манифестации заболевания (35 чел.) и через 4-6 месяцев (25 чел.) при достижении эутиреоидного состояния назначением Тиамазола (суточная доза 20-30 мг/сутки с переходом на поддерживающую 10 мг/сутки). Контрольная группа состояла из 25 практически здоровых женщин сравнимого возраста ($39,8 \pm 3,6$ лет), отобранных на основании стандартных профосмотров. Супернатанты суточных культур клеток крови анализировались у 10 больных до лечения, у 10 – после достижения эутиреоидного состояния и у 12 женщин контрольной группы. Получено информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Образцы крови из локтевой вены использовались для получения сыворотки и для культивирования клеток крови при помощи наборов «Цитокин-стимул-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Культивирование проводилось по инструкции в течение 24 ч, стимуляция клеток осуществлялась липополисахаридом пневмококка, фитогемагглютинином-Р и конканавалином-А. Сыворотку крови и супернатанты культур клеток отделяли центрифугированием. Индекс стимуляции (ИС) рассчитывали как отношение концентраций исследуемых белков в митоген-стимулированных супернатантах культур клеток крови к спонтанной продукции.

Для определения уровней свободного T_4 и ТТГ, а также цитокинов (IL-6, TNF α и IFN γ) использовали коммерческие наборы (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) для твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и оборудование для проведения ИФА (Bio-Rad, США). Концентрацию $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови определяли

методом количественного низковольтного ракетного иммуноэлектрофореза, а в супернатантах – методом ИФА с использованием исследовательских тест-систем, разработанных на базе НИЛ иммунологии ГБОУ ДПО НГИУВ.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы для биостатистики InStat-2 (GraphPad, США).

Результаты

При манифестации ДТЗ концентрация ТТГ в сыворотке крови была в 45 раз ниже, чем у здоровых, и нормализовалась при лечении Тиамазолом (табл. 1). Соответственно, уровень свободного T_4 на фоне обострения заболевания был в 3,6 раза выше нормы и снижался при достижении эутиреоидного состояния. Кроме того, при обострении ДТЗ в полтора раза была увеличена концентрация $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови, лечение не приводило к нормализации уровня этого белка, хотя и способствовало достоверному снижению по сравнению с обострением заболевания. При этом концентрация TNF α в сыворотке крови не отличалась от показателей контрольной группы при обострении ДТЗ и удваивалась на фоне лечения. Уровень IL-6 при манифестации ДТЗ был в 20 раз выше контрольных значений, снижался и на фоне лечения, но не нормализовался полностью, оставаясь повышенным в 6 раз. Содержание IFN γ в сыворотке крови превышало норму и практически не снижалось при достижении эутиреоидного состояния.

В супернатантах суточных культур клеток крови (табл. 2) концентрация $\alpha 2$ -МГ была практически одинаковой в норме, при обострении ДТЗ, и на фоне лечения, как при спонтанном синтезе, так и при стимуляции. В целом его уровни в супернатантах были в 60-80 раз ниже, чем в сыворотке крови.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ ГОРМОНОВ, ЦИТОКИНОВ И $\alpha 2$ -МГ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ДТЗ

Показатели	Контрольная группа	ДТЗ до лечения	ДТЗ эутиреоидное состояние
ТТГ (мЕ/л)	$1,37 \pm 0,16$	$0,03 \pm 0,01^*$	$2,67 \pm 0,72^{**}$
T_4 -своб. (нмоль/л)	$16,38 \pm 0,71$	$59,08 \pm 6,18^*$	$14,67 \pm 1,40^{**}$
$\alpha 2$ -МГ (г/л)	$1,89 \pm 0,06$	$2,85 \pm 0,1^*$	$2,37 \pm 0,1^*, **$
TNF α (пкг/мл)	$0,9 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2^*, **$
IL-6 (пкг/мл)	$0,5 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,9^*$	$3,0 \pm 0,8^*, **$
IFN γ (пкг/мл)	$1,8 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,7^*$	$3,4 \pm 0,8^*$

Примечание. В скобках указано количество обследованных, * – достоверные различия ($P < 0,05$) между ДТЗ и контрольной группой; ** – достоверные отличия между показателями групп ДТЗ.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ГОРМОНОВ, ЦИТОКИНОВ И $\alpha 2$ -МГ В СУПЕРНАТАНТАХ СУТОЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ДТЗ

Показатели	Контрольная группа		ДТЗ до лечения		ДТЗ эутиреоидное состояние	
	Спонтанный синтез	Митогенная стимуляция	Спонтанный синтез	Митогенная стимуляция	Спонтанный синтез	Митогенная стимуляция
TNF α (пкг/мл)	2,8 $\pm$ 0,6	1233 $\pm$ 228,7	0,8 $\pm$ 0,5	550,5 $\pm$ 134,3*	1,0 $\pm$ 0,6	282,6 $\pm$ 69,6*
IL-6 (пкг/мл)	105,5 $\pm$ 23,7	22088 $\pm$ 3770	90,4 $\pm$ 39,7	17402 $\pm$ 2306	43,5 $\pm$ 15,4*	18124 $\pm$ 6499
IFN γ (пкг/мл)	0	1233 $\pm$ 228,7	0,8 $\pm$ 0,5*	517,8 $\pm$ 79,9 **	1,0 $\pm$ 0,6*	1070,4 $\pm$ 221,3**
$\alpha 2$ -МГ (г/л)	0,032 $\pm$ 0,004	0,030 $\pm$ 0,002	0,034 $\pm$ 0,003	0,034 $\pm$ 0,003	0,030 $\pm$ 0,002	0,030 $\pm$ 0,003

Примечание. См. пояснения к таблице 1.

Секреция TNF α в культуре (табл.2) при ДТЗ была достоверно ниже показателей контрольной группы и не изменялась при достижении эутиреоидного состояния. Индекс стимуляции при обострении ДТЗ был выше, чем в контрольной группе (688 против 440) и снижался при лечении до 283. Спонтанная продукция данного цитокина в культуре клеток увеличивала его концентрацию в супернатантах в 16 раз по сравнению с сывороткой крови в контрольной группе, а митогенная стимуляция — в 6850 раз. Секреция TNF α в нестимулированных культурах клеток при манифестации ДТЗ была выше только в 4 раза по сравнению с сывороткой крови, а митогенная стимуляция увеличивала различие до 2500 раз. При достижении эутиреоидного состояния спонтанная продукция цитокина клетками увеличивала его концентрацию в супернатантах в 2,6 раза по сравнению с сывороткой крови, а митогенный ответ был в 743 раза активнее.

Содержание IL-6 в супернатантах нестимулированных культур клеток крови было практически идентично в контрольной группе и при ДТЗ до лечения, но снижалось при лечении Тиамазолом более чем в 2 раза, при стимуляции достоверных различий не обнаружено. Индекс стимуляции при ДТЗ до лечения был сопоставим с нормой (193 и 209 соответственно) и увеличивался практически вдвое после применения Тиамазола (до ИС = 417). Содержание IL-6 в супернатантах при спонтанном синтезе было в десяток раз выше, чем в сыворотке крови при ДТЗ (в норме — в 200 раз). При митогенной стимуляции суточных культур наименьший ИС был при ДТЗ до лечения (1871), при достижении эутиреоидного состояния повышался (ИС = 6041), но не достигал контрольных значений (ИС = 44176).

IFN γ в супернатантах нестимулированных культур клеток крови контрольной группы фак-

тически не обнаруживался и был минимален при ДТЗ вне зависимости от активности процесса. При митогенной стимуляции концентрация интерферона в супернатантах была намного выше, причем в норме и на фоне лечения Тиамазолом она была в среднем в 2 раза выше, чем при обострении. При сравнении содержания IFN γ в сыворотке крови и в супернатантах после суточного культивирования клеток крови не обнаружено различий при спонтанной секреции, а при добавлении митогенов различие в норме составляло более чем 600 раз, при достижении эутиреоидного состояния около — 300 и при обострении — около 100 раз.

Обсуждение

Как и предполагалось, концентрации ТТГ и свободного тироксина нормализовались при достижении стойкого эутиреоидного состояния при лечении Тиамазолом в течение 4-6 месяцев [4]. Однако результаты исследования уровней $\alpha 2$ -МГ и цитокинового профиля не столь однозначны.

Известно, что трансформированный протеиназами МГ связывает и транспортирует липополисахариды, лектины и цитокины к клеткам, где либо запускает каскад реакций форфорилирования через стерженьковые рецепторы (grpr78 и пр.), либо поглощается клеткой через рецепторы эндоцитоза (LRP) с дальнейшим процессингом и запуском биосинтеза соответствующих молекул [1]. Поскольку нами выявлено накопление $\alpha 2$ -МГ в циркуляции, а лечение снижает, но не нормализует его количество, можно предположить, что при ДТЗ либо изменен синтез и, соответственно, спектр регуляторных воздействий, реализуемых $\alpha 2$ -МГ, либо нарушены процессы его утилизации. В целом количество $\alpha 2$ -МГ, способного связать цитокины в крови при ДТЗ, до-

статочны и даже избыточно, притом что период полувыведения комплекса трансформированного $\alpha 2$ -МГ с цитокинами не превышает 1-2 минут и количество данных форм в циркуляции минимально (1-2% от общего пула). Поскольку синтез $\alpha 2$ -МГ индуцирует IL-6 [1], избыток данного цитокина при ДТЗ, обнаруженный нами и другими авторами [4, 6], может быть причиной повышенных уровней $\alpha 2$ -МГ в циркуляции. Антагонистом IL-6 является TNF α , блокирующий транскрипцию гена $\alpha 2$ -МГ [1], что может способствовать снижению концентрации последнего в крови при повышении уровней TNF α на фоне лечения. С другой стороны, избыток IFN γ блокирует экспрессию рецепторов эндоцитоза на поверхности клеток-мишеней [5], что может приводить к задержке $\alpha 2$ -МГ в циркуляции и препятствовать проведению сигналов через LRP как при манифестации ДТЗ, так и при достижении эутиреоидного состояния.

Содержание всех изученных цитокинов в крови при ДТЗ было повышено, что совпадает с литературными данными [4, 6], а отсутствие нормализации их уровней на фоне лечения Тиамазолом свидетельствует о том, что купирование симптоматики не устраняет причину заболевания и риск рецидивирования.

Согласно полученным данным, концентрация $\alpha 2$ -МГ в супернатантах краткосрочных культур клеток крови была резко снижена по сравнению с сывороткой крови, как при отсутствии, так и при наличии митогенов. Мы предполагаем, что причиной подобного явления служит активный эндоцитоз данного белка, на который не оказывают существенного влияния липополисахариды и лектины, притом что способность клеток крови к синтезу $\alpha 2$ -МГ значительно ниже, чем синтетический потенциал гепатоцитов, где и образуется подавляющая часть циркулирующего $\alpha 2$ -МГ [1]. При активном эндоцитозе стимулирующих факторов (в т.ч. цитокинов) в составе комплекса с $\alpha 2$ -МГ большая их часть попадает внутрь клеток-мишеней не позднее 30 минут от начала реакции, запуская митоз клеток через трансмембранные стержневые рецепторы — пик секреции цитокинов в культурах клеток обычно составляет от 3 до 24 часов [3].

Синтез предшественников цитокинов происходит в рибосомах, они доставляются к цитоплазматической мембране и экспрессируются в виде типичного трансмембранного стержневого рецептора, а для высвобождения цитокина (растворимая форма) путем лизиса определенных связей

необходимо наличие соответствующих гидролаз [2]. В их числе — костная морфогенетическая протеиназа BMP-1, входящая в состав литического домена CUB макроглобулинов, компонентов системы комплемента и металлопротеиназ семейства ADAMTS [2]. Обнаруженное в рамках данного исследования существенное количество цитокинов в супернатантах культур клеток свидетельствует как об активизации биосинтеза цитокинов, так и достаточности гидролазного потенциала для отделения их от цитоплазматических мембран клеток крови.

В нестимулированных культурах клеток контрольной группы обращает на себя внимание явное превалирование секреции IL-6 над иными цитокинами, обнаруживаемое ранее и другими авторами в культурах мононуклеаров [4]. Возможно, оно направлено на стимуляцию восполнения дефицита $\alpha 2$ -МГ, регулируемого по типу обратной связи, но биосинтетические возможности клеток крови для этого явно недостаточны. Оппозитное влияние двух других цитокинов на IL-6 в спонтанных культурах клеток крови прослеживается только при достижении эутиреоидного состояния при ДТЗ и может быть случайным. Нами не обнаружена активация синтеза TNF α в культуре клеток крови, аналогичная активации синтеза в культурах мононуклеаров, описываемой другими авторами [4].

Сходная картина имеет место и при митогенной стимуляции — синтез IL-6 явно превалирует над секрецией иных цитокинов, причем лечение ДТЗ Тиамазолом не оказывает на него существенного влияния. При стимуляции культур митогенами секреция TNF α при ДТЗ достоверно снижена, что может быть связано с блокирующим действием избытка IL-6 на его секрецию.

Накопление цитокинов в супернатантах на фоне снижения количества $\alpha 2$ -МГ может быть связано со снижением активности эндоцитоза как под влиянием IFN γ [5], так и за счет повреждения молекул $\alpha 2$ -МГ NO-радикалами, высвобождающимися под влиянием цитокинов [6], что снижает сродство $\alpha 2$ -МГ к рецепторам [1].

Таким образом, применение Тиамазола нормализует гормональный фон и купирует клинические проявления тиреотоксикоза, но не способно нормализовать синтез цитокинов и регуляторно-транспортного $\alpha 2$ -МГ, что приводит к рецидивированию воспалительных реакций и реактивации аутоиммунных процессов.

Список литературы / References

1. Зорин Н.А., Зорина В.Н. Сигнальная система макроглобулинов. (Обзор литературы) // Биомедицинская химия, 2012. № 4. С. 400-410. [Zorin N.A., Zorina V.N. Signaling system of macroglobulins. Review. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2012, no. 4, pp. 400-410. (In Russ.)]
2. Baran P., Nitz R., Grötzinger J., Scheller J., Garbers C. Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 21, pp. 14756-14768.
3. Chávez-Tapia N.C., Rosso N., Uribe M., Bojalil R., Tiribelli C. Kinetics of the inflammatory response induced by free fatty acid accumulation in hepatocytes. *Ann. Hepatol.*, 2013, Vol. 13, no. 1, pp. 113-120.
4. Li Y., Wang Z., Yu T., Chen B., Zhang J., Huang K., Huang Z. Increased expression of IL-37 in patients with Graves' disease and its contribution to suppression of proinflammatory cytokines production in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One.*, 2014, Vol. 16, no. 9, e107183.
5. Marzolo M.P., von Bernhardt R., Bu G., Inestrosa N.C. Expression of alpha(2)-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.*, 2000, Vol. 60, no. 3, pp. 401-411.
6. Mikoś H., Mikoś M., Obara-Moszyńska M., Niedziela M. The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). *Endokrynol. Pol.*, 2014, Vol. 65, no. 2, pp. 150-155.

Авторы:

Зорина В.Н. — д.б.н., главный научный сотрудник, НИЛ иммунологии, ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» МЗ РФ, г. Новокузнецк, Россия

Маклакова Т.П. — д.м.н., профессор кафедры эндокринологии и диабетологии, ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» МЗ РФ, г. Новокузнецк, Россия

Шепель Т.Т. — клинический ординатор кафедры эндокринологии и диабетологии, ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» МЗ РФ, г. Новокузнецк, Россия

Бойко О.Н. — клинический ординатор кафедры эндокринологии и диабетологии, ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» МЗ РФ, г. Новокузнецк, Россия

Зорина Р.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник, НИЛ иммунологии, ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» МЗ РФ, г. Новокузнецк, Россия

Зорин Н.А. — д.б.н., профессор, заведующий НИЛ иммунологии, ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» МЗ РФ, г. Новокузнецк, Россия

Authors:

Zorina V.N., PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Novokuznetsk, Russian Federation

Maklakova T.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Endocrinology and Diabetology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Novokuznetsk, Russian Federation

Sheppel T.T., Resident Physician, Department of Endocrinology and Diabetology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Novokuznetsk, Russian Federation

Boyko O.N., Clinical Resident, Department of Endocrinology and Diabetology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Novokuznetsk, Russian Federation

Zorina R.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Novokuznetsk, Russian Federation

Zorin N.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Novokuznetsk, Russian Federation

Поступила 13.11.2014
Принята к печати 23.11.2014

Received 13.11.2014
Accepted 23.11.2014

ГОМОЛОГИЧНЫЙ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ И Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ЛЮДЕЙ НА ЖИВЫЕ РЕАССОРТАНТНЫЕ ГРИППОЗНЫЕ ВАКЦИНЫ А(Н5N2) И А(Н7N3)

Найхин А.Н.¹, Донина С.А.¹, Лосев И.В.¹, Петухова Г.Д.¹,
Кореньков Д.А.¹, Стукова М.А.², Ерофеева М.К.², Коншина О.С.²,
Смолоногина Т.А.¹, Дорошенко Е.М.¹, Григорьева Е.П.¹,
Руденко Л.Г.¹

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. С начала века периодически регистрируются среди людей вспышки гриппа А, вызванные птичьими вирусами с гемагглютинидами (НА) Н5, Н7 и Н9. Это не исключает, что данные вирусы могут стать возбудителями следующей пандемии. Поэтому создание резервных вакцин, включающих птичий вирус гриппа А является глобальным приоритетом для органов здравоохранения (меморандум ВОЗ). Нами изучен гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ на живые реассортантные гриппозные вакцины (ЖГВ), приготовленные из птичьих вирусов гриппа А(Н5N2) и А(Н7N3). Тестировали сывороточные (РТГА, РМН, ИФА) и локальные (ИФА) антитела, а также вирусспецифические CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки центральной (Тсм) и эффекторной (Тем) иммунологической памяти. Изучали иммунный ответ к вакцинным и гетерологичным штаммам птичьих вирусов. Двухкратная прививка ЖГВ А(Н5N2) и ЖГВ А(Н7N3) индуцировали у волонтеров гомологичный и Т-клеточный иммунный ответ в виде конверсий сывороточных и локальных антител, а также вирусспецифических CD4⁺/CD8⁺Т-лимфоцитов пулов Тсм и Тем. Те же вакцины стимулировали гетерологичный иммунный ответ, отражавшийся в накоплении перекрестнореагирующих сывороточных и локальных IgА-антител, а также перекрестнореагирующих CD4⁺/CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти. Выраженность гетерологичных иммунных ответов зависела от антигенной формулы вакцинного и гетерологичного вируса, а именно: от наличия или отсутствия в них общего НА.

Ключевые слова: птичий вирус гриппа, иммунный ответ к вирусам гриппа А, гуморальный иммунный ответ

Адрес для переписки:

Кореньков Даниил Анатольевич
ФГБУ «Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины» СЗО РАМН
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-60.
E-mail: d.korenkov@gmail.com

Address for correspondence:

Korenkov Daniil A.
Research Institute for Experimental Medicine of the North-West
Branch of the Russian Academy of Medical Sciences
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-68-60.
E-mail: d.korenkov@gmail.com

Образец цитирования:

А.Н. Найхин, С.А. Донина, И.В. Лосев, Г.Д. Петухова,
Д.А. Кореньков, М.А. Стукова, М.К. Ерофеева, О.С. Коншина,
Т.А. Смолоногина, Е.М. Дорошенко, Е.П. Григорьева,
Л.Г. Руденко, «Гомологичный и гетерологичный гуморальный
и Т-клеточный иммунный ответ людей на живые
реассортантные гриппозные вакцины А(Н5N2) и А(Н7N3)» //
Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 59-70.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-59-70
© Найхин А.Н. и соавт., 2015

For citation:

A.N. Naykhin, S.A. Donina, I.V. Losev, G.D. Petukhova,
D.A. Korenkov, M.A. Stukova, M.K. Erofeeva, O.S. Konshina,
T.A. Smolonogina, E.M. Doroshenko, E.P. Grigorieva,
L.G. Rudenko, "Homological and heterological antibody and T cell
immune responses to live attenuated influenza vaccine A (H5N2)
and A (H7N3)", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 59-70.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-59-70
DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-59-70

HOMOLOGICAL AND HETEROLOGICAL ANTIBODY AND T CELL IMMUNE RESPONSES TO LIVE ATTENUATED INFLUENZA VACCINE A (H5N2) AND A (H7N3)

Naykhin A.N.^a, Donina S.A.^a, Losev I.V.^a, Petukhova G.D.^a,
Korenkov D.A.^a, Stukova M.A.^b, Erofeeva M.K.^b, Konshina O.S.^b,
Smolonogina T.A.^a, Doroshenko E.M.^a, Grigorieva E.P.^a, Rudenko L.G.^a

¹ Research Institute for Experimental Medicine of the North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

² Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. From the beginning of 21st century outbreaks of H5, H7 and H9 avian flu are registered from time to time. These viruses are considered as one of the possible causes of the next pandemia. The development of avian influenza vaccines is one of the WHO priorities. The aim of this work was to study antibody and cellular immune responses to avian A (H5N2) and A (H7N3) live attenuated influenza vaccines (LAIVs). We examined serum antibodies (HAI assay, microneutralization assay, ELISA), local antibodies (ELISA) and virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ central memory and effector memory T cells. Two doses vaccination of healthy volunteers with A (H5N2) and A (H7N3) LAIVs induced homological antibody and cellular immune responses (i. e. serum and local antibody conversions, virus-specific memory T cell growth). These vaccines also stimulated heterological immunity (heterological serum and local antibodies and T cells). Heterological immune response intensity depended on antigenic structure of vaccine strain and heterological virus, particularly on HA type.

Keywords: avian influenza viruses, immune response to influenza A viruses, humoral immune response

Работа выполнена при финансовой поддержке PATH Vaccine Solutions (США) и Российского фонда научных исследований. Авторы выражают благодарность сотрудникам фондового агентства PATH Vaccine Solutions (США) и ФГУП «Научно-производственное объединение по медицинским иммуно-биологическим препаратам «Микроген» МЗ РФ за активное участие в проведении клинических исследований ЖГВ A(H5N2) и A(H7N3).

