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

Том 19, Специальный выпуск

2017

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Материалы XVI Всероссийского научного Форума
с международным участием имени академика В.И. Иоффе
ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

5-8 июня 2017 г.

Данный выпуск реализован при финансовой поддержке Правительства Санкт-Петербурга

кагОцел®

противовирусное средство

РабОтает

даже при запоздалом лечении!

Кагоцел® – выбор специалистов![1]

- **Кагоцел®** эффективен при приеме вплоть до четвертого дня от начала появления первых симптомов ОРВИ и гриппа.
- По результатам наблюдательного международного исследования «Лечение ОРВИ и гриппа в рутинной клинической практике FLU-EE» с участием 18 946 пациентов из 262 медицинских центров России, Армении, Молдовы, Грузии противовирусный препарат **Кагоцел®** показал высокую эффективность вне зависимости от времени назначения терапии и тяжести течения ОРВИ и гриппа при высоком профиле безопасности[2].
- **Кагоцел®** быстро улучшает самочувствие и сокращает продолжительность клинических симптомов гриппа и ОРВИ вне зависимости от этиологии заболевания.
- **Кагоцел®** входит в СТАНДАРТЫ МИНЗДРАВА РФ по оказанию специализированной медицинской помощи при гриппе средней и тяжелой степени тяжести[3].
- Профилактический 4-недельный курс приема **Кагоцела** способствует снижению частоты возникновения ОРВИ и гриппа в 3 раза, а также достоверно снижает число осложнений в 5 раз[4].
- **Кагоцел®** имеет высокий профиль безопасности.

Современный противовирусный препарат для взрослых и детей с 3 лет

[1] По результатам голосования российских врачей в рамках премии Russian Pharma Awards 2016 Кагоцел® – самый назначаемый препарат при профилактике и лечении ОРВИ и гриппа; по результатам голосования специалистов аптечной индустрии в рамках премии «Зеленый крест 2015» Кагоцел® – лучший безрецептурный препарат. [2] Фазылов В.Х. с соавт. Лечение ОРВИ и гриппа в рутинной клинической практике: результаты многоцентрового международного наблюдательного исследования FLU-EE // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88, № 11. – С. 68–75. [3] Приказ Министерства здравоохранения РФ от 9 ноября 2012 г.: № 724н, № 842н. [4] Лыткина И.Н., Малышев Н.А. Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций среди эпидемиологически значимых групп населения // Лечащий врач. – 2010. – № 10. – С. 66–69.

Подробную информацию вы можете получить на сайте: www.kagocel.ru

ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»: 125252, Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д. 12. Тел./факс: +7 (495) 741-49-89.
Рег. уд. Р N002027/01 от 19.11.2007.

Информация предназначена для медицинских и фармацевтических работников.

Реклама

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

2017, том 19 **Специальный выпуск**

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

Фрейдлин Ирина Соломоновна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор 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 гибридомной технологии Российского научного центра радиологии и хирургических технологий Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

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

Мазуров Вадим Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, президент 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 отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Недоспасов Сергей Артурович – доктор биологических наук, профессор, академик 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, член-корреспондент РАН, 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, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Черных Елена Рэмовна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ фундаментальной и 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

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

Роггенбук Дирк – доктор медицинских наук, профессор, Университет Лаузиц «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

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

Ответственный секретарь:
Ракитянская Н.В.
E-mail: medimmun@spbraaci.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.
Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФС77-60436 30 декабря 2014 г.

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 23.05.2017 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 38,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1102
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 июня 2016 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу SCOPUS

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH
(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

2017, volume 19 **Special Issue**

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS full member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Editorial Board

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

Kirill P. Kashkin – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgratuate Medical Education, Department of Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

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

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

Vladimir A. Kozlov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Scientific Director, Novosibirsk, Russian Federation

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

Vadim I. Mazurov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Nord-Western State Medical University, President, Department of Therapy and Rheumatology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Petr G. Nazarov – PhD, MD, Professor, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

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

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnostics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russian Federation

Andrei S. Simbirtsev – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Director, St. Petersburg, Russian Federation

Viacheslav S. Smirnov – PhD, MD, Professor, "Cytomed" Ltd., Director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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 Lasunskaia – 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 Planing, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

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

Managing Editor:
Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:
Alexey B. Chukhlovin, 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.
Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (ROSKOMNADZOR)
Certificate on registration of mass media PI №FS77-60436, December 30, 2014

Chelovek Publishing House
199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyi persp. Vasilevsky Island, 26, office 2.
E-mail: mail@mirmed.ru
Phone/fax: (812) 325-25-64, 328-18-68.

Passed for printing 23.05.2017. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.
Printed sheets 38,5. 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

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 June 2016 the Medical Immunology Journal is included into international SCOPUS database

СОДЕРЖАНИЕ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ, ИММУНОДИАГНОСТИКИ И ИММУНОКОРРЕКЦИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ) ...10

ИММУНОГЕНЕТИКА.....80

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ.....85

- АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.....85
- АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.....103
- ИММУНОЛОГИЯ ИНФЕКЦИЙ.....127
- ИММУНОЛОГИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА.....139
- ИММУНОЛОГИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ.....145
- ОНКОИММУНОЛОГИЯ И ГЕМОБЛАСТОЗЫ.....155
- ПЕРВИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ.....171

ИММУНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ.....175

ИММУНОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ.....200

ИММУНОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЧЕВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ.....211

ИММУНОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛОР-ОРГАНОВ.....217

ИММУНОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ЗРЕНИЯ.....222

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В ХИРУРГИИ.....227

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В ПЕДИАТРИИ.....237

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.....253

ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ ЭНДОГЕННОЙ И ЭКЗОГЕННОЙ ПРИРОДЫ.....263

ЭКОЛОГИЯ, СТРЕСС И ИММУНИТЕТ.....282

ИММУНОЛОГИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ.....295

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ.....301

CONTENTS

MOLECULAR AND CELLULAR BASIS OF IMMUNE REGULATION, IMMUNE AND IMMUNODIAGNOSTICS (EXPERIMENTAL MODELS) 10

IMMUNOGENETICS 80

PATHOGENESIS, DIAGNOSTICS AND IMMUNOTHERAPY IMMUNOPATHOLOGICAL STATES 85

- ALLERGIC DISEASES 85
- AUTOIMMUNE DISEASES 103
- IMMUNOLOGY INFECTIONS 127
- IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS 139
- IMMUNOLOGY OF HIV AND VIRAL HEPATITIS 145
- CANCERS AND HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES 155
- PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES 171

IMMUNOLOGY OF REPRODUCTION 175

IMMUNOLOGY OF CARDIOVASCULAR SYSTEM DISEASES 200

IMMUNOLOGY OF URINARY SYSTEM DISEASES 211

IMMUNOLOGY IN OTORHINOLARYNGOLOGY 217

IMMUNOLOGY OF EYE DISEASES 222

IMMUNOLOGICAL PROBLEMS IN SURGERY 227

IMMUNOLOGICAL PROBLEMS IN PEDIATRICS 237

IMMUNOLOGICAL METHODS 253

IMMUNOMODULATORS OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS NATURE 263

ECOLOGY, STRESS AND IMMUNITY 282

VETERINARY IMMUNOLOGY 295

AUTHOR INDEX 301

ОРГАНИЗАТОРЫ ФОРУМА:

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Российская Академия Наук

Северо-Западное отделение медицинских наук

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Комитет по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга

●

Институт экспериментальной медицины

Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова

Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский Центр имени В.А. Алмазова

●

Российская Ассоциация Аллергологов и Клинических Иммунологов

Российское научное общество иммунологов

Российское цитокиновое общество

Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов

Российское научное общество лабораторной диагностики

Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»

Санкт-Петербургское региональное отделение Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

FORUM ORGANIZERS:

The Ministry of Health of the Russian Federation

Russian Academy of Sciences

North-West Branch of Medical Sciences

Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare

The Committee on Science and Higher Education of the Government of St. Petersburg

Health Committee of St. Petersburg Government

●

Institute of Experimental Medicine

St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology

The First St. Petersburg State Medical University named after academician I.P. Pavlov

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov

Federal Almazov North-West Medical Research Centre

●

Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists

Russian Society of Immunologists

Russian Cytokine Society

Russian Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

Russian Society of Laboratory Diagnostics

Association of laboratory specialists and organizations
"Federation Of Laboratory Medicine"

St. Petersburg Regional Branch of the Russian Association
of Allergologists and Clinical Immunologists

ПРИВЕТСТВИЕ ОРГКОМИТЕТА

Уважаемые коллеги!

Оргкомитет XVI Всероссийского Научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» с большим удовольствием приглашает вас принять участие в очередной встрече иммунологов на берегах Невы.

Научный форум посвящен достижениям современной фундаментальной и прикладной иммунологии, в частности обсуждению современных направлений в изучении иммунорегуляции, иммунодиагностики и иммунокоррекции. Приглашены ведущие иммунологи страны и зарубежья для чтения пленарных лекций по наиболее злободневным проблемам фундаментальной и прикладной иммунологии. Кроме пленарных лекций и секционных заседаний в научную программу Форума включены несколько научных симпозиумов и круглых столов для обсуждения дискуссионных вопросов фундаментальной и прикладной иммунологии. В качестве кураторов симпозиумов и круглых столов также приглашены ведущие специалисты соответствующих областей иммунологии, а всем участникам форума будет предоставлена возможность выступить на одном из симпозиумов или секционных заседаний с устным докладом или принять участие в стендовой сессии. Секционные заседания традиционно будут посвящены проблемам иммунорегуляции, диагностике и лечению иммунопатологических состояний, первичным иммунодефицитам, онкологическим заболеваниям, иммунологии репродукции. Значительно расширилась тематика запланированных симпозиумов, включающая: «Первичные иммунодефицитные состояния: вчера, сегодня, завтра», «ВИЧ-инфекция и коморбидные состояния», «Вирусные гепатиты», «Интерфероны: от теории к практике», «Цитокины в иммунорегуляции, иммунодиагностике и иммунотерапии», «Иммунология туберкулеза», «Таргетная иммунотерапия в пульмонологии», «Микробиота. Иммунитет. Инфекция», «Современные направления иммунофармакологии».

Наиболее острые дискуссии ожидаются на заседаниях круглых столов: «Есть ли вторичный иммунодефицит при острых респираторных вирусных инфекциях?» и «Лечение ОРВИ и гриппа у аллергиков. Взгляд врача аллерголога и инфекциониста». Будет проведена ставшая уже традиционной открытая дискуссия «Иммунологическая революция» по проблемам фундаментальной и клинической иммунологии.

В программе Форума сохранится ставшая популярной традиция проведения заседаний «Клуба молодого иммунолога» и конкурса молодежных научных работ.

В качестве сателлитных мероприятий состоятся: Всероссийская школа «Проточная цитометрия в диагностике иммунодефицитных состояний