Введение

Вирусы гриппа А, кроме ежегодных сезонных эпидемий, вызывают пандемии. Этиологическими агентами таких пандемий являются сероподтипы вируса с обновленным гемагглютинином. В последнее столетие зафиксированы пандемии гриппа А(H1N1), А(H2N2) и А(H3N2). С начала 21^{го} века периодически регистрируются среди людей вспышки гриппа А, вызванные птичьими вирусами с гемагглютинином H5, H7 и H9 [12, 14, 15, 26, 29]. Вспышки гриппа А(H5N1) сопровождалась тяжелыми клиническими проявлениями болезни с высокой летальностью [13]. Хотя невозможно предсказать возбудитель следующей пандемии, не исключено, что это будет птичий вирус гриппа А с одним из перечисленных выше гемагглютининов. Это диктует необходимость создания резервных вакцин, приготовленных из всех потенциально пандемических птичьих подтипов вирусов гриппа А. Согласно меморан-

думу ВОЗ [28], создание таких вакцин является глобальным приоритетом для органов здравоохранения. Известно, что живые реассортантные гриппозные вакцины (ЖГВ) имеют преимущество перед инактивированными вакцинами в защите от сезонных возбудителей гриппа А за счет индукции локального гуморального и клеточного иммунитета [13]. В США проведены первые фазы клинических испытаний на волонтерах резервных реассортантных ЖГВ А(H5N1) [11], А(H6N1) [21], А(H7N3) [22] и А(H9N2) [10], включающих оба поверхностных белка, то есть гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA), от соответствующих птичьих вирусов, и внутренние белки от донора аттенуации А/Ann Arbor/6/60 А(H2N2). Аналогичные клинические испытания прошла отечественная ЖГВ А(H5N2), имеющая HA от апатогенного вируса А/утка/Потсдам/86/92(H5N2), а NA и внутренние белки от донора аттенуации А/Leningrad/134/17/57 (H2N2) [4, 9].

В настоящей работе представлены данные об иммуногенности двух других отечественных резервных ЖГВ, приготовленные на основе того же донора аттенуации. Изучали в разных лабораторных тестах поствакцинальную продукцию гомологичных и гетерологичных сывороточных и локальных антител, а также вирусспецифических Т-клеток иммунологической памяти.

Материалы и методы

Вакцины

Вакцинные штаммы для ЖГВ А(Н5N2) и А(Н7N3) разработаны в отделе вирусологии имени А.А. Смородинцева Научно-исследовательского института экспериментальной медицины Российской академии наук и произведены в НПО «Микроген». Штаммы получены классическим реассортантным методом. Первая из них включала НА Н5 от патогенного вируса А/индюк/Турция/1/2005 (Н5N1), а НА N1 и все внутренние белки — от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) — генетическая формула 1/7. Второй штамм содержал НА Н7 и НА N3 от апатогенного вируса А/селезень/Нидерланды/12/00 (Н7N3) и внутренние белки от того же донора аттенуации — генетическая формула 2/6. Для обеспечения безопасности лабораторных работ вакцинные НА Н5 и НА Н7 доктором J. Wood были модифицированы обратногогенетическим способом — вырезка полноосновного участка кливедж-сайта (National Institute for Biological Standardization and Control, United Kingdom). Это делало их апатогенными. Для удобства изложения материала далее ранее апробированная ЖГВ А/утка/Потсдам/86/92 (Н5N2) [4, 9] обозначается как ЖГВ А(Н5N2)-утка, а испытываемая ЖГВ А/индюк/Турция/1/2005 (Н5N2) — как ЖГВ А(Н5N2) — индюк.

Волонтеры

Испытание вакцин на волонтерах проведены в полном соответствии с национальным стандартом Российской Федерации (ГОСТ Р52379-2005) «Надлежащая клиническая практика», отражающем международный этический и научный стан-

дарт планирования и проведения исследований с участием человека (Good Clinical Practice; GCP). Схема вакцинации и отбора биологических проб (венозная кровь, секреты носа) при испытании обоих штаммов была одинаковой: первая точка — до вакцинации, вторая — через 28 дней после первичной вакцинации, третья — через 28 дней после вторичной вакцинации, которую осуществляли через 28 дней после первичной. Аналогичная схема применялась и при обследовании контрольных групп добровольцев, получавших препарат плацебо (все ингредиенты наполнителя без вируса). Состав групп по числу, полу и возрасту существенно не отличался (табл. 1). Вакцины и плацебо вводили стандартным коммерческим распылителем в обе ноздри по 0,25 мл в каждую. По клиническим данным обе вакцины были адекватными.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

РТГА воспроизводили по стандартной методике [17]. Сыворотки крови обрабатывали RDE (receptor destroy enzyme). Рабочая доза антигенов составляла 2АЕ, поскольку в предварительных исследованиях было показано ее преимущество перед 4АЕ. Применяли параллельно 1% взвесь человеческих эритроцитов 0(I) группы крови и эритроцитов лошади. Достоверной конверсией титров антител считали его поствакцинальное увеличение в 4 и более раза по отношению к довакцинальному.

Реакция микронеutralизации (РМН)

РМН выполняли стандартным методом [17] на культуре клеток MDCK в концентрации 200 тыс. клеток/мл. Рабочее разведение вируса составляло 100 TCD₅₀/50 мкл. Достоверным считали увеличение титра сывороточных антител в 4 и более раза в поствакцинальный период по отношению к довакцинальному.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

IgA- и IgG-антитела в сыворотке крови и IgA-антитела в секретах верхних дыхательных путей выявляли в ИФА по ранее описанной методике [1]. На планшете сорбировали 16АЕ вирусов, очищенных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (30-60%). За титр сывороточных

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЛОНТЕРОВ

Вакцина	Группа	Число лиц	Возраст (лет)		Пол	
			Средний	Колебания	Мужской	Женский
А(Н5N2) – индюк	Привитые вакциной	29	27,2	20-49	20 (69,0%)	9 (31,0%)
	Плацебо	10	29,2	20-46	6 (60,0%)	4 (40,0%)
	Всего	39	27,7	20-49	26 (66,7%)	13 (33,3%)
А(Н7N3)	Привитые вакциной	29	30,9	18-49	14 (48,3%)	15 (51,7%)
	Плацебо	10	39,0	20-48	6 (60,0%)	4 (40,0%)
	Всего	39	32,9	18-49	20 (51,3%)	19 (48,7%)

и локальных антител принимали наибольшее разведение исследуемого материала, при котором оптическая плотность (ОП) лунки с образцами превышала среднюю ОП в контрольных лунках (все ингредиенты реакции, не содержащие исследуемый материал) в 2 и более раза. За достоверный прирост титров антител в сыворотке крови и в СВДП принимали его увеличение в 4 и более раза.

Определение вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти

Эти клетки тестировали в проточной цитометрии общепринятым методом внутриклеточного окрашивания цитокинов (IFN γ) после стимуляции клеток *in vitro* 12 MOI очищенного ультрацентрифугированием вакцинного штамма [4, 9]. Мононуклеары периферической крови выделяли стандартным способом на градиенте плотности HISTOPAQUE-1077, отмывали и хранили до проведения анализа в жидком азоте. Для определения спонтанной продукции IFN γ вместо стимуляции вирусом к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды RPMI-1640 (отрицательный контроль). В качестве положительного контроля использовали стимуляцию клеток поликлональным стимулятором — стафилококковым энтеротоксином В. После разморозки порции клеток волонтеров, отобранные во всех временных интервалах, были способны к активации продукции IFN γ . При анализе данных показатели отрицательного контроля вычитались из аналогичных показателей, полученных для вирусстимулированных клеток. Показатели всех контролей были адекватны.

В проточной цитометрии маркерами Т-лимфоцитов центральной (Т_{см}) и периферической (Т_{ем}) иммунологической памяти CD4⁺

и CD8⁺ клеток служили меченные флюорохромом мононуклеарные антитела к, соответственно, CCR7⁺CD45RA⁺ и CDR7-CD45RA⁺ (Beckman Coulter, Becton Dickinson). Достоверным увеличением уровня клеток у привитых считали 3 стандартных отклонения от уровня тех же клеток у лиц контрольной группы, получавших препарат плацебо.

Антигены

В РТГА, РМН и ИФА использовали апатогенные вакцинные штаммы вирусов NIBRG-23 (А/индюк/Турция/1/2005*PR/8), А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2), А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2), А/17/селезень/Нидерланды/00/95 (H7N3) и А/17/Ануи/2013/61 (H7N9).

Статистическая обработка результатов

Использовали программное обеспечение Statistica и Graph Pod Prizm 5. Для сравнения данных применяли Wilcoxon Mathed Paire Test, Friaman ANOVA и Fisher exact (two-tailed).

Результаты

В таблице 2 представлены сведения о числе конверсий сывороточных и локальных антител у волонтеров, привитых ЖГВ А(H5N2) — индюк.

По суммарным данным, учитывающим конверсии антител во всех лабораторных тестах в совокупности, то есть наличие иммунной реакции на прививку, гуморальный иммунный ответ к вакцинному штамму зафиксирован после первой прививки у 28% волонтеров, после второй — у 76% (P < 0,001). К гетерологичным штаммам А(H5N2) — утка, А(H5N1) и А(H7N3) этот показатель составил, соответственно, 17 и 66%, 17 и 59% (P > 0,05), 10 и 24% (P < 0,01). Если к гетерологичным вирусам со сходными гемагглютинином (HA5) обнаруживались конверсии,

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА (%) ГОМОЛОГИЧНЫХ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГУМОРАЛЬНЫХ ИММУННЫХ ОТВЕТОВ НА ЖГВ А(H5N2) – ИНДЮК

Антитела и лабораторный тест		Конверсии антител у привитых добровольцев (n = 29) к вирусам*							
		А(H5N2) – индюк		А(H5N2) – утка		А(H5N1)		А (H7N3)	
		После 1 ^й прививки	После 1 ^й и/или 2 ^й прививки	После 1 ^й прививки	После 1 ^й и/или 2 ^й прививки	После 1 ^й прививки	После 1 ^й и/или 2 ^й прививки	После 1 ^й прививки	После 1 ^й и/или 2 ^й прививки
Сывороточные	РТГА	4 (14%)	11 (38%)	3 (10%)	14 (48%)	0	3 (10%)	0	0
	РМН	3 (10%)	14 (48%)	ни**	ни	3 (10%)	8 (28%)	ни	ни
	ИФА-IgA	0	2 (7%)	1 (3%)	2 (7%)	ни	ни	2 (7%)	3 (10%)
	ИФА-IgG	0	1 (3%)	0	0	ни	ни	0	0
Локальные	ИФА-IgA	2 (7%)	6 (21%)	2 (7%)	10 (35%)	4 (14%)	8(28%)	1 (3%)	5 (17%)
Кумулятивные данные по всем лабораторным тестам		8 (28%)	22 (76%)	5 (17%)	19 (66%)	5 (17%)	17 (59%)	3 (10%)	7 (24%)

Примечание. * – у волонтеров, получивших препарат плацебо (n = 10), конверсии антител во всех тестах отсутствовали;

** – не исследовали.

как сывороточных (РТГА и ИФА-IgA), так и локальных IgA-антител (ИФА), то к гетерологичному вирусу с НА Н7 конверсии сывороточных антител (РТГА, ИФА-IgG) отсутствовали.

Таблица 3 содержит данные о конверсиях тех же антител у лиц, привитых ЖГВ А(Н7Н3). В качестве гетерологичных использовали вирусы А(Н7Н9) и А(Н5Н2) – утка.

Как в случае с вакциной А(Н5Н2) – индюк, наблюдали: (i) поствакцинальное накопление сывороточных антител (РТГА, ИФА-IgA, ИФА-IgG) и локальных антител (ИФА – IgA) к вакцинному штамму; (ii) поствакцинальную продукцию перекрестноореагирующих сывороточных (ИФА-IgA) и локальных (ИФА-IgA) антител к гетерологичным вирусам; (iii) значительное отставание в частоте индукции антител к гетерологичному вирусу с отличающимся НА Н5 по сравнению с вирусом со сходным НА Н7. Так, по суммарным данным, после первой и второй иммунизации число конверсий антител к вакцинному штамму А(Н7Н3) составило, соответственно, 69 и 86%, а к гетерологичному штамму А(Н7Н9) – соответственно, 31 и 69% ($P < 0,05$), и ко второму гетерологичному штамму А(Н5Н2) – утка – соответственно, 10 и 24% ($P < 0,01$).

Таким образом, на вакцинацию ЖГВ А(Н5Н2) – индюк и А(Н7Н3) абсолютное большинство волонтеров отвечали конверсиями сывороточных и/или локальных антител к вакцинным штаммам (соответственно, 76 и 86%). При этом у значительной части волонтеров наблюдалась продукция тех же антител к гетерологичным вирусам со сходным с вакцинным штаммом гемагглютинином (соответственно, 66 и 69%). В случае, когда вакцинный и гетерологичные

штаммы полностью отличались по составу НА и NA, число таких конверсий антител было значительно ниже (соответственно, 24 и 21%; $P < 0,01$). Последние выявляли только в ИФА (сывороточные и локальные IgA-антитела), но не в РТГА и РМН. Если в отношении частоты (%) гуморальных иммунных ответов у волонтеров на ЖГВ А(Н5Н2)-индюк и А(Н7Н3) результаты были вполне удовлетворительными, то данные об интенсивности продукции антител оказались более скромными (табл. 4). Так, после двухкратной прививки СГТ всех антител хотя и увеличился в 1,5–3,0 раза, но их уровень оказался весьма низким (от 1:5,1 до 1:13,2 – к вакцинным штаммам и от 1:2,5 до 1:10,4 – к гетерологичным штаммам). Исключение составили выявляемые в РТГА сывороточные антитела к вирусу А(Н7Н3) у привитых ЖГВ А(Н5Н2), а также к вирусу А(Н5Н2) у привитых ЖГВ А(Н7Н3). В этих случаях СГТ антител после вакцинации не изменились.

Таким образом, как гомологичный, так и гетерологичный гуморальный иммунный ответ волонтеров на двухкратную прививку ЖГВ А(Н5Н2) – индюк и А(Н7Н3) был хорошо выражен по частоте (% конверсий антител), но значительно слабее по интенсивности продукции антител (СГТ).

Таблица 5 содержит материалы, отражающие частоту конверсий вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺T-клеток центральной (Tcm) и эффектор-ной (Tem) иммунологической памяти на ЖГВ А(Н5Н2) – индюк и А(Н7Н3) у тех же волонтеров. После первой прививки этими вакцинами число конверсий лимфоцитов CD4⁺IFN γ ⁺Tcm и/или Tem и CD8⁺IFN γ ⁺Tcm и/или Tem отмечено, соответственно, у 21–28% волонтеров, после второй – соответственно, у 24–55% волонтеров

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТА (%) ГОМОЛОГИЧНЫХ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГУМОРАЛЬНЫХ ИММУННЫХ ОТВЕТОВ НА ЖГВ А(Н7Н3)

Антитела и лабораторный тест		Конверсии антител у привитых добровольцев (n = 29) к вирусам*					
		А (Н7Н3)		А (Н7Н9)		А(Н5Н2) – утка	
		После 1 ^й прививки	После 1 ^й и/или 2 ^й прививки	После 1 ^й прививки	После 1 ^й и/или 2 ^й прививки	После 1 ^й прививки	После 1 ^й и/или 2 ^й прививки
Сывороточные	РТГА	7 (24%)	13 (45%)	5 (17%)	12 (41%)	0	0
	РМН	5 (17%)	12 (41%)	2 (7%)	5 (17%)	ни**	ни
	ИФА-IgA	3 (10%)	8 (28%)	0	4 (14%)	1 (4%)	3 (10%)
	ИФА-IgG	1 (3%)	3 (10%)	0	0	0	0
Локальные	ИФА-IgA	12 (41%)	14 (48%)	5 (17%)	7 (24%)	2(7%)	5 (17%)
Кумулятивные данные по всем лабораторным тестам		20 (69%)	25 (86%)	9 (31%)	20 (69%)	3(10%)	6 (21%)

Примечание. * – у волонтеров, получивших препарат плацебо (n = 10), конверсии антител во всех тестах отсутствовали;
** – не исследовали.

ТАБЛИЦА 4. ИНТЕНСИВНОСТЬ ГОМОЛОГИЧНЫХ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГУМОРАЛЬНЫХ ИММУННЫХ ОТВЕТОВ НА ЖГВ А(Н5Н2) – ИНДЮК И А(Н7Н3)

Лабораторный тест и антитела (АТ)	Средние геометрические титры (СГТ) и кратность прироста СГТ															
	Привитые А(Н5Н2) – индюк								Привитые А(Н7Н3)							
	А (Н5Н2) – индюк				А(Н5Н2) – утка				А(Н5Н4)				А(Н7Н3)			
	I*	II*	III*	I	II	III	I	II	I	II	III	I	II	III	I	II
РТГА (сывороточные АТ)	2,8	5,1	1,8	2,6	5,4	2,1	2,7	4,3	1,6	2,8	2,7	1,0	3,0	7,0	2,3	2,6
РМН (сывороточные АТ)	5,2	11,8	2,3	ни**	ни	ни	10,0	17,3	1,7	ни	ни	ни	4,2	12,4	3,0	5,1
ИФА-локальные IgA – АТ	7,8	13,2	1,7	5,8	10,4	1,8	5,7	8,5	1,5	5,4	7,9	1,5	7,6	12,6	2,0	4,9

Примечание. *I – СГТ антител до прививки, II – СГТ антител после 2-й прививки, III – кратность деления СГТ после 2-й прививки по отношению к довакцинальному периоду (аналогичный показатель у лиц из контрольной группы плацебо (n = 10) колебался от 0,9 до 1,0); ** – не исследовали.

ТАБЛИЦА 5. ГОМОЛОГИЧНЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ЖГВ А(Н5Н2) – ИНДЮК И А(Н7Н3)

Популяция Т-клеток	Число (%) волонтеров с конверсиями Т-клеток*			
	А(Н5Н2) – индюк, n = 29 чел.		А(Н7Н3), n = 29 чел.	
	После 1 ^й прививки		После 1 ^й прививки	
CD4 ⁺ IFN ⁺	Тсм	5 (17%)	8 (28%)	5 (17%)
	Тem	5 (17%)	11 (38%)	1 (4%)
	Тсм + Тem	8 (28%)	16 (55%)	6 (21%)
CD8 ⁺ IFN ⁺	Тсм	2 (7%)	3 (10%)	1 (4%)
	Тem	6 (21%)	8 (28%)	5 (17%)
	Тсм + Тem	8 (28%)	10 (35%)	6 (21%)
Кумулятивные данные по всем Т-клеткам		11 (38%)	18 (62%)	9 (31%)

Примечание. * – достоверным считали 3 стандартных отклонения (P ≤ 0,01) от данных по контрольной группе волонтеров, получивших препарат плацебо (n = 10 чел.).

($P < 0,01$). Кумулятивные данные по конверсиям всех изученных популяций Т-клеток на иммунизацию ЖГВ А(Н5N2) — индюк и А(Н7N3) составили 38 и 31% (первая прививка) и 62 и 52% (вторая прививка).

Таким образом, обе вакцины индуцировали продукцию вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти. Отмечено существенное увеличение числа конверсий этих клеток после второй прививки.

Таблица 6 дает представление о развитии гетерологичного Т-клеточного иммунного ответа к вирусу А(Н7N9) у лиц, привитых ЖГВ А(Н7N3). Двукратная прививка этой вакциной стимулировала продукцию специфических к гетерологичному вирусу А(Н7N9) CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, соответственно, у 35 и 10% волонтеров, а кумулятивный показатель для обоих типов клеток составил 38%.

Таким образом, вакцина А(Н7N3) индуцировала не только гомологичный, но и гетеросубтипический Т-клеточный иммунный ответ к вирусу с тем же гемагглютинином, но с отличающейся нейраминидазой.

Обсуждение

К настоящему времени клинические испытания на волонтерах в общей сложности прошли семь резервных ЖГВ, приготовленных из птичьих вирусов гриппа А: четыре в США (Н5N1, Н6N1, Н7N3 и Н7N9) и три в России (Н5N2 — утка, Н5N2 — индюк и Н7N3). При оценке гуморального иммунного ответа волонтеров обе группы исследований использовали сходный набор лабораторных тестов. Это дает возможность провести сравнительный анализ полученных результатов.

По кумулятивным показателям иммуногенности российских и американских ЖГВ, отражающим в совокупности число достоверных конверсий сывороточных (РТГА, РМН, ИФА-IgG и ИФА-IgA) и локальных (ИФА-IgA) антител после двукратных прививок, были близки

по значению: соответственно, 76-93% и 66-100% (табл. 2 и [4, 9, 10, 11, 22, 21]). В обоих случаях поствакцинальные титры сывороточных и локальных антител оказались существенно ниже, чем это наблюдалось после иммунизации сезонными ЖГВ [1, 16] и ЖГВ А(Н1N1) pdm2009 [6]. Более слабый по интенсивности гуморальный иммунный ответ на ЖГВ, приготовленные из птичьих вирусов гриппа А, гипотетически связывают с тормозящим влиянием на их репродукцию предсуществующих факторов иммунитета у прививаемых людей, а именно: (i) антител к общей NA у вакцинного и циркулирующего вирусов; (ii) моноклональных антител к консервативному иммунодоминантному эпитопу NA; (iii) перекрестнореагирующими ЦТЛ к консервативным последовательностям внутренних белковых структур вириона [9, 10, 11, 22]. Однако следует помнить, что все эти факторы присутствовали и при формировании более интенсивного гуморального иммунного ответа к сезонным ЖГВ и ЖГВ А(Н1N1) pdm2009. Вряд ли низкий уровень репродукции птичьих вирусов, и, следовательно, гуморального иммунного ответа людей на испытанные ЖГВ связан с отличительной от человеческих вирусов гриппа А способностью птичьих вирусов соединяться исключительно с эпителиальными клетками через рецептор 2,3 Gal [19], присутствие которого в данных клетках верхних дыхательных путей у людей ограничено. Аргументом тому может служить тот факт, что человеческий вирус парагриппа, который связывается с такими же клетками через тот же рецептор 2,3 Gal, прекрасно размножается в верхних отделах дыхательного тракта, и гуморальный иммунный ответ к нему достаточно интенсивный [7]. Объясняют влияние на гуморальный иммунный ответ людей на птичьи вирусы и особенностями его фенотипического рестриктирования, которое может возникать из-за констелляционных преобразований генома при реассортации птичьих и человеческих вирусов гриппа А [10]. Однако

ТАБЛИЦА 6. ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ВИРУС А(Н7N9) У ВОЛОНТЕРОВ, ПРИВИТЫХ ЖГВ А(Н7N3)

Популяция Т-клеток	Число (%) волонтеров с конверсиями Т-клеток*		
	После 1 ^й прививки	После 2 ^й прививки	После 1 ^й и/или 2 ^й прививки
CD4 ⁺ IFN γ ⁺	9 (31,0%)	4 (13,8%)	10 (34,5%)
CD8 ⁺ IFN γ ⁺	3 (10,3%)	2 (6,9%)	3 (10,3%)
Кумулятивные данные по всем Т-клеткам	10 (34,5%)	5 (17,2%)	11 (37,9%)

Примечание. * — достоверным считали 3 стандартных отклонения ($P \leq 0,01$) от данных по контрольной группе волонтеров, получивших препарат плацебо (n = 10 чел.).

в литературе реальных подтверждений этому феномену мы не обнаружили.

Нам представляется, что ослабленный по интенсивности гуморальный иммунный ответ на ЖГВ, приготовленные из птичьих вирусов, связан не столько с их биологическими особенностями, сколько с фактом отсутствия у прививаемых лиц В-клеточной иммунологической памяти к данным возбудителям, поскольку эти люди контактировали с ними впервые. Такой же феномен наблюдался в 1977 году при рециркуляции вируса гриппа А(Н1N1) после двадцатилетнего перерыва. Так, в начале его пандемического цикла у молодых людей, впервые встретившихся с этим вирусом, постинфекционный и поствакцинальный антительный иммунный ответ был намного ниже, чем у более старших людей, которые перенесли грипп А(Н1N1) в период его предшествующего пандемического цикла [2, 3, 5]. Однако через 3 года после активной циркуляции вируса А(Н1N1) этот феномен нивелировался. Другим важным аргументом может служить тот факт, что у непримированных лиц 1969 г. рождения и младше гуморальный иммунный ответ на двукратную прививку ЖГВ А(Н2N2), приготовленную из циркулировавшего в 1957-1968 гг. пандемического вируса данного серотипа, был столь же низким по интенсивности, как и на ЖГВ, включавших птичьих вирусы [23]. И наконец, на ЖГВ А(Н1N1) pdm 2009 этот тип иммунного ответа у волонтеров был намного выше, поскольку у них вирусспецифические Т- и В-клетки памяти к данному вирусу обнаруживались еще до вакцинации [1, 6]. По-видимому, эти клетки, сформированные в период предшествующих контактов организма с вирусами серотипа А(Н1N1), и послужили причиной сравнительно низкой заболеваемости населения гриппом А(Н1N1) pdm 2009.

Помимо гуморального иммунного ответа нами проведено исследование индукции у тех же волонтеров Т-клеточной иммунологической памяти на вакцинацию ЖГВ А(Н5N2) — индюк и А(Н7N3). Тестировали вирусспецифические Т-клетки фенотипов CD4⁺ и CD8⁺, относящихся к двум пулам: центральные (Tcm) и эффекторные (Tem). Оба типа клеток участвуют в формировании долговременной иммунологической памяти, но осуществляют это разными путями [18]. Ранее доказано два факта: первый — увеличение у людей уровня Tcm и Tem после заболевания гриппом А(Н1N1) pdm 2009, второй — наличие корреляции уровня этих клеток и снижение тяжести гриппозной инфекции, вызванной данным возбудителем [20]. Наши результаты показали, что ЖГВ А(Н5N2) — индюк и А(Н7N3) индуцирова-

ли достоверные конверсии этих клеток у большей части волонтеров (табл. 5).

Постоянный антигенный дрейф и неослабевающая угроза распространения новых пандемических вариантов вируса гриппа А привлекает особое внимание к проблеме формирования гетерологического постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа к разным штаммам и подтипам вируса гриппа А [5]. Основу данного процесса составляет способность тех или иных вирусов индуцировать продукцию перекрестнореагирующих антител, а также перекрестнореагирующих Т- и В-лимфоцитов. Накопление знаний по этому вопросу важно как с точки зрения понимания степени защищенности населения от новых антигенных вариантов возбудителя, так и с позиции обоснования использования в экстренных ситуациях уже имеющихся вакцин для защиты от новых вирусов.

У волонтеров, привитых ЖГВ А(Н5N2)-индюк, проведен анализ гуморального иммунного ответа к вирусу А(Н5N2)-утка (табл. 2). Этим мы попытались ответить на вопрос: отличает ли иммунная система человека птичьих вирусы одного серотипа, но выделенные в разное время от разных представителей? Кумулятивные данные о числе конверсий антител к обоим вирусам оказались близки по значению: к А(Н5N2) — индюк и А(Н5N2) — утка, соответственно, 76 и 66%. При этом в РТГА поствакцинальные конверсии сывороточных антител совпали в 100% случаев, а локальные IgА-антитела в ИФА — в 80%. Это свидетельствует, что у обоих штаммов имеется значительный набор общих иммунодоминантных эпитопов, связанных с индукцией у прививаемых лиц перекрестнореагирующих антител. Возможно, что данный феномен относится ко всем ЖГВ, приготовленным из антропонозных и зоонозных вирусов гриппа А одного серотипа. Так, по нашим неопубликованным данным, у лиц, привитых сезонной тривалентной ЖГВ, количество конверсий сывороточных антител в РТГА к свиному вирусу гриппа А/Ontario/RV1273/2005(Н3N2) существенно не отличалось от аналогичного показателя в отношении вакцинного человеческого вируса того же серотипа. Кроме того, у 60% обследованных добровольцев еще до вакцинации обнаруживались антитела к свиному вирусу в защитных титрах 1:40. В этих условиях, несмотря на то, что свиной вирус А(Н3N2) вызывал заболевания у людей [27], вряд ли он мог обладать какими-то эпидемическими, а тем более пандемическими потенциями.

Нами проверена способность испытуемых ЖГВ индуцировать конверсии перекрестнореагирующих антител к двум типам гетерологич-

ных вирусов: с одинаковым с вакцинным штаммом НА и с полным отличием в антигенной формуле по НА и NA (табл. 2, 3). У привитых ЖГВ А(Н7N3) кумулятивный показатель числа конверсий антител к потенциально пандемическому вирусу А(Н7N9) приближался к аналогичному показателю в отношении вакцинного штамма — соответственно, 86 и 69% (табл. 3). ЖГВ А(Н5N2) — индук активно индуцировала продукцию перекрестнореагирующих сывороточных антител к потенциально пандемическому вирусу А(Н5N1) (табл. 2). В этом случае кумулятивный показатель числа их конверсий к вакцинному и гетерологичному вирусу составил, соответственно, 76 и 59%. При различии антигенной формулы вакцинных и гетерологичных вирусов гриппа А по НА кумулятивные показатели числа конверсий перекрестнореагирующих антител оказались значительно ниже — 24 и 21%. При этом наблюдали конверсии только сывороточных (ИФА) и локальных IgA-антител, но не сывороточных (антигемагглютинирующих антител (РТГА), вируснейтрализующих (РМН) и сывороточных IgG-антител (ИФА). Это объясняется, с одной стороны, штаммоспецифическими свойствами РТГА и РМН, с другой — повышенной кроссреактивностью антител класса А. В целом данные о гетерологичном гуморальном и клеточном иммунном ответе на испытываемые вакцины свидетельствуют, что они вполне успешно могут индуцировать иммунитет к птичьим вирусам со сходным НА.

Ранее нами обнаружена способность ЖГВ А(Н5N2) — утка стимулировать у людей гетеросубтипический Т-клеточный ответ к циркулирующему среди людей вирусу гриппа А(Н1N1) [4, 9]. Аналогичные свойства выявлены и в отношении ЖГВ А(Н7N3) — таблица 6. Эта вакцина вызывала продукцию CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, специфичных к другому потенциально пандемическому вирусу — А(Н7N9). Частота гетерологичных иммунных ответов оказалась не намного ниже по сравнению с гомологичными (соответственно, 38 и 52%). Обнаруженные специфические к этому вирусу CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоциты можно отнести к пулу клеток иммунологической

памяти, поскольку они обнаружены на отдаленные сроки после иммунизации (через 28 дней).

И в заключение необходимо остановиться на ключевом вопросе: каким образом оценивать потенциальную протективность ЖГВ, приготовленных из птичьих вирусов гриппа А? В настоящее время нет возможности предсказать поствакцинальное состояние иммунитета людей к птичьим вирусам гриппа А с точки зрения его воздействия на реальную защиту от этих возбудителей. Традиционно о протективных свойствах сезонных и пандемических вакцин судят по их способности индуцировать продукцию антигемагглютинирующих антител в защитных титрах $\geq 1:40$. Однако по нашим и зарубежным данным, ЖГВ, включающие птичьи вирусы, вызывают продукцию этих антител в данных титрах только в единичных случаях. Поэтому такой подход оценки резервных ЖГВ не приемлем. Кроме того, ЖГВ защищали людей от гриппа А и в ситуациях, когда у привитых антигемагглютинирующие антитела не определялись [8]. Поскольку противогриппозная иммунизация основана на успешности индукции долговременно функционирующей В- и Т-клеточной иммунологической памяти, возникает вопрос, могут ли ЖГВ, приготовленные из птичьих вирусов гриппа А, стимулировать у людей такую память в условиях высокого по частоте, но слабого по интенсивности иммунного ответа к вакцинным штаммам. Недавние американские исследования показали полную состоятельность в этом плане резервной ЖГВ А(Н5N1), а именно: у людей, прививавшихся год назад этой вакциной, отмечено мощное бустирование системного гуморального иммунного ответа на инактивированную вакцину А(Н5N1) по сравнению с непраймированными лицами [24]. Нами установлено такое же бустирование этого типа иммунного ответа на инактивированную вакцину А(Н5N1) у добровольцев, предварительно (9 месяцев назад) иммунизированных ЖГВ А(Н5N2) — индук (материалы готовятся к печати). Кроме того, у этих лиц отмечена более интенсивная продукция CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти.

Список литературы / References

1. Донина С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Григорьева Е.П., Кузнецова С.А., Лосев И.В., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Локальный и гуморальный иммунный ответ у больных гриппом и у лиц, привитых против сезонных и пандемических вирусов гриппа А // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, № 3. С. 37-42. [Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Grigorieva E.P., Kuznetsova S.A., Losev I.V., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Local Antibody Immune Responses in Influenza Patients and Persons Vaccinated with Seasonal, Pre-pandemic, and Pandemic Live Attenuated Influenza Vaccines. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 3, pp. 37-42. (In Russ.)]

2. Найхин А.Н., Денисов Г.М., Исмагулов А.Т., Топурия Н.В., Платонов В.Г., Царицына И.М., Иванников Ю.Г. Формирование, длительность сохранения и защитная роль антигеммагглютининов к ранее циркулировавшим вирусам гриппа А // Вопросы вирусологии, 1980. № 4. С. 408-412. [Naykhin A.N., Denisov G.M., Ismagulov A.T., Topuriia N.V., Platonov V.G. Formation, persistence period and protective role of antihemagglutinins to earlier circulating influenza A viruses. *Voprosy virusologii = Problems of Virology* 1980, no. 4, pp. 408-412. (In Russ.)]
3. Найхин А.Н., Денисов Г.М., Иванников Ю.Г., Лисок Т.П., Олейникова Е.В., Царицына И.М. Итоги изучения коллективного иммунитета к вирусу гриппа А(Н1N1) в 1976-1980 гг. // Вопросы вирусологии, 1981. № 5. С. 553-557. [Naykhin A.N., Denisov G.M., Ivannikov Yu.G., Lisok T.P., Oleshnikova E.V. Results of a study of collective immunity to influenza A virus (H1N1) from 1976 to 1980. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1981, no. 5, pp. 553-557. (In Russ.)]
4. Найхин А.Н., Чиркова Т.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Дони́на С.А., Руденко Л.Г. Стимуляция гомо- и гетерологичной Т-клеточной иммунологической памяти у волонтеров, привитых живой реассортантной гриппозной вакциной типа А(Н5N2) // Вопросы вирусологии, 2012. Т. 57, № 1. С. 38-42. [Naykhin A.N., Chirkova T.V., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Donina S.A., Rudenko L.G. Stimulation of homo- and heterologic T-cell immunological memory in volunteers inoculated with live influenza A (H5N2) reassortant vaccine. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2012, Vol. 57, no. 1, pp. 38-42. (In Russ.)]
5. Найхин А.Н. Гетеросубтипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация // Вопросы вирусологии, 2012. Т. 57, № 3. С. 4-9. [Naykhin A.N. Heterosubtypic immunity to influenza A viruses: epidemiological data, involvement of different immunological factors, vaccination. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2012, Vol. 57, no. 3, pp. 4-9. (In Russ.)]
6. Найхин А.Н., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Суворова М.А., Руденко Л.Г. Гуморальный и клеточный иммунный ответ у людей к вирусу гриппа А/Калифорния/07/2009(Н1N1)pdm2009 // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, № 2. С. 38-42. [Naykhin A.N., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Doroshenko E.M., Grigorieva E.P., Suvorova M.A., Rudenko L.G. Humoral and Cell-mediated Immune Responses in Humans to the A/California/ 07/ 2009 (H1N1) Virus, A(H1N1) pdm2009. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 2, pp. 38-42. (In Russ.)]
7. Bartlett E.J., Hennessey M., Skiadopoulos M.N., Schmidt A.C., Collins P.L., Murphy B.R., Pickles R.J. Role of interferon in the replication of human parainfluenza virus type 1 wild type and mutant viruses in human ciliated airway epithelium. *J. Virol.*, 2008, Vol. 82, no. 16, pp. 8059-8070.
8. Belshe R.B., Gruber W.C., Mendelman P.M., Mehta H.B., Mahmood K., Reisinger K., Treanor J., Zangwill K., Hayden F.G., Bernstein D.I., Kotloff K., King J., Piedra P.A., Block S.L., Yan L., Wolff M. Correlates of immune protection induced by live attenuated cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine. *J. Infect. Dis.*, 2000, Vol. 181, no. 3, pp. 1133-1137.
9. Chirkova T.V., Naykhin A.N., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Donina S.A., Mironov A.N., Rudenko L.G. Memory T-cell immune response in healthy young adults vaccinated with live attenuated influenza A(H5N2) vaccine. *Clinical and vaccine Immunol.*, 2011, Vol. 18, no. 10, pp. 1710-1718.
10. Karron R.A., Callahan K., Luke C., Thumar B., McAuliffe J., Schappell E., Joseph T., Coelingh K., Jin H., Kemble G., Murphy B.R., Subbarao K. A live attenuated H9N2 influenza vaccine is well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 199, no. 5, pp. 711-716.
11. Karron R.A., Talaat K., Luke C., Callahan K., Thumar B., Dilorenzo S., McAuliffe J., Schappell E., Suguitan A., Mills K., Chen G., Lamirande E., Coelingh K., Jin H., Murphy B.R., Kemble G., Subbarao K. Evaluation of two live attenuated cold-adapted H5N1 influenza vaccines in healthy adults. *Vaccine*. 2009, Vol. 27, no. 36, pp. 4953-4960.
12. Meijer A., Bosman A., van de Kamp E.E., Wilbrink B., van Beest Holle Man R., Koopmans M. Measurement of antibodies to avian influenza virus A(H7N7) in human by hemagglutination inhibition test. *Virol. Methods*, 2006, Vol. 132, pp. 113-120.
13. Murphy B.K., Coelingh K. Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines. *Viral. Immunol.*, 2002, Vol. 15, pp. 295-323.
14. Myers K.P., Setterquist S.F., Capuano A.W., Cray G.C. Infection due to 3 avian influenza subtypes in United States veterinarian. *Clin. Infect. Dis.*, 2007, Vol. 45, pp. 4-9.

15. Nguyen-Van-Tam J.S., Nair P., Acheson P., Baker A., Barker M., Bracebridge S., Croft J., Ellis J., Gellertie R., Gent N., Ibbotson S., Joseph C., Mahgoub H., Monk P., Reghitt T.W., Sundkvist T., Sellwood C., Simpson J., Smith J., Watson J.M., Zambon M., Lightfoot N. Outbreak of low pathogenicity H7N3 avian influenza in UK, including associated case of human conjunctivitis. *Euro Surveill*, 2006, Vol. 11, F 0605042.
16. Petukhova G., Korenkov D., Chirkova T., Donina S., Rudenko L., Naykhin A. B- and T-cell memory elicited by seasonal live attenuated reassortant influenza vaccine: assessment of local antibody avidity and virus-specific memory T-cell using trogocytosis based method. *Influenza and other resp. viruses.*, 2012, Vol. 6, no. 2, pp. 1-8.
17. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J. Detection of antibody to avian influenza A(H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, Vol. 37, pp. 937-943.
18. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T-cell subsets: function, generation and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.
19. Shinya K., Ebina M., Yamada S., Kasai N., Kawaoka Y. Avian flu: Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 2006, Vol. 440 (7083), pp. 435-436.
20. Sridhar S., Begom Sh., Bermingham A., Hoschler K., Adumson W., Carman W., Bean T., Barelay W., Deek J.J., Lalvani A. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, pp. 1305-1313.
21. Talaat K.R., Karron R.A., Luke C.J., Thumar B., McMahon B.A., Chen G.L., Lamirande E.W., Jin H., Coelingh K.L., Kemble G., Subbarao K. An open label phase I trial of live attenuated H6N1 influenza virus vaccine in healthy adults. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, no. 17, pp. 3144-3148.
22. Talaat K.R., Karron R.A., Callahan K.A., Luke C.J., DiLorenzo S.C., Chen G.L., Lamirande E.W., Jin H., Coelingh K.L., Murphy B.R., Kemble G., Subbarao K. A live attenuated H7N3 influenza virus vaccine is well tolerated and immunogenic in a Phase I trial in healthy adults. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 28, pp. 3744-3753.
23. Talaat K.R., Karron R.A., Liang P.H., McMahon B.A., Luke C.J., Thumar B., Chen G.L., Min J.Y., Lamirande E.W., Jin H., Coelingh K.L., Kemble G.W., Subbarao K. An open-label Phase I trial of a live attenuated H2N2 influenza virus vaccine in healthy adults. *Influenza and other resp. viruses.*, 2013, Vol. 7, no. 1, pp. 66-73.
24. Talaat K.R., Luke C.J., Khurana S., Manischewitz J., King L.R., McMahon B.A., Karron R.A., Lewis K.D., Qin J., Follmann D.A., Golding H., Neuzil K.M., Subbarao K. A live attenuated influenza A(H5N1) vaccine induce long-term immunity in the absence of primary antibody response. *J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 209, pp. 1860-1869.
25. Treanor J.J., Cambell J.D., Zangwill K.M., Rowe T., Wolff M. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A(H5N1) vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 354, pp. 1343-1351.
26. Tweed S.A., Skowronski D.M., David S.T., Larder A., Petric M., Lees W., Li Y., Katz J., Krajden M., Tellier R., Halpert C., Hirst M., Astell C., Lawrence D., Mak A. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004, Vol. 10, pp. 2196-2199.
27. Update: influenza A(H3N2) transmission and guidelines – five states, 2011 Morb. Mort. Weekly Rep. January 6. 2012/60(51). pp. 1741-1744.
28. Who global action plan vaccine supple for influenza vaccine. 2006, Geneva, Belgium. WHO/IVB/06.13. WHO/ODS/EPR/GIP/2006.1.
29. (<http://www.who.int/csr/disease/avianinfluenza/country/cases.table2008.03.18/en/indexhtml>)

Авторы:

Найхин А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Донина С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Naykhin A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunology and Prophylactics of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, St. Petersburg, Russian Federation

Donina S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylactics of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, St. Petersburg, Russian Federation

Лосев И.В. — научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Петухова Г.Д. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Кореньков Д.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Стукова М.А. — ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной вирусологии и генной инженерии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ерофеева М.К. — заведующая лабораторией испытаний новых средств защиты от вирусных инфекций, ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Коншина О.С. — научный сотрудник, лаборатория испытаний новых средств защиты от вирусных инфекций, ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Смолоногина Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, отдел вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Дорошенко Е.М. — к.м.н., научный сотрудник, отдел вирусологии им. акад. РАМН А.А. Сморodinцева, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Григорьева Е.П. — к.м.н., старший научный сотрудник, отдел вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Руденко Л.Г. — д.м.н., профессор, руководитель отдела вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Losev I.V., Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylactics of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, St. Petersburg, Russian Federation

Petukhova G.D., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylactics of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, St. Petersburg, Russian Federation

Korenkov D.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylactics of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, St. Petersburg, Russian Federation

Stukova M.A., Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Erofeeva M.K., Head, Laboratory of Trials of Novel Remedies for Antiviral Protection, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Konshina O.S., Research Associate, Laboratory of Trials of Novel Remedies for Antiviral Protection, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Smolonogina T.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of General Virology, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, St. Petersburg, Russian Federation

Doroshenko E.M., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Vaccine Strains, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, St. Petersburg, Russian Federation

Grigorieva E.P., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of General Virology, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, St. Petersburg, Russian Federation

Rudenko L.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 24.10.2014
Отправлена на доработку 30.10.2014
Принята к печати 14.12.2014

Received 24.10.2014
Revision received 30.10.2014
Accepted 14.12.2014

ЭКСПРЕССИЯ мРНК ФЕРМЕНТА AID В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Минеев В.Н., Нёма М.А., Сорокина Л.Н.

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Цель исследования — оценка возможной роли энзима AID (AICDA — activation-induced (cytidine) deaminase) в патогенезе бронхиальной астмы (БА).

Материалы и методы. Обследовали 12 практически здоровых лиц и 42 больных аллергической бронхиальной астмой (АБА) и 27 — неаллергической БА (НАБА).

Экспрессию мРНК AID оценивали путем проведения RT-PCR.

Результаты. мРНК AID значимо больше экспрессирована при БА, чем у здоровых лиц, в то же время не наблюдается значимых различий в экспрессии между аллергическим и неаллергическим вариантами заболевания.

Корреляционный анализ уровней экспрессии мРНК AID, мРНК СН ϵ и уровня общего сывороточного IgE выявил значимую обратную связь только при неаллергическом варианте заболевания.

Уровни экспрессии мРНК AID в лимфоцитах периферической крови имеют прямую и значимую связь с клиническими показателями у больных БА, которые характеризуют тяжесть, фазу заболевания. Кроме этого, выявлены прямые корреляционные связи с содержанием эозинофилов в мокроте.

Выводы. Делается вывод о том, что нормальная регуляция переключения синтеза антител по принципу отрицательной обратной связи, характерная для здоровых лиц, нарушается при аллергической БА, но сохраняется при неаллергическом варианте заболевания.

Ключевые слова: мРНК AID, AICDA, бронхиальная астма, лимфоциты

EXPRESSION OF AID-SPECIFIC mRNA IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN BRONCHIAL ASTHMA

Mineev V.N., Nyoma M.A., Sorokina L.N.

St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to evaluate a possible role of AID (AICDA — activation-induced (cytidine) deaminase) in the bronchial asthma (BA) pathogenesis. Materials and methods. We have examined twelve healthy control persons, forty-two patients with allergic bronchial asthma (ABA) and twenty-seven patients with non-allergic bronchial asthma (NABA). The AID mRNA expression was evaluated by means of RT-PCR. Results: AID mRNA was more significantly expressed in BA, than in healthy controls. Meanwhile,

Адрес для переписки:

Минеев Валерий Николаевич
Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет имени акад. И.П. Павлова
198516, Россия, Санкт-Петербург, Петропавловская
Санкт-Петербургский пр., 56, кв. 15.
Тел.: 8 (812) 450-71-63.
E-mail: vnmineev@mail.ru

Address for correspondence:

Mineev Valeriy N.
St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
198156, Russian Federation, St. Petersburg, Petrodvorets,
St. Petersburg pr., 56, apt 15.
Phone: 7 (812) 450-71-63.
E-mail: vnmineev@mail.ru

Образец цитирования:

В.Н. Минеев, М.А. Нёма, Л.Н. Сорокина, «Экспрессия
мРНК фермента AID в лимфоцитах периферической крови
при бронхиальной астме» // Медицинская иммунология,
2015. Т. 17, № 1. С. 71–74.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-71-74
© Минеев В.Н. и соавт., 2015

For citation:

V.N. Mineev, M.A. Nyoma, L.N. Sorokina, “Expression of
AID-specific mRNA in peripheral blood lymphocytes in bronchial
asthma”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 71–74.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-71-74
DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-71-74>

no significant differences were revealed between ABA and NABA groups. Correlation analysis of AID mRNA expression levels in peripheral blood lymphocytes has shown that CH ϵ mRNA and total serum IgE revealed significant negative correlation, in the NABA group only. The levels of AID mRNA expression in peripheral blood lymphocytes exhibited positive and significant correlations with clinical characteristics, reflecting severity and stage of the disease, in BA patients. Moreover, a significant positive correlation was revealed with eosinophil contents in sputum. Conclusion. It was concluded that normal regulation of IgE class switching normally based on feedback regulation, was impaired in ABA but not affected in NABA.

Keywords: mRNA, activation-induced (cytidine) deaminase, bronchial asthma, lymphocytes

Работа поддержана грантом СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова для научных инновационных проектов (2012 г.).

Введение

Одним из ключевых элементов патогенеза бронхиальной астмы является иммуноглобулин Е (IgE). Продукция больших количеств антител этого класса обусловлена переключением В-лимфоцитов на их синтез (class switch recombination – CSR). Этот процесс инициируется ферментом AID (AICDA – activation-induced [cytidine] deaminase) – индуцируемой активацией цитидиновой деаминазой.

AID деаминирует цитозин ДНК в генах, кодирующих цепи иммуноглобулинов, превращая его в урацил, что приводит к инициации процесса переключения В-лимфоцитов с продукции IgM на синтез других классов антител, в частности – IgE. Считается, что кроме CSR, этот фермент участвует и в процессе реаранжировки генов вариабельных частей иммуноглобулинов – соматической гипермутации (somatic hypermutation – SHM) [4].

Исследования, касающиеся оценки экспрессии AID при БА, практически отсутствуют. Исключение составляет работа Р. Takhar et al. [5], которые показали экспрессию этого энзима в слизистой оболочке бронхов при atopическом и неатопическом вариантах БА, а также исследования [3, 6], где экспрессия AID была показана в слизистой оболочке носа при аллергическом рините.

Ранее мы уже анализировали факторы, контролирующие образование IgE: PAX-5 и STAT6 [1, 2]. Транскрипционный фактор PAX-5 регулирует не только экспрессию тяжелых цепей IgE, но и активирует транскрипцию AID. С учетом ключевой значимости AID в процессе образования IgE **целью нашей работы** стала оценка возможной роли AID в патогенезе бронхиальной астмы (БА).

Материалы и методы

Обследовано 12 практически здоровых лиц, 42 больных аллергической бронхиальной астмой (АБА) и 27 – неаллергической БА (НАБА).

Все обследованные больные БА находились в клинике госпитальной терапии имени ака-

демика М.В. Черноруцкого ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова. Проводили комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее общеклинические методы, цитологический и бактериологический анализы мокроты, а также аллергологическое исследование. Диагноз устанавливали и проводили лечение в соответствии с критериями и стандартами международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (GINA, 2012). Для исследования использовали лимфоциты периферической крови здоровых лиц и больных БА, выделенные на градиенте плотности Lymphoseparation Medium («ICN») с использованием стандартной методики выделения мононуклеаров с последующим удалением моноцитов с осаждением на пластике в условиях инкубации в среде IMDM при 37 °C в течение 40 мин.

RT-PCR. Экспрессию мРНК AID оценивали путем проведения RT-PCR (reverse transcription-PCR – обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (ПЦР)) с нуклеиновыми кислотами, выделенными из лимфоцитов периферической крови. ПЦР проводили в амплификаторе «iCycler» (BIO RAD) в следующем режиме: инициация при 95 °C в течение 4-х минут, 30 циклов денатурации при 95 °C в течение 30 с, отжига при 60 °C в течение 30 с и полимеризации при 70 °C в течение 30 с. Завершающую полимеризацию проводили при 72 °C в течение 7 минут. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле и окраске этидия бромидом. Результат электрофореза после фотографирования в ультрафиолетовом свете анализировали в программе Gel-Pro 3.1. Уровень экспрессии мРНК AID и тяжелых цепей IgE (эпсилон-цепей) оценивали относительно уровня β -актина.

Праймеры для AID, тяжелых цепей IgE (CH ϵ) и β -актина были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank). (AID 5': 5'-gat tgt gac ccc aaa cca tc -3' и AID 3': 5'-ccc caa cat tca agc aac tt -3'; β -актин 5': 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3' и β -актин 3': 5'-GAA GCA

TTT GCG GTG GAC GAT-3'; СНε 5': 5'- ggg tac acc cca ggg act at -3' и СНε 3': 5'- tct ggt gga gtg gtt cac ag -3').

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программы SPSS 13.0 с использованием методов и критериев непараметрической статистики при малом значении числа наблюдений: критериев Вилкоксона, Манна-Уитни, коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Рассмотрим, как распределена экспрессия мРНК AID в группах больных БА и практически здоровых лиц (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, мРНК AID значимо больше экспрессирована при БА, чем у здоровых лиц, в то же время не наблюдается значимых различий в экспрессии между аллергическим и неаллергическим вариантами заболевания.

Уровни экспрессии мРНК AID значимо коррелируют с относительным содержанием эозинофилов в мокроте (p Спирмена = 0,319; $n = 44$; $p = 0,035$), количеством нейтрофилов периферической крови (p Спирмена = 0,242; $n = 69$; $p = 0,035$) у больных БА.

Рассмотрим теперь, как коррелируют уровни экспрессии мРНК AID и тяжелых цепей имму-

ноглобулина Е с уровнем общего сывороточного IgE (табл. 2).

Положительная связь между уровнями экспрессии мРНК AID и уровнем мРНК тяжелых цепей IgE в контрольной группе сменяется значимой отрицательной корреляцией среди больных НАБА, а в группе больных АБА теряет значимость и также имеет отрицательную направленность. Это, по-видимому, указывает на то, что нормальная регуляция переключения синтеза антител, характерная для здоровых лиц, при БА нарушается: высокие уровни мРНК СНε за счет механизмов обратной связи, вероятно, угнетают транскрипцию мРНК AID. Данное предположение можно подтвердить тем, что у больных аллергической БА с высокими концентрациями общего IgE в сыворотке (более 200 МЕ/мл) уровни экспрессии мРНК AID значимо меньше, чем у лиц с уровнями IgE менее 200 МЕ/мл ($t = -0,293$; $p = 0,047$).

Для оценки вклада AID в реализацию потенциала В-клеток к синтезу IgE мы проанализировали индекс отношения уровней общего сывороточного IgE к экспрессии мРНК его тяжелых цепей в связи с экспрессией AID: в группе больных БА коэффициент корреляции Пирсона r составил $-0,285$ ($p = 0,017$; $n = 70$), у здоровых лиц значимой связи не наблюдалось.

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК AID В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ ($M \pm \sigma$) (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β -АКТИНУ)

Группа обследования	Значение	Значимость различий ¹
Контрольная группа (практически здоровые лица) $n = 12$ (1)	$0,77 \pm 0,29$	1-2: $p = 0,013^1$ 2-3: $p > 0,05$ 1-3: $p = 0,036$
Больные АБА $n = 42$ (2)	$1,07 \pm 0,52$	
Больные НАБА $n = 27$ (3)	$1,09 \pm 0,48$	

Примечание. ¹ – уровень значимости, определяющий достоверность различий (для сравнения средних использован t -критерий).

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК AID С УРОВНЯМИ СЫВОРОТОЧНОГО ОБЩЕГО IgE И мРНК СНε (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К мРНК β -АКТИНА) (КОЭФФИЦИЕНТ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА ρ)

Обследованные лица	IgE	мРНК СНε
Практически здоровые лица	$\rho = 0,482$; $\rho = 0,133$; $n = 11$	$\rho = 0,473$; $\rho = 0,142$; $n = 11$
АБА	$\rho = -0,214$; $\rho = 0,192$; $n = 39$	$\rho = -0,095$; $\rho = 0,572$; $n = 38$
НАБА	$\rho = 0,275$; $\rho = 0,183$; $n = 25$	$\rho = -0,423^*$; $\rho = 0,035$; $n = 25$

Примечание. Статистически значимые корреляции отмечены знаком *.

Кроме этого, выявлена прямая корреляционная связь с содержанием эозинофилов в мокроте (τ Кендала = 0,233; $p < 0,05$; $n = 44$). Также обнаружено, что уровни экспрессии мРНК AID повышены у больных БА, проходящих лечение системными глюкокортикоидами ($t = 2,353$; $p < 0,05$).

Как отмечено выше, нами не выявлено значимых различий в экспрессии между аллергическим и неаллергическим вариантами заболевания, что совпадает с результатами исследования других авторов [6], однако полностью согласиться с их мнением о патофизиологической идентичности этих вариантов заболевания нельзя.

Так, у больных БА имеет место повышение экспрессии мРНК AID в лимфоцитах периферической крови, что, по-видимому, способствует

продукции IgE и прогрессированию воспалительного процесса в бронхах. В то же время при неаллергическом варианте заболевания экспрессия мРНК AID, возможно, регулируется по принципу отрицательной обратной связи.

В заключение можно отметить, что, вероятно, анализ уровней экспрессии белка AID, полиморфизмов его гена позволит получить дополнительные сведения о роли этого фермента в патогенезе БА и взаимоотношений его экспрессии с уровнями его мРНК при различных вариантах заболевания. Важность этих исследований подчеркивается перспективой разработки таргетной терапии, включая топическую, направленную на механизм переключения В-клеток на синтез IgE (CSR) [6].

Список литературы / References

1. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Еремеева А.В. Взаимодействие транскрипционных факторов PAX-5 и STAT6 в патогенезе аллергической бронхиальной астмы // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 35-42. [Mineev V.N., Sorokina L.N., Nyoma M.A., Eremeeva A.V. Interaction of transcription factors PAX-5 and STAT6 in pathogenesis of allergic bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 35-42. (In Russ.)]
2. Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Иванов В.А., Липкин Г.И., Минеев В.Н. Роль транскрипционного фактора PAX-5 в иммунологических процессах // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 6. С. 569-580. [Mineev V.N., Sorokina L.N., Nyoma M.A., Ivanov V.A., Lipkin G.I. Role of PAX-5 transcription factor in immunological processes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011. Vol. 13, no 6, pp. 569-580. (In Russ.)]
3. Coker H.A., Durham S.R., Gould H.J. Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, pp. 5602-5610.
4. Laffleur B., Denis-Lagache N., Péron S., Sirac C., Moreau J., Cogné M. AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget*, 2014, no. 5, pp. 1118-1131.
5. Takhar P., Corrigan C.J., Smurthwaite L., O'Connor B.J., Durham S.R., Lee T.H., Gould H.J. Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 119, pp. 213-218.
6. Takhar P., Smurthwaite L., Coker H.A., Fear D.J., Banfield G.K., Carr V.A., Durham S.R., Gould H.J. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J. Immunol.*, 2005. Vol. 174, pp. 5024-5032.

Авторы:

Минеев В.Н. — д.м.н., профессор, кафедра госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Нёма М.А. — к.м.н., ассистент, кафедра госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Сорокина Л.Н. — д.м.н., профессор, кафедра госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Mineev V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Chair of Hospital Therapy, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Nyoma M.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, M. Chernorutsky Chair of Hospital Therapy, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Sorokina L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Chair of Hospital Therapy, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 04.11.2014

Отправлена на доработку 10.11.2014

Принята к печати 24.11.2014

Received 04.11.2014

Revision received 10.11.2014

Accepted 24.11.2014

АМИНОКИСЛОТНЫЙ БАЛАНС ПЛАЗМЫ КРОВИ И МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ КАК ФАКТОР, ОТРАЖАЮЩИЙ ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРОЦЕССА

**Скорняков С.Н., Сабадаш Е.В., Медвинский И.Д., Новиков Б.И.,
Павлов В.А.**

*ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» МЗ РФ, г. Екатеринбург,
Россия*

Резюме. Обследованы 90 больных туберкулезом легких, разделенных на 3 группы по интенсивности и форме заболевания: первая — 32 больных инфильтративным туберкулезом с поражением 2-х сегментов; вторая — 31 пациента с туберкулемой легкого, третья — 27 больных фиброзно-кавернозным туберкулезом с давностью заболевания не более двух лет после относительной стабилизации процесса. Четвертая — группа сравнения — 30 здоровых добровольцев. Проведенный анализ показал, что в целом при туберкулезе легких аминокислотный баланс моноцитов можно охарактеризовать как дефицитный по антиоксидантным ресурсам. В случае туберкулезного воспаления в большей степени критерием специфической резистентности организма являются не столько процессы окисления глутатиона, а способности накапливать необходимые концентрации таурина в иммунокомпетентных клетках. Показатели соотношения таурина в плазме и моноцитах обнаруживают различные значения в зависимости от клинической формы туберкулеза легких. Перераспределение аминокислот плазмы в моноциты и, наоборот, «вымывание» из клеток некоторых аминокислот можно рассматривать в качестве фактора, отражающего тяжесть течения инфекционного процесса.

Ключевые слова: аминокислоты, таурин, глутатион, моноциты, туберкулез легких

AMINO ACID BALANCE PLASMA AND MONOCYTES IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS AS A FACTOR, REFLECTS THE SEVERITY OF DEVELOPMENT OF TUBERCULOSIS

**Skorniakov S.N., Sabadash E.V., Medvinsky I.D., Novikov B.I.,
Pavlov V.A.**

Ural Research Institute of Phthysiopneumology, Russian Ministry of Health Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The study included 90 patients with pulmonary tuberculosis who were divided into 3 groups, according to intensity and clinical form of the disease. Group 1 included 32 patients with infiltrative tuberculosis

Адрес для переписки:

Новиков Борис Иванович

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт
фтизиопульмонологии» МЗ РФ

620039, Россия, Екатеринбург, ул 22-го Партсъезда, 50.

Тел.: 8 (343) 333-44-63.

Факс: 8 (343) 333-44-63.

E-mail: binovikov@mail.ru

Address for correspondence:

Novikov Boris I.

Ural Research Institute of Phthysiopneumology, Russian
Ministry of Health Care

620039, Russian Federation, Ekaterinburg, 22-go Partysyezda str., 50.

Phone: 7 (343) 333-44-63.

Fax: 7 (343) 333-44-63.

E-mail: binovikov@mail.ru

Образец цитирования:

С.Н. Скорняков, Е.В. Сабадаш, И.Д. Медвинский,
Б.И. Новиков, В.А. Павлов, «Аминокислотный баланс
плазмы крови и моноцитов у больных туберкулезом
как фактор, отражающий тяжесть течения
туберкулезного процесса» // Медицинская иммунология,
2015. Т. 17, № 1. С. 75–80.

doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-75-80

© Скорняков С.Н. и соавт., 2015

For citation:

S.N. Skorniakov, E.V. Sabadash, I.D. Medvinsky, B.I. Novikov,
V.A. Pavlov, "Amino acid balance plasma and monocytes in patients
with tuberculosis as a factor, reflects the severity of development
of tuberculosis", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 1,
pp. 75–80.

doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-75-80

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-75-80>

and two-segment pulmonary lesions; group 2, 31 patients with pulmonary tuberculoma, and group 3, 27 patients with fibrous/cavernous tuberculosis for less than two years after the process stabilization. Group 4 represented a control (comparison) group of 30 healthy volunteers. The analysis showed that amino acid balance of monocytes in pulmonary tuberculosis can be, in general, characterized as deficient for antioxidant resources. In case of tuberculous inflammation, the criteria of specific resistance comprise a necessary taurine pool to greater extent than glutathione oxidation in immunocompetent cells. The plasma/monocyte taurine ratios exhibit different values, depending on clinical form of pulmonary tuberculosis. Redistribution of plasma amino acids to the monocytes, or, *vice versa*, probable “washout” certain amino acids from the cells may be considered a factor that reflects severity of the infectious process.

Keywords: amino acids, taurine, glutathione, monocytes, pulmonary tuberculosis

Введение

В условиях современной эпидемической ситуации по туберкулезу, отличающейся необходимостью повышения эффективности лечения, механизмы повышения устойчивости организма к развитию данного заболевания остаются недостаточно изученными. Известно, что основными структурами, инициирующими иммунный ответ на микобактерии туберкулеза (МБТ), являются альвеолярные макрофаги и регионарные дендритные клетки, способные к миграции в местные лимфоузлы и презентации антигенов в них [1, 7, 17].

Продуктивный ответ на инфекцию возможен только со стороны системы фагоцитирующих мононуклеаров, тесно взаимодействующей с хелперной системой Т-лимфоцитов [1, 6]. Это взаимодействие начинается с поглощения макрофагами МБТ и презентации их антигенов на фоне незавершенного фагоцитоза, что характеризует декомпенсацию внутриклеточного разрушения МБТ неактивированными макрофагами. По мере увеличения антигенной нагрузки объемы презентации растут, что приводит к формированию популяции Т-хелперов, стимулирующих фагоцитоз в очаге, повышающих его эффективность. Под влиянием МБТ макрофаги в очаге специфического воспаления претерпевают изменения в трех направлениях: пенистый макрофаг, эпителиоидная клетка и гигантская многоядерная клетка Пирогова–Лангханса. [1]. Пенистые макрофаги возникают из мигрировавших в очаг и поглотивших МБТ моноцитов, которые, под действием миколовых и кетомиколовых кислот, теряют способность фагоцитировать микобактерии и поддерживать кислородный взрыв. В этих клетках поддерживается нормальный или повышенный синтез фактора некроза опухоли α (TNF α), имеются клеточные включения (пенистость), состоящие из миколовых кислот, а также дормантные («дремлющие») формы МБТ. Эпителиоидные клетки сохраняют некоторую способность к фагоцитозу, так же почти не экспрессируют маркеры апоптоза и активно синтезируют TNF α , гамма-интерферон, интерлейкин-10. Кластеры эпите-

лиоидных клеток сливаются, образуя гигантские многоядерные клетки Пирогова–Лангханса.

Гигантские многоядерные клетки несут в себе микобактерии, активно поддерживают кислородный взрыв (НАДФН — оксидазную активность), имеют большое количество молекул комплекса МНС — II, но не синтезируют TNF α . Все фагоцитирующие клетки в очаге туберкулезной инфекции осуществляют борьбу с МБТ при помощи механизмов образования внутриклеточных активных форм кислорода (макрофаги и нейтрофильные гранулоциты) и азота (только активированные макрофаги) [22, 24, 25].

Эти соединения, попадая во внеклеточную среду, приводят к процессам перекисного окисления липидов (ПОЛ), стимулируют приток нейтрофилов, увеличивают повреждения клеток макроорганизма [2, 4, 5, 8, 9, 22, 24, 25].

В совокупности механизмы формирования туберкулезной гранулемы направлены на снижение доли некомпетентного фагоцитоза и внеклеточной агрессии, увеличение количества Т-лимфоцитов хелперов (Tx1), активных форм азота в макрофагах, а также продукции провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками. У пациентов же с нарушением функций фагоцитов, недостаточностью CD4-позитивных лимфоцитов новая гранулема не формируется, а старые неинкапсулированные гранулемы претерпевают изменения инфильтративного характера с повышением роли нейтрофильных гранулоцитов и увеличением свободно радикальной нагрузки на ткани [5, 8]. В патогенезе образования патологического очага при туберкулезе немаловажную роль играют активные формы кислорода и азота, выделяемые клетками специфической и неспецифической резистентности. Эти соединения имеют значение и в формировании вторичных рубцовых изменений, сопровождающих разрешение туберкулезного процесса [1, 2]. Метаболические реакции, определяющие функциональную активность иммунокомпетентных клеток, играют существенную роль в формировании специфической резистентности организма. Так, с первых минут реакции бласттрансформации (РБТ) в лимфоцитах увеличива-

ется потребление аденозинтрифосфата (АТФ). Активация энергетического обмена в этот период проявляется не только в ускорении обмена АТФ, но и в увеличении синтеза пиридиннуклеотидов, в которых непосредственное участие принимает аспарагин и аспарагиновая кислота. В результате наблюдается значительное повышение внутриклеточного уровня НАД (в 6–11 раз) и НАДФ (в 10–21 раз). Активация синтеза пиридиновых нуклеотидов активированных лимфоцитов необходима для поддержания оксидоредуктазных реакций, для синтеза ДНК, репаративных реакций [1, 2, 3, 16]. Высокую значимость в поддержании функциональной активности клеток иммунной системы имеют глутатион и ферменты глутатионового метаболизма [14, 18, 23]. Глутатион непосредственно модулирует пролиферацию Т-лимфоцитов. Лимфоциты, обедненные глутатионом, не в полной мере не развивают РБТЛ на митогенные пектины. Экзогенный глутатион частично поддерживает уровень внутриклеточного глутатиона и полностью восстанавливает пролиферацию, а эндогенный играет ключевую роль в метаболических реакциях, связанных с синтезом ДНК. И, кроме того, опосредует эффекты экзогенных тиолов. Метаболическая роль глутатиона и ферментов глутатионового обмена связана также с антиоксидантными процессами. Предполагается, что синтез и восстановление глутатиона через глутатионредуктазу обеспечивают полноценные эффекторные функции естественных киллеров [12, 19].

Высокой информативностью для исследования метаболизма активированных лимфоцитов обладают окислительно-восстановительные ферменты. Обнаружена прямая зависимость между геногеографией наследственного дефицита Г6ФДГ и распространенностью туберкулеза легких [13, 18, 21], что происходит следующим образом: уменьшается активность оксидоредуктаз, определяющих интенсивность энергетических реакций в клетках и уровень ключевой реакции пентозофосфатного цикла и НАДФН-зависимых пластических процессов и реакций восстановления глутатиона [10, 11, 20].

Таким образом, функциональное состояние иммунокомпетентных клеток напрямую зависит от степени сохранности метаболических показателей. Изучение особенностей аминокислотного баланса моноцитов при различных клинических формах туберкулеза легких является **целью настоящего исследования**.

Материалы и методы

Группы пациентов. 1-я — 32 с инфильтративным туберкулезом с поражением не более двух сегментов. Эта клиническая форма возникает на фоне специфической гиперсенситизации

легочной ткани и значительного усиления экссудативной тканевой реакции в зоне воспаления. Клинико-морфологической особенностью инфильтративного туберкулеза считают распространенное поражение легкого с наклонностью к быстрому прогрессированию туберкулезного процесса. Длительность лечения 3–4 месяца.

2-я — 31 с туберкулемой легкого, получавших лечение в течение 3–4 месяцев. Туберкулема легких — клиническая форма, при которой в легочной ткани формируется казеозно-некротическое образование, отграниченное от прилежащей легочной ткани двухслойной капсулой, развивающееся на фоне гиперергической реакции клеточных элементов легочной ткани на микобактерии туберкулеза и повышенной активности фибропластических процессов в зоне туберкулезного воспаления.

3-я — 27 с фиброзно-кавернозным туберкулезом (ФКТ), давностью заболевания не более двух лет после относительной стабилизации процесса (через 3–4 месяца после начала лечения). Для ФКТ характерно наличие одной или нескольких каверн с хорошо сформированным фиброзным слоем в стенках, выраженными фиброзными и полиморфными очаговыми изменениями в ткани легкого, типично хроническое волнообразное, прогрессирующее течение. 4-я — сравнения — 30 здоровых добровольцев.

Все больные проходили при поступлении и в процессе лечения стандартное клиническое, лабораторное, лучевое исследование (Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 года № 109).

Исследование аминокислот в плазме и клеточной взвеси (в данном исследовании — моноцитов) осуществляли на газожидкостном аминокислотном анализаторе. Для удобства изложения материала, изменения количества аминокислот и их производных приведены в % относительно общего количества аминокислот. Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Microsoft Excel 2007 (Microsoft® Windows® XP Professional, USA) и программы «STATISTICA» v. 6.0 (StatSoft, USA).

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что аминокислотный баланс плазмы и моноцитов при туберкулезе легких отличается от здоровых (табл. 1). Развитие туберкулезного воспаления сопровождается изменением соотношения аминокислот включаемых в синтез соединений антиоксидантной защиты. Так, в контрольной группе выявлено значительное преобладание таурина в лейкоцитах по сравнению с другими серосодержащими аминокислотами — метионином и цистеином. Таурин — природная аминокислотная кислота (β-аминоэтансульфоновая

кислота, $H_2NCH_2CH_2SO_3H$), нормализуя метаболические процессы, обладает регенерирующим, репаративным, мембрано-протекторным действием, играет большую роль в липидном обмене, оптимизации энергетических и обменных процессов, сохранении электролитного состава цитоплазмы (за счет накопления ионов калия и кальция), выполняет функцию нейромедиатора. Следует отметить, что синтез таурина является следствием метаболической цепочки, включающей метионин и цистеин [26].

Только в случае здоровой группы мы видим закономерную динамику изменения концентрации этих аминокислот, что, вероятно, отражает состояние клеточной мембраны и достаточный детоксикационный ресурс здоровой клетки и не исключает наличие повреждения ферментных систем при развитии специфического воспалительного процесса (табл. 1).

В условиях же туберкулезного экссудативного воспаления (инфильтративный туберкулез) отмечено значительное, по сравнению со здоровыми, снижение количества серосодержащих аминокислот, в большей степени – таурина. При этом соотношение его концентраций в плазме и моноцитах также значительно изменяется, что, вероятно, отражает потребность в антиоксидантных ресурсах (в данной группе количество окисленного глутатиона $6,8 \pm 0,4$ ммоль/л по сравнению со здоровой группой, в которой этот показатель составил $11,89 \pm 4,5$ ммоль/л). При дальнейшем развитии туберкулезного процесса и формировании ФКТ, который характеризуется не только более длительным течением, постоянным бактериовыделением, но и выраженной реакцией соединительной ткани, соотношение таурина становится «обратным», т.е. количество его в моноцитах значительно меньше, чем в плазме. При этом концентра-

ция окисленного глутатиона составляет $8,8 \pm 0,4$ ммоль/л, превышая данный показатель при инфильтративном туберкулезе. При туберкуломах соотношение таурина в плазме и моноцитах характеризуется незначительным преобладанием последнего в клетках. При этом количество глутатиона составляет $15,1 \pm 0,7$ ммоль/л и является максимальным среди представленных групп. Подчеркнем, что туберкулома считается относительно благоприятным вариантом развития процесса, поскольку характеризуется ограничением процесса с формированием плотной капсулы, и в данном случае наибольшие концентрации окисленного глутатиона несомненно коррелируют с особенностями течения.

В синтезе глутатиона наряду с таурином принимает участие глутаминовая кислота и пролин. В отношении данных аминокислот динамика не представляется такой очевидной (табл. 1), как в случае таурина, что позволяет сделать вывод о том, что именно концентрация таурина является специфическим отличительным признаком экссудативной, пролиферативной и пролиферативно-некротической реакции при туберкулезном воспалении. В этом случае отношение концентрации количества таурина в плазме и моноцитах можно использовать в качестве прогностического признака развития специфического воспаления. Так, у здоровых этот коэффициент составил 0,15, при инфильтративном туберкулезе – 0,55, туберкулезе – 0,69, ФКТ-1,33. Таким образом, коэффициент более единицы отражают процессы, сопровождающие хронизацию туберкулезного воспаления с развитием ФКТ.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что показатели соотношения таурина в плазме и моноцитах обнаруживают различные

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АМИНОКИСЛОТНОГО БАЛАНСА ПЛАЗМЫ (%) И МОНОЦИТОВ (%) У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, ФКТ И ТУБЕРКУЛЕМАМИ ($M \pm m$)

Группы Показатели	Сравнения (здоровые)	Туберкулез						
		Инфильтративный		ФКТ		Туберкулома		
		Плазма	Моноциты	Плазма	Моноциты	Плазма	Моноциты	Моноциты
Таурин	$1,08^{**} \pm 0,02$	$6,99^{*} \pm 1,8$	$^{**}0,54 \pm 0,03$	$0,97^{*} \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,2$	$1,12^{*} \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,01$	$1,73^{*} \pm 0,01$
Цистеин	$3,96 \pm 0,1$	$3,12 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,38$	$2,8 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,1$
Метионин	$1,15 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,3$	$0,78 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,02$	$1,27 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,02$	$0,84 \pm 0,25$
Пролин	$4,31 \pm 0,2$	$5,38 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$	$4,46 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,01$
Глютамин. к-та	$4,32 \pm 1,6$	$7,32 \pm 1,2$	$5,9 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,7$	$4,3 \pm 0,5$	$6,43 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,4$	$4,38 \pm 0,2$

Примечание. * – $p < 0,05$ различия достоверны по концентрации таурина в моноцитах между группами сравнения, инфильтративным туберкулезом, ФКТ, туберкулемой;

** – $p < 0,05$ различия достоверны по концентрации таурина в плазме и моноцитах между группами сравнения и инфильтративным туберкулезом.

значения в зависимости от клинической формы туберкулеза легких. В случае туберкулезного воспаления в большей степени критерием специфической резистентности организма являются не столько процессы окисления глутатиона, а способность накапливать необходимые концентрации таурина в иммунокомпетентных клетках.

В целом при туберкулезе легких аминокислотный баланс моноцитов можно охарактеризовать как дефицитный по антиоксидантным ресурсам. Перераспределение аминокислот плазмы крови в моноциты и, наоборот, «вымывание» из клеток некоторых аминокислот можно рассматривать в качестве фактора, отражающего тяжесть течения инфекционного процесса.

Список литературы / References

1. Авербах М.М. Туберкулезная гранулема. Современный взгляд на иммуногенез и клеточный состав // Туберкулез и болезни легких, 2010. № 6. С. 3-9. [Averbach M.M. Tuberculous granulomas. The modern view on immunogenesis and cellular composition. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Disease*, 2010, no. 6, pp. 3-9. (In Russ.)]
2. Александрова А.Е. Место средств патогенетической направленности действия в терапии туберкулеза // Патогенетическая терапия легочного и внелегочного туберкулеза. Л., 1987. С. 11-18. [Alexandrova A.E. Place of the pathogenetic orientation of action in the treatment of tuberculosis. *Pathogenetic therapy of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis*. Leningrad, 1987, pp. 11-18.
3. Белокрылов Г.А., Молчанова И.М., Сорочинская Е.И., Хаитов Р.Б., Пинегин Б.В., Исламов Х.И. Аминокислоты как стимуляторы иммуногенеза // Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995. 219 с. [Belokrylov G.A., Molchanova I.M., Sorochinskaya E.I., Khaitov R.B., Pinegin B.V., Islamov H.I. Amino acids as stimulants immunogenesis. *Ecological immunology*. Moscow: VNIRO, 1995. 219 p.
4. Брудастов Ю.А., Журлов О.С., Грудинин Д.А. Активные метаболиты кислорода при фагоцитозе // Вестник ОГУ, 2008. № 12. С. 148-151. [Brudastov Y.A., Zhurlov O.S., Grudin D.A. Active oxygen metabolites during phagocytosis. *Vestnik OGU = Bulletin OSU*, 2008, no. 12, pp. 148-151. (In Russ.)]
5. Бубочкин Б.П., Ратников В.И., Потапов И.В. Характеристика нитроксидазного профиля у впервые заболевших очаговым и инфильтративным туберкулезом легких // Тез. докладов 4 съезда науч.-мед. ассоциации фтизиатров. М.: Йошкар-Ола, 1999. С. 15-19. [Bubochkin B.P., Ratnikov V.I., Potapov I.V. Feature nitroksidaznogo profile in newly diagnosed focal and infiltrative pulmonary tuberculosis // Proc. 4 Reports the Congress Scientific Medical Association of Phthisiologists]. Moscow: Yoshkar-Ola, 1999, pp. 15-19. (In Russ.)]
6. Волков М.С., Генкин А.М., Глотов Н.А. Глутаминовая кислота. Биохимические механизмы практического использования. Свердловск, 1975. 225 с. [Volkov M.S., Genkin A.B. Swallowing N.A. Glutamic acid. *Biochemical mechanisms of practical use*. Sverdlovsk, 1975. 225 p.
7. Гончаров А.Е. Функциональная характеристика моноцитарных дендритных клеток больных туберкулезом легких // Докл. НАН Беларуси, 2008. Т. 52, № 1. С. 92-96. [Goncharov A.E. Functional characterization of monocyte-derived dendritic cells of patients with pulmonary tuberculosis // *Report NASB*, 2008, Vol. 52, no. 1, pp. 92-96. (In Russ.)]
8. Игнатъева Г.А. Современные представления об иммунитете (контуры общей теории) // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2003. № 2. С. 2-7. [Ignatieff G.A. Modern concepts of immunity (contours of the general theory). *Patofiziologiya i eksperimental' naya terapiya = Pathophysiology and Experimental Therapy*, 2003, no. 2, pp. 2-7. (In Russ.)]
9. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов-на-Дону: Из-во Ростовского университета, 1990. 224 с. [Garkavi L.H., Kvakina E.B., Ukolov M.A. Adaptive response and resistance]. Rostov-on-Don: Publisher of Rostov University, 1990. 224 p.
10. Еремеев В.В., Майоров К.Б. Взаимодействие макрофаг-микобактерия, в процессе реакции микроорганизма на туберкулезную инфекцию // Проблемы туберкулеза, 2002. № 3. С. 54-56. [Eremeyev V.V., Mayorov K.B. Interaction macrophag-mycobacterium, during the reaction microorganism to TB infection. *Problemy tuberkuleza = Problems of Tuberculosis*, 2002, no. 3, pp. 54-56. (In Russ.)]
11. Западнюк В.И., Купраш Л.И., Заика Л.У. Аминокислоты в медицине. Киев: Здоров'я, 1982. С. 58-63. [Zapadnyuk V.I., Kuprash L.I., Zaika L.U. Amino acids in medicine]. Kiev: Health, 1982, pp. 58-63.
12. Криворученко Н.С. Содержание соединений серы в моче у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза, 1984. № 11. С. 64-66. [Krivoruchenko N.S. Content of sulfur compounds in the urine of patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza = Problems of Tuberculosis*, 1984, no. 11, pp. 64-66. (In Russ.)]
13. Кричевская А.А., Шугалей В.С., Цветненко Е.З. Аргиназа и полиамины мозга и печени в механизме защитного действия аргинина при гипероксии // Бюлл. экспер. биол. и мед., 1981. Т. 91, № 4. С. 445-447. [Krichevskaya A.A., Shugaley V.S., Tsvetnenko E.Z. Arginase and polyamines of the brain and liver in the mechanism of the protective action of arginine with hyperoxia. *Byullen' eksperimental' noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1981, no. 4, pp. 445-447. (In Russ.)]
14. Маянский А.Н. Туберкулез (микробиологические и иммунопатогенетические аспекты) // Иммунология, 2001. № 2. С. 53-63. [Mayansky A.N. Tuberculosis (microbiological and immunopathogenetic aspects). *Immunologiya = Immunology*, 2001, no. 2, pp. 53-63. (In Russ.)]

15. Павлов В.А., Медвинский И.Д., Чугаев Ю.П., Сабадаш Е.В. Защитно-адаптивные механизмы при туберкулезной инфекции // Фтизиатрия и пульмонология, 2011. № 1. С. 42-54. [Pavlov V.A., Medvinsky I.D., Chugai Y.P., Sabadash E.V. Protective and adaptive mechanisms in tuberculosis infection. *Ftiziatriya i pul'monologiya = Phthysiology and Pulmonology*, 2011, no. 1, pp. 42-54. (In Russ.)]
16. Сахно Л. В., Черных Е.Р. Антигенпрезентирующие клетки при туберкулезе легких //Туберкулез и болезни легких, 2012. № 1. С. 3-9. [Sahno L.V., Chernykh E.R. Antigen-presenting cells in pulmonary tuberculosis. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Disease*, 2012, no. 1, pp. 3-9. (In Russ.)]
17. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Кожевников В.С. Фенотипическая и функциональная характеристика моноцитов у больных туберкулезом легких // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 1. С. 49-56. [Sahno L.V., Tikhonova M.A., Kozhevnikov V.S. Phenotypic and functional characteristics of monocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 1. pp. 49-56. (In Russ.)]
18. Струков А.И., Соловьева И.П. Морфология туберкулеза в современных условиях. М.: Медицина, 1986. 232 с. [Strukov A.I., Solovyova I.P. Morphology of tuberculosis in modern conditions]. Moscow: Medicine, 1986. 232 p.
19. Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю. Пептидная саморегуляция (факты и гипотезы). СПб.: Наука, 2003. 210 с. [Shataeva L.K., Havinson V.H., Ryadnova I.Y. Peptide self-regulation (facts and hypotheses)]. St. Petersburg: Science, 2003. 210 p.
20. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
21. Amano F, Noda T. Improved detection of nitric oxide radical (NO[•]) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carry PTIO, and Griess reagent. *FEBS Let.*, 1995, Vol. 368, pp. 425-428.
22. Fenton M.J., Vermilion M.W. Immunopathology of tuberculosis role of macrophages and monocytes. *Infect. Immun.*, 1996, Vol. 4, pp. 683-690.
23. Galan A.I., Minoz M.E., Palomero J., Moreno C., Jimenez R. Role of S-adenosylme-thionine on the hepatobiliary homeostasis of glutathione during cyclosporine a treatment. *J. Physiol. Biochem.*, 2000, no. 56, pp. 189-200.
24. North R.J., Jung Y.J. Immunity to tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 2004, Vol. 22, pp. 599-623.
25. Pereira C.B., Palace M., Leyte O.H., Duarte A.J., Benard G. Monocyte cytokine secretion in patients with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected subjects and correlates with clinical manifestations. *Microbes and Infection*, 2004, pp. 25-33.
26. Saton H., Kang J. Modulation by taurine of human arterial stiffness and wave reflection. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2009, Vol. 643, pp. 47-55.

Авторы:

Скорняков С.Н. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Сабадаш Е.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Медвинский И.Д. — д.м.н., заместитель директора института по научно-исследовательской работе, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Новиков Б.И. — к.м.н., старший научный сотрудник, руководитель Центра внелегочного туберкулеза, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Павлов В.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Skorniakov S.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Ural Research Institute of Phthysiopneumology, Russian Ministry of Health Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Sabadash E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Ural Research Institute of Phthysiopneumology, Russian Ministry of Health Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Medvinsky I.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, Ural Research Institute of Phthysiopneumology, Russian Ministry of Health Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Novikov B.I., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Head of the Center of Extrapulmonary Tuberculosis, Ural Research Institute of Phthysiopneumology, Russian Ministry of Health Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Pavlov V.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Ural Research Institute of Phthysiopneumology, Russian Ministry of Health Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 26.08.2014

Отправлена на доработку 30.08.2014

Принята к печати 30.09.2014

Received 26.08.2014

Revision received 30.08.2014

Accepted 30.09.2014

МОДЕЛЬ «CVCACS» ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ КАРДИОВАСКУЛЯРНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ В ГОСПИТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА

Манюкова Э.Т., Шаленкова М.А., Михайлова З.Д.

ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38», г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. У 68 больных острым коронарным синдромом (ОКС) изучалась взаимосвязь уровня интерлейкина (IL)-6 и -10 в крови и слюне, высокочувствительного С-реактивного белка (hs-СРБ) и натрийуретического пептида (NTrгоBNP) в крови с развитием кардиоваскулярных осложнений (КВО) в госпитальном периоде заболевания. Установлено, что содержание IL-6 в крови, IL-6, IL-10 в слюне, hs-СРБ и NTrгоBNP в крови было выше у больных с развитием КВО. При этом более высокий уровень IL-6 в слюне, чем в крови, явился предиктором развития КВО. Для прогнозирования развития КВО в госпитальном периоде ОКС была создана модель «CVCACS» с использованием значения возраста, уровня IL-10 в слюне, IL-6 и hs-СРБ в крови. При этом значение переменной модели «CVCACS» $> -0,657$ связано с развитием КВО в госпитальном периоде ОКС, а $\leq -0,657$ с благоприятным течением госпитального периода ОКС.

Ключевые слова: интерлейкин-6, интерлейкин-10, высокочувствительный С-реактивный белок, кардиоваскулярные осложнения, острый коронарный синдром

“CVCACS” MODEL FOR PREDICTION OF CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS IN HOSPITALIZED PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

Manyukova E.T., Shalenkova M.A., Mikhailova Z.D.

Municipal Clinical Hospital N 38, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Sixty-eight patients with acute coronary syndrome (ACS) were studied for correlations between the levels of interleukin IL-6 and IL-10 in blood and saliva, highly sensitive C-reactive protein (hs-CRP) and brain natriuretic peptide (NtproBNP) in the blood serum with the development of cardiovascular complications (CVC) during hospital period of the disease. It has been revealed that the patients with CVC had higher concentration of IL-6 in blood, IL-6, IL-10 in saliva, hs-CRP and NtproBNP in blood samples. Meanwhile, excess of IL-6 levels in saliva over those in blood was a significant predictor of CVC development. In order to facilitate the prediction values of CVC during ACS hospital period we have proposed a “CVCACS” model

Адрес для переписки:

Михайлова Зинаида Дмитриевна
ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38»
603000, Россия, г. Нижний Новгород,
ул. Чернышевского, 22.
Тел.: 8 (8312) 430-34-42, 434-20-45.
Факс: 8 (8312) 433-35-44.
E-mail: zinaida.mihailowa@yandex.ru

Address for correspondence:

Mikhailova Zinaida D.
Municipal Clinical Hospital N 38
603000, Russian Federation, N. Novgorod,
Chernyshevsky str., 22.
Phone: 7 (8312) 430-34-42, 434-20-45.
Fax: 7 (8312) 433-35-44.
E-mail: zinaida.mihailowa@yandex.ru

Образец цитирования:

Э.Т. Манюкова, М.А. Шаленкова, З.Д. Михайлова, «Модель “CVCACS” для прогнозирования развития кардиоваскулярных осложнений в госпитальном периоде острого коронарного синдрома» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 81-86.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-81-86
© Манюкова Э.Т. и соавт., 2015

For citation:

E.T. Manyukova, M.A. Shalenkova, Z.D. Mikhailova, “CVCACS model for prediction of cardiovascular complications in hospitalized patients with acute coronary syndrome”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 81-86.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-81-86
DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-81-86

that employed the parameters of patient's age, IL-10 level in the saliva, IL-6, and hs-CRP amounts in blood. It should be mentioned that the variable value of $> -0,657$ obtained with "CVCACS" model was predictive for development of CVC during ACS hospital period, while $\leq -0,657$ was associated with favorable course of ACS hospital period.

Keywords: interleukin-6, interleukin-10, highly sensitive C-reactive protein, cardiovascular complications, acute coronary syndrome

Введение

Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний в РФ неуклонно растет, и именно эти заболевания остаются ведущей причиной смерти населения страны [3, 8]. В РФ из всех смертей от любых причин 28% приходится на ишемическую болезнь сердца (ИБС), прежде всего на острый коронарный синдром (ОКС) [6]. В последние годы произошла переоценка ключевых положений патогенеза атеросклероза и ИБС с позиций развития иммунного воспаления в сосудистой стенке [4, 5, 12]. Прогностическая значимость таких показателей, как С-реактивный белок (СРБ), натрийуретический пептид (NTproBNP), цитокины, недостаточно изучена, а результаты проведенных исследований носят противоречивый характер. В то же время, если изучение содержания и предикторной способности интерлейкинов (IL)-6, -10 в крови при ОКС проводилось ранее [2, 10, 13], то в слюне такие исследования не выполнялись. В настоящее время для стратификации риска развития неблагоприятных исходов при ОКС применяются такие шкалы риска, как GRACE, TIMI, РЕКОРД и др. Однако, они не учитывают патогенетический аспект развития атеротромбоза и их прогностическая способность не ориентирована на развитие кардиоваскулярных осложнений (КВО). При этом моделей для прогнозирования риска развития КВО у больных в госпитальном периоде ОКС, включающих в себя уровни IL-6, IL-10 в крови и слюне, в доступной литературе не было найдено.

Цель работы: создание модели оценки риска развития КВО в госпитальном периоде ОКС с использованием маркеров воспаления.

Материалы и методы

Изучены данные обследования 68 больных ОКС (52 мужчины; 16 женщин), полученные в 1-3 сутки заболевания до развития КВО. Все больные ОКС, средний возраст 59,5 (50; 65) лет, госпитализированы экстренно в инвазивный и неинвазивный стационары. Критериями исключения были: возраст старше 75 лет; тяжелая дыхательная и/или почечная, и/или печеночная недостаточность; комы любой этиологии; сахарный диабет в стадии декомпенсации; онкологические и/или психические заболевания, острые

инфекционные заболевания, отказ подписать добровольное согласие на участие в исследовании.

В 1-3 сутки госпитализации натошак у всех больных проводили забор крови из кубитальной вены и смешанной нестимулированной слюны. Отцентрифугированная венозная кровь и нативная слюна хранились при температуре -20°C . Затем, одномоментно, при температуре $+20^{\circ}\text{C}$ в биологическом материале определяли содержание: IL-6 и IL-10 в крови и слюне методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия); высокочувствительного СРБ (hs-СРБ) в крови иммунотурбидиметрическим методом с использованием реагентов CRPLatex фирмы Beckmancoulter (Германия) и NTproBNP в крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия).

Обследование и лечение больных ОКС проводилось в соответствии с рекомендациями ВНОК [7].

В соответствии с общепринятыми рекомендациями (ESC, 2012) [9] для оценки риска развития летального исхода (ЛИ) в госпитальном периоде заболевания у всех больных ОКС использовали шкалу риска GRACE, включающую в себя оценку клинических признаков [возраст, частоту сердечных сокращений (ЧСС), систолическое артериальное давление (АД), уровень креатинина сыворотки, класс сердечной недостаточности (по классификации Killip), остановку сердца (на момент поступления пациента), девиацию сегмента ST, наличие диагностически значимого повышения кардиоспецифических маркеров] с подсчетом баллов, сумма которых соответствует различной степени риска развития ЛИ в госпитальном периоде ОКС: от 1 до 108 — низкий риск, от 109 до 140 — умеренный риск, от 141 до 372 — высокий риск [11].

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ SPSS 17.0, MedCalc 9.3.7.0. Рассчитывали средние значения (M_e — медиана) в виде $M_e (Q_{25}; Q_{75})$, где Q_{25} и Q_{75} — нижний и верхний квартили; относительные показатели (P , в %) в виде P (нижний уровень; верхний уровень 95% доверительного интервала на основе метода Клоппера—Пирсона). Для сравнения непрерывных величин при

ненормальном распределении показателя использовали непараметрический критерий Манна–Уитни (U-критерий). Сравнение дискретных величин проводили с использованием критерия χ^2 с поправкой на непрерывность по Йетсу. Если число случаев в одной из сравниваемых групп было менее 5, использовали двусторонний критерий Фишера (F-критерий). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для выявления группы факторов, связанных с неблагоприятными событиями, использовали метод бинарной логистической регрессии. С целью выявления прогностической значимости значения созданной прогностической модели проводилось построение характеристической кривой (ROC-curve, receiver-operator characteristic curve) [1].

Результаты и обсуждение

У 26 (38%) из 68 больных ОКС, в среднем на $7,6 \pm 4,2$ сутки, течение госпитального периода было осложнено развитием КВО: пароксизм фибрилляции предсердий – в 7, пароксизм наджелудочковой тахикардии – в 19, желудочковая экстрасистолия (высоких классов по Lown) – в 19, синдром слабости синусового узла – в 7, острая аневризма левого желудочка – в 15, ранняя постинфарктная стенокардия – в 42, синдром Дресслера – в 3,8, острое нарушение мозгового кровообращения – в 3,8, полная блокада

левой ножки пучка Гиса – в 3,8% случаев. При этом у 5 больных (19%) развилось 2 и более КВО. Группы больных с и без развития КВО были сопоставимы по возрасту, полу, данным анамнеза и другим характеристикам (табл. 1).

В первые сутки госпитализации у каждого больного ОКС проводился расчет степени риска развития ЛИ в госпитальном периоде заболевания по модифицированной шкале GRACE и, далее в динамике госпитального периода, оценивалась частота развития КВО (табл. 2).

Высокий риск развития ЛИ по шкале GRACE выявлен у 8,8% больных ОКС, при этом у ½ таких больных в госпитальном периоде развились КВО, однако ЛИ не было. У ½ больных ОКС риск развития ЛИ по шкале GRACE был средним, из них у 1 больного в госпитальном периоде заболевания произошло развитие ОНМК с ЛИ, а развитие КВО – у половины из этих пациентов. Реже, чем средний риск, установлен низкий риск ЛИ по шкале GRACE (39,7%), из них у ¼ больных развились КВО.

Проанализировано содержание IL-6, IL-10, hs-СРБ и NTproBNP в крови и IL-6, IL-10 в слюне у больных ОКС с и без развития КВО (табл. 3).

У больных с развитием КВО в крови установлено более высокое содержание IL-6, hs-СРБ и NTproBNP, по сравнению с таковыми при неосложненном течении ($p > 0,05$). Уровень IL-10 в крови был сопоставим у больных с и без раз-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ОКС С И БЕЗ РАЗВИТИЯ КВО

Показатель	Больные ОКС (n = 68)				p
	с развитием КВО (n = 26)		без развития КВО (n = 42)		
	Абс. числа	% (95% ДИ)	Абс. числа	% (95% ДИ)	
Возраст, Ме (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	64 (52;66)		57 (50;65)		0,119
Мужской пол	20	76,92 (56,4; 91)	32	76,19 (60,5; 87,9)	0,822
ИБС в анамнезе	19	73,08 (52,2; 88,4)	25	59,52 (43,3; 74,4)	0,381
Инфаркт миокарда в анамнезе	4	15,38 (4,4; 34,9)	10	23,81 (12,1; 39,5)	0,541
ЧКВ ¹ в анамнезе	2	7,69 (0,9; 25,1)	4	9,52 (2,7; 22,6)	1,0
Сахарный диабет 2 типа	4	15,38 (4,4; 34,9)	2	4,76 (0,6; 16,2)	0,192
Артериальная гипертензия	22	84,62 (65,1; 95,6)	34	80,95 (65,9; 91,4)	0,756
ОНМК ² в анамнезе	2	7,69 (0,9; 25,1)	1	2,38 (0,1; 12,6)	0,553
ТЛТ ³ при поступлении	6	60 (26,2; 87,8)	13	86,67 (59,5; 98,3)	0,175
Подъем сегмента ST на ЭКГ при поступлении	10	38,46 (20,2; 59,4)	15	35,71 (21,6; 52)	0,819

Примечание. ¹ – чрескожное коронарное вмешательство; ² – острое нарушение мозгового кровообращения; ³ – тромболитическая терапия; уровень статистической значимости при $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА РАЗВИТИЯ КВО В ГОСПИТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ У БОЛЬНЫХ ОКС С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ РИСКА РАЗВИТИЯ ЛЕТАЛЬНОГО ИСХОДА ПО МОДИФИЦИРОВАННОЙ ШКАЛЕ GRACE

Степень риска	Больные ОКС (n = 68)		Частота развития КВО (n = 26)	
	n	%	n	%
низкий	27	39,7	6	22
средний	35	51,5	17	48,6
высокий	6	8,8	3	50

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ IL-6, IL-10, hs-СРБ, NTproBNP В КРОВИ И IL-6, IL-10 В СЛЮНЕ У БОЛЬНЫХ ОКС С И БЕЗ РАЗВИТИЯ КВО, Me (Q₂₅; Q₇₅)

ОКС	IL-6, (пг/мл)		IL-10, (пг/мл)		hs-СРБ, (мг/л)	NTproBNP, (пг/мл)
	в крови	в слюне	в крови	в слюне		
с развитием КВО (n = 26)	1,75 (0,5; 5,42) ^b	7,11 (0,6; 23,75) ^{ab}	0,1 (0,1; 0,1) ^b	2,59 (1,27; 3,76) ^{ab}	7,1 (3,4; 17,3)	203 (30,4; 605,4)
без развития КВО (n = 42)	1,64 (0,35; 6,03)	0,76 (0,1; 4,06) ^a	0,1 (0,1; 0,59) ^b	1,46 (0,1; 2,35) ^{ab}	4 (1,95; 8,05)	147,32 (34,8; 356,5)

Примечание. ^a – значимость различий в группах с развитием и без развития КВО при $p < 0,05$; ^b – значимость различий в группе в разных биологических средах при $p < 0,05$.

вития КВО. В слюне более высокий уровень IL-6 и IL-10 был у больных с развитием КВО, чем без них ($p = 0,02$ и $p = 0,019$).

Уровень IL-6 в слюне у больных ОКС с развитием осложнений был в 4 раза выше, чем в крови ($p = 0,009$), напротив, при неосложненном течении содержание IL-6 было выше в крови, чем в слюне ($p > 0,05$). Содержание IL-10 при ОКС было значимо выше в слюне, чем в крови как при осложненном ($p < 0,001$), так и при неосложненном течении ($p < 0,001$). Таким образом, более высокое содержание IL-6 в слюне, чем в крови, в 1-3 сутки ОКС явилось предиктором развития КВО в госпитальном периоде заболевания.

В связи с отсутствием моделей стратификации риска развития КВО в госпитальном периоде у больных ОКС с использованием IL-6, IL-10 в крови и слюне, полученными нами данными по различному содержанию IL-6, IL-10 в крови и слюне у больных с и без развития КВО нами была создана модель для прогнозирования развития КВО в госпитальном периоде ОКС. Она включала в себя, наряду с хорошо известными и изученными показателями (возраст, пол, ЧСС, уровень систолического и диастолического АД, hs-СРБ, NTproBNP, наличие в анамнезе: инфаркта миокарда, интервенционного вмешательства, курения), уровень IL-6, IL-10 в крови и слюне.

В результате применения бинарной логистической регрессии при обратном отборе переменных методом ввода (Enter) была выделена группа независимых переменных (возраст, hs-СРБ,

IL-10 в слюне, IL-6 в крови), позволивших создать устойчивую модель с уровнем значимости $p = 0,047$ и с процентом конкордации 66,2, при этом отношение шансов каждого из предикторов было равно 1.

Для построения уравнения логистической регрессии за основу была взята формула [1]: $y = \text{constanta} + K_1 \cdot iK_1 + K_2 \cdot iK_2 + K_3 \cdot iK_3 + K_4 \cdot iK_4$, где K_1 – коэффициент возраста, iK_1 – значение возраста; K_2 – коэффициент IL-10 в слюне, iK_2 – значение IL-10 в слюне; K_3 – коэффициент IL-6 в крови, iK_3 – значение IL-6 в крови; K_4 – коэффициент hs-СРБ, iK_4 – значение hs-СРБ.

Подставив в уравнение имеющуюся константу и коэффициенты каждого из выявленных нами предикторов, было построено уравнение логистической регрессии: $y = -3,7828 + 0,0479 \cdot \text{значение возраста} + 0,03248 \cdot \text{значение IL-10 в слюне (пг/мл)} + (-0,06394) \cdot \text{значение IL-6 в крови (пг/мл)} + 0,05166 \cdot \text{значение hs-СРБ (мг/л)}$.

Полученному интегральному показателю (переменная логистической регрессии) – «у» было присвоено имя «Cardio Vascular Complication in Acute Coronary Syndrome» – «CVCACS». С целью выявления прогностической значимости созданной модели переменная «CVCACS» была введена в процедуру ROC-анализа. Установлено, что в отношении риска развития КВО качество созданной модели «CVCACS» является хорошим [AUC 0,716 (95% ДИ 0,594-0,819), $p = 0,001$]. Вместе с тем значение прогностической чувствительности для «CVCACS» составило 80% (95% ДИ 60-

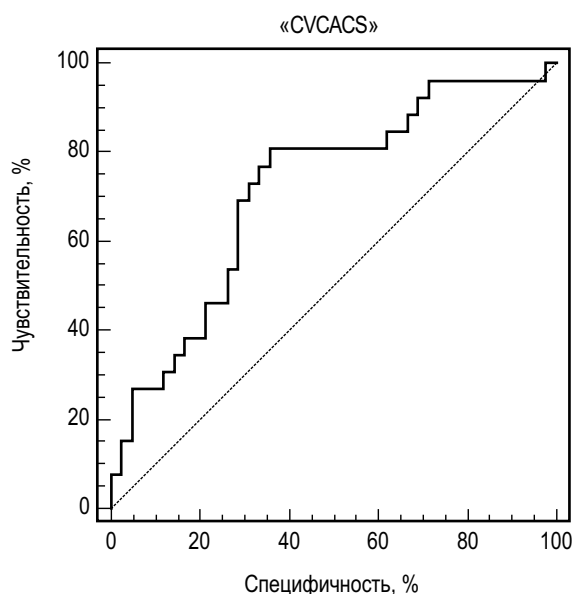


Рисунок 1. Величина ROC-кривой для переменной «CVCACS» в отношении риска развития КВО в госпитальном периоде ОКС

93%), специфичности — 64% (95% ДИ 48-78%), диагностической эффективности — 72%, отношение правдоподобия для положительных результатов — 2,26, отрицательных — 0,3. Установлено, что значение переменной «CVCACS» $> -0,657$ было связано с развитием КВО, а ее значение $\leq -0,657$ с благоприятным течением госпитального периода ОКС. Величина ROC-кривой для переменной «CVCACS» в отношении риска развития КВО в госпитальном периоде ОКС представлена на рисунке 1.

Таким образом, кроме общепринятой шкалы GRACE, определяющей риск развития ЛИ, у больных ОКС дополнительно может быть использована модель «CVCACS» для стратификации риска развития КВО в госпитальном периоде ОКС. При этом значение переменной «CVCACS» $> -0,657$ связано с высоким риском развития КВО.

Заключение

1. У больных ОКС с развитием КВО в госпитальном периоде выявлено более высокое содержание IL-6, hs-СРБ, NTproBNP в крови и IL-6, IL-10 в слюне, чем у больных без развития КВО.

2. Установлено, что предиктором развития КВО в госпитальном периоде ОКС являлся более высокий уровень IL-6 в слюне, чем в крови.

3. Модель «CVCACS», учитывающая возраст, уровень IL-10 в слюне, IL-6 и hs-СРБ в крови, может применяться для оценки риска развития КВО в госпитальном периоде у больных ОКС дополнительно к оценке риска развития ЛИ по шкале GRACE.

4. Установлено, что значение переменной «CVCACS» $> -0,657$ было связано с развитием КВО, а ее значение $\leq -0,657$ с благоприятным течением госпитального периода ОКС.

Список литературы / References

1. Ардашев В.Н., Калёнова И.Е., Ляпкина Н.Б., Потехин Н.П., Фурсов А.Н. Доказательная медицина: обзор современных математических методов анализа: Монография. М.: АВН, УНМИЦ УД Президента РФ, 2013. 224 с. [Ardashev V.N., Kalyonova I.E., Lyapkova N.B., Potehin N.P., Fursov A.N. Evidence-based medicine: review of modern mathematical methods of analysis: Monograph]. Moscow: AVN, UNMC UD of the President of RF, 2013. 224 p.
2. Данько А.А., Белков С.А., Репетий Н.Г., Лысов А.Ю., Минкова Т.А., Матвеев А.А., Палченкова М.В. Цитокиновый профиль при сочетанном течении острого инфаркта миокарда с внебольничной пневмонией // Военно-медицинский журнал, 2012. Т. 333, № 11. С. 59-61. [Danko A.A., Belkov S.A., Repetiy N.G., Lyisov A.Yu., Minkova T.A., Matveev A.A., Palchenkova M.V. Cytokine profile during combined course of acute myocardial infarction with community-acquired pneumonia. *Voenno-meditsinskiy zhurnal = Medical Corpspe Journal*, 2012, Vol. 333, no. 11, pp. 59-61. (In Russ.)]

3. Здравоохранение в России. 2013 г.: Стат. сб. / Росстат. М., 2013. 380 с. [Public health in Russia. 2013: Stat. sb./Rosstat]. Moscow, 2013. 380 p.
4. Карпов А.М., Рвачева А.В., Шогенова М.Х., Жетишева Р.А., Масенко В.П., Наумов В.Г. Современные представления об иммуновоспалительных механизмах атеросклероза // Атеросклероз и дислипидемии, 2014. Т. 14, № 1. С. 25-30. [Karpov A.M., Rvacheva A.V., Shogenova M.H., Zhetisheva R.A., Masenko V.P., Naumov V.G. Immunoinflammatory mechanisms of atherosclerosis: modern concepts. *Ateroskleroz i dislipidemii = Journal of Atherosclerosis and Dyslipidaemias*, 2014, Vol. 14, no. 1, pp. 25-30. (In Russ.)]
5. Комаров А.Л., Панченко Е.П. Роль воспаления в развитии атеротромбоза: “противовоспалительные” эффекты клопидогрела // Фарматека, 2007. Т. 143, № 8/9. С. 23-29. [Komarov A.L., Panchenko E.P. The role of inflammation in the course of atherothrombosis: “anti-inflammatory” effects of clopidogrel. *Farmateka = Pharmateca*, 2007, Vol. 143, no. 8/9, pp. 23-29. (In Russ.)]
6. Мохов А.А. Концепция развития системы здравоохранения в Российской Федерации до 2020 г. и ее правовое обеспечение // Российская юстиция, 2011. № 8. С. 48-50. [Mohov A.A. The conception of development of Public Health System in Russian federation till 2020 and its legal base. *Rossiyskaya yustitsiya = Russian Justice*, 2011, no. 8, pp. 48-50. (In Russ.)]
7. Оганов Р.Г. Национальные клинические рекомендации. Сборник. М.: Силиция-Полиграф, 2009. 528 с. [Oganov R.G. National clinical guideline. 4th ed.]. Moscow: Silitseya-Poligraf, 2011. 568 p.
8. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Демографические тенденции в Российской Федерации: вклад болезней системы кровообращения // Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний, 2013. Т. 1, № 1. С. 3-10. [Oganov R.G., Maslennikova G.Ya. Demographic trends in the Russian Federation: the impact of cardiovascular disease. *Mezhdunarodnyy zhurnal serdtsa i sosudistyykh zabolevaniy = International Journal of Heart and Vascular Diseases*, 2013, Vol. 1, no. 1, pp. 3-10. (In Russ.)]
9. Рекомендации по лечению острого коронарного синдрома без стойкого подъема сегмента ST/ Рабочая группа Европейского общества кардиологов // Рациональная Фармакотерапия в кардиологии, 2012. № 2 (приложение). С. 1-61. [Guidelines for the treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome/ Task group of European Society of Cardiology. *Ratsional' naya Farmakoterapiya v kardiologii = Rationale for Drug Therapy of Cardiology*, 2012, no. 2, pp. 1-61. (In Russ.)]
10. Шрейдер Е.В., Шахнович Р.М., Казначеева Е.И., Босых Е.Г., Ткачев Г.А., Руда М.Я. Прогностическое значение маркеров воспаления и NT-proBNP при различных вариантах лечения пациентов с острым коронарным синдромом // Кардиологический вестник, 2008. Т. III (XV), № 2. С. 44-53. [Shreider E.V., Shakhnovich R.M., Kaznacheyeva E.I., Bosykh E.G., Tkachev G.A., Ruda M.Ya. Prognostic value of inflammatory markers and NT-proBNP in different treatment options for patients with acute coronary syndrome. *Kardiologicheskii vestnik = Cardiological Bulletin*, 2008, Vol. III (XV), no. 2, pp. 7-14. (In Russ.)]
11. Granger C.B., Goldberg R.J., Dabbous O.H., Pieper K.S., Eagle K.A., Cannon C.P., Van De Werf F., Avezum A., Goodman S.G., Flather M.D., Fox K.A. Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. *Arch. Intern. Med.*, 2003, Vol. 163, pp. 2345-2353.
12. Libby P., Okamoto Y., Rocha V., Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J.*, 2010, Vol. 74, pp. 213-220.
13. Mälarstig A., Eriksson P., Hamsten A., Lindahl B., Wallentin L., Siegbahn A. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Heart*, 2008, no. 94, pp. 724-729.

Авторы:

Манюкова Э.Т. — врач, ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38», г. Нижний Новгород, Россия

Шаленкова М.А. — д.м.н., консультант, ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38», г. Нижний Новгород, Россия

Михайлова З.Д. — к.м.н., консультант, ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 38», г. Нижний Новгород, Россия

Authors:

Manyukova E.T., Physician, Municipal Clinical Hospital N 38, N. Novgorod, Russian Federation

Shalenskova M.A., PhD, MD (Medicine), Consulting Physician, Municipal Clinical Hospital N 38, N. Novgorod, Russian Federation

Mikhailova Z.D., PhD (Medicine), Consulting Physician, Municipal Clinical Hospital N 38, N. Novgorod, Russian Federation

Поступила 27.08.2014

Принята к печати 07.09.2014

Received 27.08.2014

Accepted 07.09.2014

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННОГО ОСТЕОАРТРИТА

Ширинский И.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт клиники иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Остеоартрит (ОА) является гетерогенным заболеванием, один из возможных субтипов ОА — диабет-ассоциированный ОА. В настоящее время клинические и иммунологические характеристики ОА, связанного с диабетом, не изучены. Для оценки фенотипа диабет-ассоциированного ОА, связи его клинических проявлений с уровнем цитокинов ПК, обследовано 78 больных с генерализованным ОА: 52 больных опытной группы (82,6% женщины), у которых клиническим проявлениям ОА не менее года предшествовал СД 2 и 26 больных ОА (84,6% женщины) без сахарного диабета. Установлено, что клинические проявления ОА в сочетании с СД отличаются от таковых у больных ОА и характеризуются большей массой тела, более выраженным уровнем боли в суставах, увеличением продолжительности утренней скованности, большим уровнем снижения функции опорных суставов и кисти, качества жизни и большей тяжестью болезни. Тяжелые проявления ОА более свойственны у больных с плохо контролируемым СД, вынужденных принимать препараты инсулина. В сыворотке крови больных ОА в сочетании с СД, в отличие от больных ОА выявлено повышение уровня провоспалительных (IL-6, IL-18) и снижение противовоспалительных цитокинов (IL-10, адипонектин), и этот дисбаланс свидетельствует о более выраженном системном воспалении у пациентов первой группы. Содержание IL-6 в сыворотке крови коррелирует с рядом функциональных показателей тяжести ОА. Заключается, что ОА в сочетании с СД является особым субтипом ОА, требующим дальнейшего изучения иммунопатогенеза и разработки новых подходов к лечению.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, остеоартрит, цитокины, коморбидность, воспаление

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DIABETES-ASSOCIATED OSTEOARTHRITIS

Shirinsky I.V., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky V.S.

Research Institute of Clinical immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Osteoarthritis (OA) has been shown to be a heterogeneous disease. Diabetes mellitus (DM)-associated represents a special OA subtype. Its clinical and immunological characteristics are poorly understood. To assess immune phenotype of the diabetes-associated OA and appropriate relationship between its clinical manifestations and cytokine concentrations in peripheral blood, we examined 78 patients with generalized OA including 52 patients in experimental group (82.6% females) who exhibited clinical manifestations of OA

Адрес для переписки:

Ширинский Иван Валерьевич
ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6.
Тел.: 8 (383) 228-25-47.
Факс: 8 (383) 228-25-47.
E-mail: ishirinsky@mail.ru

Address for correspondence:

Shirinsky Ivan V.
Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of
Medical Sciences, Siberian Branch
630047, Russian Federation, Novosibirsk, Zalesky str., 6.
Phone: 7 (383) 228-25-47.
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: ishirinsky@mail.ru

Образец цитирования:

И.В. Ширинский, Н.Ю. Калиновская, В.С. Ширинский,
«Клинико-иммунологическая характеристика диабет-
ассоциированного остеоартрита» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 87-92.

doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-87-92

© Ширинский И.В. и соавт., 2015

For citation:

I.V. Shirinsky, N.Yu. Kalinovskaya, V.S. Shirinsky, "Blood levels
of interleukin-6 and interleukin-10 in serum and biomarkers
of acute kidney injury in acute coronary syndrome", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17,
no. 1, pp. 87-92.

doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-87-92

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-87-92>

preceded by DM type II for, at least, 1 year, and 26 OA diabetes-free patients (84.6% females). We found that clinical manifestations of DM-associated OA were associated with increased body weight, more pronounced level of joint pains, longer duration of morning stiffness, decreased functionality of hands and large joints, impaired quality of life and more severe clinical pattern of the illness. Pronounced clinical manifestations in OA patients were more typical to the patients who required insulin therapy. The patients with DM type II-associated OA had elevated levels of proinflammatory (IL-6, IL-18) and reduced serum concentrations of anti-inflammatory cytokines (IL-10, adiponectin), thus suggesting more pronounced systemic inflammation in patients of the first group. Concentrations of circulating IL-6 correlated with several functional indexes of OA severity. In conclusion, the DM-associated OA represents a special subtype of osteoarthritis, and deserves further studies of its immune pathogenesis and development of new treatment strategies.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, osteoarthritis, cytokines, comorbidity, inflammation

Введение

Остеоартрит (ОА) относится к числу наиболее часто встречающихся заболеваний суставов. Клинические проявления ОА выявляются у 10–20% населения [1, 6, 7], рентгенологические признаки обнаруживаются значительно чаще, а количество пациентов, имеющих клинические и структурные изменения, существенно увеличивается с возрастом [6].

Патогенез ОА связывают со взаимосвязанной комбинацией множества факторов (генетических, эпигенетических, биомеханических, метаболических и др.), которые в итоге приводят к развитию воспаления во всех структурах сустава, вовлечению в процесс клеток иммунной системы, жировой ткани, их медиаторов и формированию разнородных по фенотипу и этиопатогенезу клинических вариантов (субтипов) болезни [7, 10, 11]. Так показано, что сахарный диабет 2 типа (СД 2) встречается у больных ОА значительно чаще (30%), чем в общей популяции (13%) [24]. Есть основания считать, что частое сочетание СД и ОА обусловлено их патогенетическим сходством, что позволяет отнести эти заболевания к группе синтропных коморбидных болезней [5, 24], характеризующихся особыми, недостаточно описанными клиническими проявлениями (2), мало изученным иммунопатогенезом и требующих новых подходов к терапии.

Установлено, что повышенное содержание глюкозы в крови ассоциировано с развитием одно- и двухстороннего гонартроза [18, 19], и это позволило отнести СД к факторам риска ОА. Выявлена повышенная экспрессия на хондроцитах рецепторов к конечным продуктам гликирования [23], активация рецепторов приводит к повышению уровня провоспалительных медиаторов в хрящевой ткани. Показано, что СД характеризуется признаками вялотекущего системного воспаления [6], которое может способствовать ускоренной деградаци хряща.

Задачей исследования являлось изучение особенностей клинических проявлений диабет-ассоциированного ОА и их связь с содержанием

некоторых цитокинов, характеризующих выраженность системного воспаления, в сыворотке периферической крови.

Материалы и методы

Обследовано 78 больных с генерализованным ОА: 52 больных опытной группы (84,1% женщины), у которых клиническим проявлениям ОА не менее года предшествовал сахарный диабет второго типа (СД) и 26 больных ОА (84,1% женщины) без сахарного диабета. Тридцать два пациента СД (61,5%) принимали сахарснижающие препараты в таблетированной форме, 20 человек (38,5%) получали инсулинотерапию или сочетанное лечение. Для уменьшения выраженности боли больные нерегулярно получали простые анальгетики (ацетаминофен), нестероидные противовоспалительные средства в разных дозировках. Оценка функции суставов и забор крови проводились до приема пациентами лекарственных препаратов. Контроль за СД оценивали по уровню гликированного гемоглобина (HbA1c). Всем больным проводилась рентгенография по следующей оценке изменений по критериям Kellgren–Lawrence.

Оценка выраженности боли и других симптомов ОА, нарушения функции суставов, качества жизни проводилась по шкалам KOOS (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score) [25], WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) [9], FHOA (Functional Index of Hand OA) [15], визуально-аналоговой шкале (ВАШ) боли и SF-36 [28].

Для оценки системного воспаления определяли содержание IL-6, IL-10, IL-18 (Вектор-Бест, Россия), адипонектина (Abcam, UK) и СРБ (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия) в сыворотке крови с помощью стандартных наборов согласно инструкций фирм-производителей. Описательная статистика представлена медианой, 25% и 75% межквартильными интервалами. Для выявления различий между сравниваемыми подгруппами использовали критерии Ман-

на—Уитни. Корреляционные связи оценивались с помощью критерия Спирмена.

Результаты

Клинические и рентгенологические признаки гонартроза выявлены у 100% больных обеих групп, что соответствовало критериям отбора в исследовании, частота клинических и рентгенологических проявлений коксартроза и артроза кисти в обеих группах не отличались. Вторая и третья рентгенологическая стадия ОА установлена у 85 и 80% больных.

В таблице 1 представлена общая характеристика обследованных пациентов. Видно, что в обеих группах больных преобладали пациенты (в первой группе женщин — 82,6%, во второй — 84,6%) с избыточной массой тела, причем индекс массы тела статистически значимо был выше в подгруппе больных ОА в сочетании с СД. Возраст больных, продолжительность течения ОА не отличались в группах сравнения. Существенные отличия в сравниваемых группах больных были выявлены при оценке различных клинических показателей функции суставов и качества жизни (табл. 1).

Из таблицы 2 следует, что у больных ОА в сочетании с СД, в отличие от пациентов, не страдающих СД, были достоверно более выражены болевые ощущения, оцениваемые по ВАШ и KOOS, продолжительность утренней скованности и оценка общего состояния здоровья больных. Помимо этого, первая группа пациентов характеризовалась высокими показателями тяжести ОА по суммарному индексу WOMAC, снижению качества жизни по шкале KOOS и некоторым субшкалам SF-36.

При анализе тяжести ОА в подгруппе больных с неконтролируемым СД (уровень сывороточного Hb A1c > 8%) по сравнению с пациентами с контролируемым СД (уровень Hb A1c < 8%) обнаружено статистически значимое повышение суммарного индекса WOMAC ($p = 0,04$). При оценке показателей качества жизни по KOOS и ролевого эмоционального поведения по SF-36 установлено их снижение в группе больных

с плохо контролируемым СД ($p = 0,02$ и $p = 0,01$ соответственно). Кроме того, выявлено более выраженное ухудшение функции кисти по шкале FHOA у пациентов с более длительным (> 8 лет) течением СД (6,5 [3,2-11] и 3 [1-6], $p = 0,026$) и получающих инсулин (7 [4,75-14] и 3 [1-6,75]).

Итак, больные с ОА, клиническим и рентгенологическим проявлениям которого не менее года предшествовал СД, являются преимущественно женщинами пожилого возраста с избыточной массой тела. В отличие от пациентов ОА, не страдающих сахарным диабетом, они характеризуются более выраженным уровнем боли в суставах, большей продолжительностью утренней скованности, большим уровнем снижения функции опорных суставов и кисти, качества жизни и, как следствие всего перечисленного, большей тяжестью болезни. Причем тяжелые проявления ОА более свойственны больным с плохо контролируемым СД, вынужденным принимать препараты инсулина.

Имеются ли у этих больных лабораторные признаки воспаления? Если да, то является ли воспаление звеном патогенеза ОА, способствующим прогрессии болезни?

В таблице 3 представлены данные о содержании ряда провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и СРБ в сыворотке периферической крови обследованных больных.

Видно, что медиана уровня СРБ сыворотки крови в обеих группах больных превышает референтные значения, однако, статистически значимых различий между группами не установлено. У больных ОА в сочетании с СД, в отличие от больных ОА, выявлено статистически значимое увеличение содержания IL-6, IL-18 и снижение содержания IL-10, адипонектина. Выявленные изменения не были связаны с продолжительностью СД, его методами лечения и степенью компенсации болезни.

Установлена прямая корреляционная связь между уровнем сывороточного IL-6 и выраженностью боли ($r = 0,3$, $p = 0,028$), изменениями индекса функции кисти FHOA ($r = 0,31$, $p = 0,0212$) и достоверная обратная связь с некоторыми параметрами опросника качества жизни SF-36.

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ ОА

Показатели	Больные ОА в сочетании с СД (n = 52)	Больные ОА (n = 26)	P
Возраст (годы)	63 (58,25-69)	66 (54-70)	
Масса тела (кг)	92,5 (82,25-102,4)	75 (68,25-79,63)	$P < 0,0001$
Объем талии (см)	106,5 (100-116,8)	87 (77,25-94,75)	$P < 0,0001$
Индекс массы тела (кг/м ²)	33,55 (31,21-38,43)	28,15 (24,3-31,1)	$P < 0,0001$
Продолжительность заболевания СД (годы)	8 (5-12,75)	—	
Продолжительность заболевания ОА (годы)	4 (3-8)	6 (3-20,25)	$P > 0,05$

Примечание. В этой и последующих аналогичных таблицах в графах — медиана и межквартильные интервалы.

ТАБЛИЦА 2. КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОСТОЯНИЯ ОБСЛЕДОВАННЫХ БОЛЬНЫХ

Показатели	Больные ОА в сочетании с СД n = 52	Больные ОА n = 26	P
Болевой синдром по шкале ВАШ	59 (47,5-70)	48 (35,75-50,50)	0,0023
Общее самочувствие по шкале ВАШ	54(47,25-71,75)	47(29-50)	0,0021
Время утренней скованности (минуты)	60 (40-165)	30 (10-60)	0,0001
Оценка болезни врачом по шкале ВАШ	53,50 (42,75-60,75)	41 (33,50-50)	0,0001
KOOS симптомы	58,33 (50-71,53)	76,39 (68,06-86,11)	0,0001
KOOS уровень боли	32,14 (21,43-54,46)	48,21 (27,68-71,43)	0,0287
KOOS уровень качества жизни	31,25 (18,75-43,75)	43,75 (34,38-56,25)	0,0144
Суммарный индекс WOMAC	1338 (950,3-1546)	730,5 (618,3-1156)	0,0005
Качество жизни по SF-36: уровень физического благополучия	25 (15-40)	40 (25-60)	0,006
Общее состояние здоровья	32,5 (25-45)	45 (36,5-65)	0,02
Уровень психического здоровья	48 (32-56)	62 (48-69)	0,0003

Примечание. Для оценки WOMAC и KOOS использовались визуальные аналоговые 100 мм субшкалы. Суммарный индекс WOMAC является суммой субшкал боли, скованности и нарушения функции по WOMAC. Более высокие значения WOMAC указывают на более выраженную тяжесть ОА. Показатели KOOS были трансформированы в шкалу от 0 до 100, максимальные значения указывают на минимальную выраженность боли и симптомов, наименьшее нарушение качества жизни.

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ СРБ И ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОА

Биомаркеры	Больные ОА в сочетании с СД (n = 52)	Больные ОА (n = 26)	P
IL-6 (пг/мл)	1,931 (1,003-3,392)	0,7285 (0,24-1,8)	0,0006
IL-10 (пг/мл)	0 (0-2,905)	1,2 (0,57-3,2)	0,0264
IL-18 (пг/мл)	108,6 (74,81-149)	62,19 (49,86-102,8)	0,0012
Адипонектин (нг/мл)	2929 (2126-4914)	3596 (2398- 6143)	0,0282
СРБ (мг/л)	14,6 (10,35-21)	11,45 (3,75-13,65)	0,194

Примечательно, что выявленная закономерность характерна только для больных с диабет-ассоциированным ОА.

Таким образом, в сыворотке крови больных ОА в сочетании с СД, в отличие от больных ОА, выявлено повышение уровня провоспалительных (IL-6, IL-18) и снижение противовоспалительных цитокинов (IL-10, адипонектин), и этот дисбаланс свидетельствует о более выраженном системном воспалении у пациентов первой группы. Причем содержание сывороточного IL-6 коррелирует с рядом функциональных показателей тяжести ОА.

Обсуждение

В последнее десятилетие не утихают дискуссии по поводу факторов риска и прогрессии ОА и его различных клинических вариантов [1, 16, 22]. Сторонники теории «механического» стресса полагают, что причиной развития ОА являются врожденные или приобретенные дефекты конгруэнтности суставных поверхностей, приводящие к нарушению биомеханики, процессов ремоделирования хрящевой и костной ткани, вторичному развитию локального воспаления и развитию клинических проявлений болезни [16]. По мне-

нию других авторов [11, 22], формирование ОА инициируется многочисленными медиаторами системного воспаления, обусловленного участием клеток иммунной системы, жировой ткани, провоспалительный потенциал которых усиливается в результате изменений липидного и углеводного обмена, эффекторными свойствами конечных продуктов гликирования, инсулинорезистентностью и др. [10, 21, 22, 27]. Предполагается, что системное воспаление, увеличивает риск развития разнообразной коморбидной патологии при ОА: атеросклероз и его последствия, болезнь Альцгеймера и др. [3, 6, 14]. Основные положения этих теорий вряд ли могут быть полностью экстраполированы на пациентов ОА, клиническим проявлением которого предшествовал СД, вынужденных получать противодиабетическую терапию. Результаты работы свидетельствуют о том, что больные ОА с сопутствующим СД характеризуются фенотипом, отличным от фенотипа пациентов, не страдающих сахарным диабетом, и который сформировался в результате влияния многих факторов, в том числе диабета и методов его лечения. Уместно напомнить, что изменение признаков нозологической формы заболевания под влиянием различных внутренних (временная эволюция

болезни) или внешних причин (сопутствующие заболевания, ятрогенные вмешательства) известно давно и получило название «патоморфоз». Логично предположить, что некоторые звенья патогенеза СД могут быть причастны к развитию и прогрессии ОА.

В рамках одной статьи невозможно исчерпывающе обсудить роль гипергликемии, конечных продуктов гликирования белков, инсулинорезистентности, дислипидемии и ожирения, изменений в иммунной системе, сосудистых нарушений, характерных для СД второго типа в патогенезе сопутствующего ОА. Мы лишь попытаемся дать некоторые объяснения полученным результатам, привлекая недостающие сведения из данных литературы.

IL-18 относится к числу провоспалительных цитокинов с плейотропным действием [22], его содержание в сыворотке больных ОА в сочетании с СД выше, чем у больных ОА. Видимо, IL-18 может способствовать персистенции воспаления в суставе, поскольку показано, что IL-18 усиливает воспалительный процесс в хрящевой и синовиальной ткани у больных ОА путем увеличения продукции хондроцитами и синовиоцитами металлопротеиназ, TNF, образования ПГЕ 2 [17]. Высокий уровень IL-18 в сыворотке крови способствует снижению синтеза ключевого протеогликана хрящевой ткани агрекана [20].

Адипонектин — специфический цитокин клеток жировой ткани, относится к числу противовоспалительных медиаторов, ингибиторов TNF [4], его содержание в сыворотке крови у больных с ожирением и СД снижено [8]. Нами также установлено снижение уровня сывороточного адипонектина в группе больных СД и ОА, в от-

личие от пациентов ОА. Роль этого цитокина в разрушение хряща и кости при ОА неоднозначна. Показано, что адипонектин оказывает катаболический эффект в культуре хондроцитов больных ОА, путем взаимодействия со специфическими рецепторами хондроцитов и усилением продукции клетками металлопротеиназ и окиси азота [21]. В то же время у больных ОА в сравнении со здоровыми людьми зарегистрировано увеличение содержания адипонектина в сыворотке крови [12], которое не было ассоциировано со степенью разрушения хрящевой ткани.

Показано увеличение в сыворотке крови больных ОА содержания еще одного провоспалительного цитокина IL-6, сопряженное с тяжестью болезни [27]. Сходные данные получены в настоящей работе при обследовании больных ОА и сопутствующим СД, причем установлена прямая корреляционная зависимость между уровнем IL-6 и бременем ОА.

Краткий анализ полученных данных свидетельствует о сложности патогенеза диабет-ассоциированного ОА, который нельзя свести к простой сумме патогенеза ОА и СД. Каковы конкретные механизмы влияния СД на развитие и прогрессию ОА? Можно ли среди них выделить предрасполагающие и протективные факторы, каково их соотношение? Вялотекущее воспаление и участие клеток иммунной системы, характерные для этого субтипа болезни — это саногенетический или патогенетический процесс? Ответы на эти и многие другие вопросы помогут в поиске новых терапевтических мишеней, модуляция которых позволит повысить эффективность профилактики и лечения этой распространенной коморбидной патологии.

Список литературы / References

1. Балабанова Р.М. Остеоартроз или остеоартрит. Современные представления о болезни и ее лечении // Современная ревматология, 2013. № 3. С. 67-70. [Balabanova R.M. Osteoarthritis or Osteoarthritis. Modern ideas about the disease and its treatment. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology*, 2013, no. 3, pp. 67-70. (In Russ.)]
2. Головкина Е.С. Течение гонартроза и коксартроза на фоне сахарного диабета // Боль. Суставы. Позвоночник, 2012, Т. 4, № 8. С. 34-38. [Golovina E.S. The course of gonarthrosis and coxarthrosis diabetes mellitus. *Bol'. Sustavy. Pozvonochnik. = Pain. Joints. Spine*, 2012, Vol. 4, no. 8, pp. 34-38. (In Russ.)]
3. Денисов Л.Н., Насонова В.А. Ожирение и остеоартроз // Научно-практическая ревматология. 2010. № 3. С. 48-51. [Denosov L. N., Nasonova V.A. Obesity and osteoarthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Scientific Practical Rheumatology*, 2010, no. 3, pp. 48-51. (In Russ.)]
4. Косыгина А.В. Адипоцитокينات в научной и клинической практике // Ожирение и метаболизм, 2011. № 1. С. 32-39. [Kosygina A.V. Adipocytokines in research and clinical practice. *Ozhirenie i metabolism = Obesity and Metabolism*, 2011, no. 1, pp. 32-39. (In Russ.)]
5. Пузырев В.П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии человека // Медицинская генетика, 2008. № 9. С. 3-9. [Puzyrev V.P. Genetics view of comorbidity phenomenon in man. *Meditinskaya genetika = Medical Genetics*, 2008, no. 9, pp. 3-9. (In Russ.)]
6. Чичасова Н.В., Мендель О.И., Насонов Е.Л. Остеоартроз как общетерапевтическая проблема // Российский медицинский журнал, 2010. № 11. С. 729-733. [Chichasova N.V., Mendel. O.I., Nasonov E.L. Osteoarthritis is as general therapeutic problem. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2010, no. 11, pp. 729-733. (In Russ.)]
7. Шостак Н.А., Клименко А.А., Никоненко М.В. Остеоартроз: вопросы патогенеза и лечения // Клиницист, 2010. № 1. С. 47-53. [Shostak NA, AA Klimenko, MV Nikonenko osteoarthritis: questions of pathogenesis and treatment. *Klinitsist = Clinician*, 2010, no. 1, pp. 47-53. (In Russ.)]

8. Arita Y. Paradoxical decrease of an adipose – specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, no. 257, pp. 79-93.
9. Bellamy N., Buchanan W.W., Goldsmith C.H., Campbell J., Stitt L.W. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J. Rheumatol.*, 1988, no. 15, pp. 1833-1840.
10. Berenbaum F. Diabetes – induced osteoarthritis: from a new paradigm to a new phenotype. *Ann. Rheum. Diseases*, 2011, no. 8., pp. 1354-1356.
11. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and cartilage*, 2013, no. 1, pp. 16-22.
12. de Boer T.N., van Spil W. E., Huisman A. M., Polac A. A. Serum adipokines in osteoarthritis: comparison with controls and relationship with local parameters of synovial inflammation and cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012., no. 8, pp. 846-853.
13. Dai S.M., Shan Z. Z., Nishioka K., Yudoh K. Implication of interleukin 18 in production of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes in arthritis: direct effect on chondrocytes may not be pivotal. *Ann. Rheum. Diseases*, 2005, no. 5, pp. 735-742.
14. Van Dijk G.M., Venhof C., Schellevis F. Comorbidity limitation in activities and pain in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *BMS Musculoskeletal Disord*, 2008, no. 9, pp. 95-99.
15. Dreiser R.L., Macheu E., Guillou G.B. Validation of an algofunctional index for the Hand. *Rev. Rheum. Engl. Ed.*, 1995, no. 6, pp. 435-535.
16. Felson D.T. Osteoarthritis as a disease of mechanics. *Osteoarthritis and cartilage*, 2013, no. 1, pp.10-16.
17. Fu Z., Yang D., Wang F., Yuan L., Lin Z., Jiang J. Interleukin – 18 – induced inflammatory in synoviocytes and chondrocytes from osteoarthritic patients. *Int. J. Mol. Med*, 2012, no. 30 (4), pp. 805-810.
18. Gimmino M.A. Cutolo M. Plasma glucose concentration in symptomatic osteoarthritis: a clinical and epidemiological survey. *Clin. Exp. Rheumatol* , 1997, no. 8, pp. 251-257.
19. Hart D.J., Doyle D.V., Spector T.D. Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J. Rheumatol.*, 1995, 22 (6), pp. 1118-1123.
20. Inoue H., Hiraoka K., Hoshino T., Okamoto M., Iwanaga T. High levels of serum IL-18 promote cartilage loss through suppression of aggrecan synthesis. *Bone*, 2008, 2 (6), pp. 1102-1110.
21. Kang E.H., Lee Y.Y., Kim T.K., Chang C.B., Chung J.H., Shin K. Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, 12 (6), pp. 231-239.
22. Kappor M., Martel-Pelletier J., Lajenesse P., Pelletier J. P., Fachmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2011, no. 7 (1), pp. 33-42.
23. Loeser R.F., Yammani R.R., Carlson C.S., Chen H., Cole A., Im H.J. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2005, no. 52(8), pp. 2376-2385. *Epub* 2005/07/30.
24. Puenpatom R.A., Victor T.W. Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data . *Postgrad. Med.*, 2009, 121(6), pp. 9-20. *Epub* 2009/11/27
25. Roos E.M., Roos H.P., Lohmander L.S., Ekdahl C., Beynnon B.D. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) – development of a self-administered outcome measure. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, 1998, no. 28, pp. 88-96.
26. Stannus O., Jones G., Cicuttini F., Parameswaran V., Quinn S., Burgess J. Circulating levels of IL-6 and TNF-alpha are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis and cartilage*, 2010, 18 (11), pp.-1441-1447. *Epub* 2010/09/08.
27. Toncheva A., Remichova M., Ikonomova K. Inflammatory response in patients with active osteoarthritis. *Rheum. Int*, 2009, no. 29, pp. 1197-1203.
28. Ware J.E. The MOS 36 – item Short – Form Health Survey. *Medical Care*, 1992, no. 8, pp.473-483.

Авторы:

Ширинский И.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, врач-ревматолог, лаборатория клинической иммунофармакологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Калиновская Н.Ю. — к.м.н., научный сотрудник, лаборатория клинической иммунофармакологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Ширинский В.С. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher Associate, Rheumatologist, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Clinical immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Kalinovskaya N.Yu., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Clinical immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Clinical immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 27.08.2014
Принята к печати 07.09.2014

Received 27.08.2014
Accepted 07.09.2014

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ К АСИАЛОГЛИКОПРОТЕИНЫМ РЕЦЕПТОРАМ В ДИАГНОСТИКЕ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ

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

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В исследовании 15 пациентов с аутоиммунными заболеваниями печени и 36 пациентов без аутоиммунной патологии установлена диагностическая информативность тестов определения антиядерных и антимитохондриальных аутоантител (АМА-М2), а также антител к асиалогликопротеиновому рецептору (anti-ASGPR). На основе ROC анализа показано, что диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность для АМА-М2 составили 73 и 100%, а для anti-ASGPR — только 60 и 77% соответственно. Следовательно, тест на anti-ASGPR при аутоиммунных заболеваниях печени не показал преимуществ перед уже существующими, и целесообразность его использования в клинической практике требует уточнения.

Ключевые слова: аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, аутоантитела

CLINICAL DIAGNOSTIC VALUE OF AUTOANTIBODIES IN THE DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE LIVER DISEASES

Bazarnyi V.V., Mikhailova E.Yu., Partylova E.A.

Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. We are studied the 15 patients with autoimmune liver diseases and 36 patients without autoimmune pathology found the diagnostic value of antinuclear and antimitochondrial autoantibodies (AMA-M2) tests, and antibodies to asialoglycoprotein receptor (anti-ASGPR). Based on the ROC analysis showed that the diagnostic sensitivity and diagnostic specificity of AMA-M2 was 73% and 100% and for anti-ASGPR — 60% and 77%, respectively. Therefore, the test for anti-ASGPR in autoimmune diseases of the liver showed no advantages over standart tests, and its using in clinical practice requires clarification.

Keywords: autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, autoantibodies

Адрес для переписки:

Базарный Владимир Викторович
ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский
университет» Минздрава РФ
620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3.
Тел.: 8 (912) 288-85-90.
E-mail: vlad-bazarny@yandex.ru

Address for correspondence:

Bazarnyi Vladimir V.
Ural State Medical University
620028, Russian Federation, Ekaterinburg, Repin str., 3.
Phone: 7 (912) 288-85-90.
E-mail: vlad-bazarny@yandex.ru

Образец цитирования:

В.В. Базарный, Е.Ю. Михайлова, Е.А. Партылова
«Клинико-диагностическое значение аутоантител
к асиалогликопротеиновым рецепторам в диагностике
аутоиммунных заболеваний печени» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 93–96.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-93-96
© Базарный В.В. и соавт., 2015

For citation:

V.V. Bazarnyi, E.Yu. Mikhailova, E.A. Partylova, “Clinical
diagnostic value of autoantibodies in the diagnosis of
autoimmune liver diseases”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 93–96.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-93-96
DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-93-96

Аутоиммунные заболевания печени (АИЗП) включают аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит. Среди принятых международным сообществом критериев их диагностики «золотым стандартом» является патоморфологическое исследование гепатобиоптата [1, 7, 11]. К другим методам относится детекция аутоантител, прежде всего — антинуклеарных (ANA), антимитохондриальных (AMA) и некоторых других [2, 4, 9, 10]. В последние годы в лабораторной практике появился тест на антитела к асиалогликопротеиновым рецепторам (anti-ASGPR), которые потенциально могут рассматриваться как органоспецифические, поскольку сами рецепторы являются лектинами, специфичными для мембран гепатоцитов. Аутоантитела данной специфичности были описаны достаточно давно, в частности — у пациентов с АИЗП [5, 13]. Однако, хотя некоторые авторы и считают тест перспективным в диагностике аутоиммунных гепатитов, и он коррелирует с уровнем печеночных трансаминаз, пока отношение к его клинико-диагностической информативности неоднозначно, а отечественный опыт использования данного показателя в диагностике АИЗП крайне ограничен [3, 8, 12]. Этим определена **цель работы** — оценить диагностическую значимость определения аутоантител к асиалогликопротеиновым рецепторам при аутоиммунном поражении печени.

Материалы и методы

В исследование были включены 51 человек. Основную группу составили 15 пациентов с АИЗП — аутоиммунным гепатитом и первичным билиарным циррозом (ПБЦ). Диагноз был установлен на основании стандартных клинико-лабораторных критериев и верифицирован морфологически (зав. отделением — доктор ме-

дицинских наук Бессонова Е.Н.). Группа сравнения состояла из 36 человек, у которых диагноз аутоиммунного синдрома был исключен. В нее вошли пациенты с алкогольным жировым стеатогепатитом, хроническим панкреатитом и другой соматической патологией. Всем обследованным выполняли тесты для определения антител (иммуноглобулинов G) к экстрагируемым ядерным антигенам (anti-ENA), AMA и anti-ASGPR методом твердофазного иммуноферментного анализа на полуавтоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal Lab» с использованием тест-систем «Orgentic ENA-combi», «Orgentic AMA-M2» и «anti-ASGPR» (Medipan).

Статистическая обработка результатов проведена на основе принципов вариационной статистики с использованием программы Biostat (версия 4.03). Достоверность различий между группами оценивали с помощью критерия Краскала—Уоллиса. Диагностическую информативность тестов определяли на основе ROC-анализа (программа AtteStat, версия 12.0.5).

Результаты и обсуждение

У пациентов обеих групп определяли органоспецифические (AMA-2 anti-ASGPR) и органонеспецифические аутоантитела (anti-ENA). В группе сравнения уровень изучаемых аутоантител в сыворотке крови не выходил за пределы референтных значений (табл. 1). У больных с АИЗП содержание AMA и ANA было повышено при сопоставлении с группой сравнения. Это соответствует существующим представлениям об иммунопатогенезе и лабораторной диагностике данной группы болезней. В нашем исследовании мы не установили повышения уровня anti-ASGPR при аутоиммунной патологии печени, как это было сделано другими ав-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ АУТОАНТИТЕЛ У ПАЦИЕНТОВ С АИЗП

Показатели	Референтные значения (по рекомендации производителя тест- систем)	Аутоиммунные заболевания печени	Группа сравнения
AMA, Е/мл	0-20	123,3±18,88 p = 0,03	12,78±7,567
Anti-ENA, индекс серопозитивности	< 1,0	1,534±0,5136 p = 0,02	0,21±0,41
anti-ASGPR, коэффициент связывания	< 0,9	0,1899±0,35 p = 0,32	0,27±0,043

ТАБЛИЦА 2. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ ТЕСТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

Показатели	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	AUC
anti-ASGPR	60%	77%	0,55
AMA	73%	100%	0,86
Anti-ENA	60%	100%	0,78

торами [3, 5, 7, 14]. Возможно, увеличение количества обследованных больных изменит этот результат.

Для оценки диагностической информативности (ДИ) изученных тестов нами был проведен статистический ROC-анализ (табл. 2). Он позволяет определить диагностическую чувствительность (ДЧ) и диагностическую специфичность (ДС) теста, а площадь под ROC-кривой (AUC) является объективной интегральной оценкой ДИ метода. Полученные нами результаты тестов AMA-2 anti-ENA соответствуют данным других авторов, представленных в литературе [4, 5, 11, 14]. В отношении anti-ASGPR антител мы уста-

новили довольно невысокую ДИ, хотя в отдельных работах показано, что данный тест имеет ДЧ = 78%, а ДС составляет 99% [8]. Вместе с тем, обнаружено повышение уровня антител данной специфичности при вирусных гепатитах [6], что также ставит вопрос о диагностической ценности anti-ASGPR в дифференциальной диагностике аутоиммунной патологии.

Таким образом, в проведенном нами исследовании 15 пациентов с аутоиммунным гепатитом и ПБЦ мы не обнаружили преимуществ теста на наличие anti-ASGPR перед уже существующими, и целесообразность его использования в клинической практике требует уточнения.

Список литературы / References

1. Гастроэнтерология: Клинические рекомендации / под ред. В.Т. Ивашкина. М., 2006. 208 с. [Gastroenterology. Clinical recommendations / edited by V.T. Ivashkin]. Moscow, 2006. 208 p.
2. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. СПб.: Человек, 2010. 272 с. [Lapin S.V., Totolian A.A. Immunological laboratory diagnosis of autoimmune diseases]. St. Petersburg: Tchelovek, 2010. 272 p.
3. Сагынбаева В.Э., Лазебник Л.Б., Винницкая Е.В., Дорофеев А.С., Ефремов Л.И. Диагностическое значение аутоантител к асиалогликопротеиновому рецептору при аутоиммунном гепатите // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2013. № 8. С. 45-49. [Sagynbaeva V.E., Lazebnik L.B., Vinnitskaya E.V., Dorofeev A.S., Efremov L.I. Diagnostic value of autoantibodies to asialoglycoprotein receptor in autoimmune hepatitis. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2013, no. 8, pp. 45-49. (In Russ.)]
4. Bowlus C.L., Gershwin M.E. The diagnosis of primary cirrhosis. *Autoimmune Rev.*, 2014, Vol. 13, pp. 441-444.
5. Czaja A.J. Autoimmune hepatitis – approach to diagnosis. *MedGenMed.*, 2006, Vol. 23, no. 2, p. 55.
6. Diao J., Slaney D.M., Michalak T.I. Modulation of the outcome and severity of hepadnaviral hepatitis in woodchucks by antibodies to hepatic asialoglycoprotein receptor. *Hepatology*, 2003, Vol. 38, no. 3, pp. 629-638.
7. Gleeson D., Heneghan M.A. British Society of Gastroenterology. British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for management of autoimmune hepatitis. *Gut.*, 2011, Vol. 60, no. 12, pp. 1611-1629.
8. Hausdorf G., Roggenbuck D., Feist E., Büttner T., Jungblut P.R., Conrad K., Berg C., Klein R. Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) measured by a novel ELISA – revival of a disease-activity marker in autoimmune hepatitis. *Clin. Chim. Acta*, 2009, Vol. 408, no. 1-2, pp. 19-24.
9. Liberal R., Grant C.R., Longhi M.S., Mieli-Vergani G., Vergani D. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev.*, 2014, Vol. 13, no. 4-5, pp. 435-437.
10. Longhi M.S., Ma Y., Mieli-Vergani G., Vergani D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J. Autoimmun.*, 2009, Vol. 17, no. 9, pp. 186-189.

11. Manns M.P., Czaja A.J., Gorham J.D., Krawitt E.L., Vergani D., Vierling J.M.; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 2010, Vol. 51, no. 6, pp. 2193-2213.
12. Rigopoulou E.I., Roggenbuck D., Smyk D.S., Liaskos C., Mytilinaiou M.G., Feist E., Conrad K., Bogdanos D.P. Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: lost and found. *Autoimmun Rev.*, 2012, Vol. 12, no. 2, pp. 260-269.
13. Treichel U., Poralla T., Hess G., Manns M., Meyer zum Büschenfelde K.H. Autoantibodies to human asialoglycoprotein receptor in autoimmune-type chronic hepatitis. *Hepatology*, 1990, Vol. 11, no. 4, pp. 606-612.
14. Vierling J.M. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Curr. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 14, no. 1, pp. 25-36.

Авторы:

Базарный В.В. — д.м.н., профессор, ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Екатеринбург, Россия

Михайлова Е.Ю. — младший научный сотрудник, ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Екатеринбург, Россия

Партылова Е.А. — к.м.н., научный сотрудник, ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Bazarnyi V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

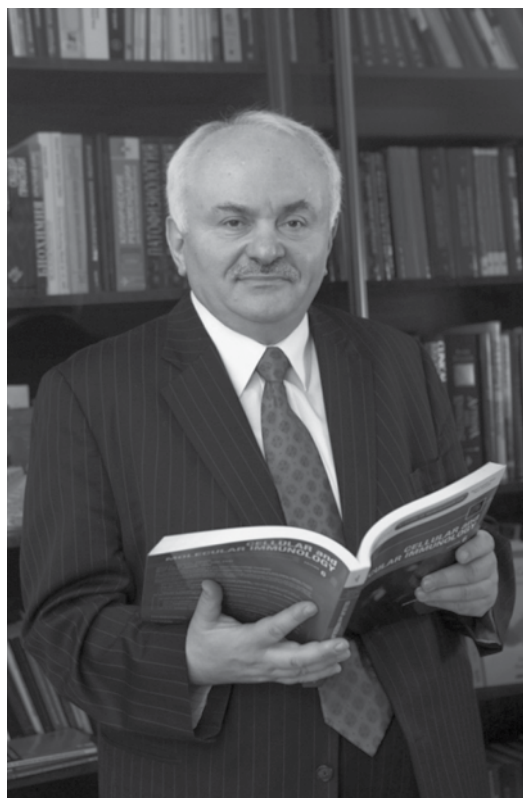
Mikhailova E. Yu., Junior Research Associate, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Partlylova E.A., PhD (Medicine), Research Associate, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 01.12.2014
Принята к печати 10.12.2014

Received 01.12.2014
Accepted 10.12.2014

РЕВАЗУ ИСМАИЛОВИЧУ СЕПИАШВИЛИ 60 ЛЕТ



24 января 2015 года исполняется 60 лет со дня рождения Реваза Исмаиловича Сепиашвили — видного отечественного ученого, признанного во всем мире, одного из ведущих специалистов в области иммунологии и аллергологии, иммунофизиологии и иммунореабилитологии, Президента Всемирной организации по иммунопатологии, Президента Союза аллергологов и иммунологов СНГ, Президента Союза физиологических обществ стран СНГ, директора Института иммунофизиологии в Москве и Национального института аллергологии, астмы и клинической иммунологии Академии наук Грузии в Цхалтубо, заведующего кафедрой аллергологии и иммунологии Российского университета дружбы народов, доктора медицинских наук, профессора, академика Академии наук Грузии.

Научные исследования Р.И. Сепиашвили (1984-1999) заложили основу совершенно нового направления медицинской науки — иммунореабилитологии, основоположником и признанным лидером которой он является.

В 2001 году Р.И. Сепиашвили впервые было дано определение понятию «иммунотропные препараты», разработаны показания и противопоказания, а также рекомендации по их использованию, предложена первая классификация иммунотропных препаратов, удобная для практического применения.

Результаты исследований легли в основу монографий и многотомных руководств, изданных на английском языке в одних из самых известных и престижных издательств мира «Monduzzi Editore» и «Oxford Press».

Р.И. Сепиашвили опубликовано более 380 научных работ в отечественной и зарубежной периодической печати, издано множество учебно-методических и клинических рекомендаций для студентов, врачей и биологов. Р.И. Сепиашвили автор научного открытия и нескольких изобретений.

Р.И. Сепиашвили активно участвует в подготовке высококвалифицированных научных кадров. По его инициативе в 2005 году была основана кафедра аллергологии и иммунологии Российского университета дружбы народов, заведующим которой является со дня ее основания.

Более 10 лет Р.И. Сепиашвили является председателем диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций при РУДН. Под руководством Р.И. Сепиашвили подготовлено и защищено 10 докторских и 22 кандидатских диссертации.

Активную научную и педагогическую работу Р.И. Сепиашвили сочетает с не менее активной научно-организационной деятельностью.

В 1999 году Р.И. Сепиашвили был избран председателем Союза аллергологов и иммунологов СНГ, а в декабре 2002 года — президентом Всемирной организации по иммунопатологии. В июле 2003 года он был избран членом Исполкома Всемирной ассоциации по астме. В 2003 году Р.И. Сепиашвили стал одним из инициаторов создания, вице-президентом и исполнительным директором Союза физиологических обществ стран СНГ, Президентом которого был избран в 2011 году.

В 2002 году в возрасте 47 лет Р.И. Сепиашвили был избран академиком Академии Наук Грузии.

В 2011 году Р.И. Сепиашвили был избран почетным членом Американского колледжа Аллергии, Астмы и Иммунологии (*Fellow of the American College Allergy, Asthma & Immunology* (FACAAI)) и Золотым членом Европейского респираторного общества (ERS).

На протяжении многих лет Р.И. Сепиашвили является экспертом Всемирной организации здравоохранения, а с 2003 по 2013 годы был членом экспертного совета ВАК РФ.

Р.И. Сепиашвили — основатель и главный редактор пяти научных журналов.

Начиная с 1983 года, Р.И. Сепиашвили был инициатором и организатором (председателем Оргкомитета и президентом) более чем 50 научных Всемирных, международных, национальных форумов, проводимых не только в России, но и в различных странах мира.

Заслуги Р.И. Сепиашвили перед наукой известны во всем мире и были признаны международным научным сообществом.

В 2012 году Российское научное общество иммунологов наградило Р.И. Сепиашвили Золотой медалью имени И.И. Мечникова и дипломом за выдающиеся достижения в области иммунологии.

В 2012 году академик Р.И. Сепиашвили первым из отечественных ученых получил одну из самых престижных и почетных наград — высшую награду American College of Allergy, Asthma & Immunology — *ACAAI International Distinguished Fellow Award*.

За многие годы совместной работы он стал другом и Учителем не только для сотрудников и учеников, но и для многих ученых, которым он безвозмездно передавал свои научные идеи и знания.

Трудно найти такого ученого, видного общественного деятеля, который за столь короткий жизненный период стал не только одним из ведущих ученых мира и признанным лидером в области иммунологии и аллергологии, физиологии иммунной системы, основоположником нескольких научных направлений, но и смог создать «с нуля» и возглавить два научно-исследовательских института, кафедру, пять научных журналов, диссертационный совет, несколько международных научных обществ, чей жизненный путь — пример личной скромности, самоотверженности и преданности науке, созидания и консолидации ученых мира на благо науки и здоровья человечества.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше. Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи,

но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление. — 2012. — Т. 11, №1. — С. 64–69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. — М.: Анахарсис, 2009. — 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. *Moscow: Anacharsis*, 2009, 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. *Basic and Clinical Immunology*. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соот-

ветствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большом количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам. Фотографии не должны иметь больших полей, т.е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отобра-

жаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
- 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).
 - Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
 - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
 - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.

- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специальных сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Базарный В.В.....	93	Кореньков Д.А.....	59	Сабадаш Е.В.	75
Бойко О.Н.	53	Кудрявцев И.В.....	19	Синельникова Н.А.	39
Бычкова Н.В.....	39	Лосев И.В.	59	Скорняков С.Н.....	75
Григорьева Е.П.	59	Маклакова Т.П.....	53	Смолоногина Т.А.....	59
Давыдова Е.В.....	33	Манюкова Э.Т.....	47, 81	Соколова З.А.	7
Донина С.А.....	59	Матвеева Л.В.	27	Соколова Т.М.	7
Дорошенко Е.М.	59	Медвинский И.Д.....	75	Сорокина Л.Н.....	71
Ерофеева М.К.....	59	Минеев В.Н.	71	Стукова М.А.	59
Ершов Ф.И.	7	Михайлова Е.Ю.....	93	Субботовская А.И.	19
Зорин Н.А.	53	Михайлова З.Д.	47, 81	Шаленкова М.А.....	47, 81
Зорина В.Н.	53	Найхин А.Н.	59	Шаповал И.М.....	7
Зорина Р.М.	53	Нёма М.А.....	71	Шепель Т.Т.....	53
Зурочка А.В.	33	Новиков Б.И.....	75	Ширинский В.С.	87
Калинина Н.М.	39	Павлов В.А.....	75	Ширинский И.В.....	87
Калиновская Н.Ю.....	87	Партылова Е.А.....	93	Шувалов А.Н.	7
Климкин П.Ф.....	47	Петухова Г.Д.	59		
Коншина О.С.	59	Руденко Л.Г.....	59		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

альфа-2-макроглобулин.....	53	многоцветный анализ	19
аминокислоты	75	моноциты	75
атрофия слизистой оболочки желудка.....	27	мРНК AID	71
аутоантитела	93	остеоартрит.....	87
аутоиммунный гепатит	93	острое повреждение почек.....	47
базофилы	39	острый коронарный синдром	47, 81
бронхиальная астма.....	71	первичный билиарный цирроз.....	93
воспаление.....	87	проточная цитометрия.....	19
высокочувствительный С-реактивный белок...	81	птичьи вирусы гриппа.....	59
гемограмма	33	ранние формы хронической ишемии мозга.....	33
глутатион	75	сахарный диабет 2 типа.....	87
гуморальный иммунный ответ	59	сигнальные иммунные гены	7
диффузный токсический зоб.....	53	субпопуляции лимфоцитов	27
иммунный ответ к вирусам гриппа А	59	супернатант	53
иммунофенотипирование лимфоцитов	19	таурин	75
индукторы-IFN	7	Тиамазол	53
интерлейкин-6.....	81	Т-лимфоциты	33
интерлейкин-10.....	81	Т-хелперы 2 типа.....	39
интерлейкины	27, 47	туберкулез легких	75
интерферон.....	27	хроническая крапивница	39
кардиоваскулярные осложнения.....	81	хронический гастрит	27
клетки крови.....	7	цитокины	53, 87
коморбидность	87	AICDA.....	71
креатинин	47	CD203c.....	39
культуры клеток крови.....	53	IgE	39
лимфоциты	71	NGAL.....	47
митогенная стимуляция.....	53		

KEDRION

БИОФАРМА

Keep Life Flowing

И.Г.Вена

ИММУНОГЛОБУЛИН ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНЫЙ
РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ

ВЫСОКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ПЕРЕНОСИМОСТЬ

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ ВСЕМ НУЖНЫ



www.kedrion.com

ООО МЕДИПАЛ-ОНКО - официальный дистрибьютор
компании KEDRION S.p.A (Кедрион)
на территории Российской Федерации
www.medipal-onko.ru

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

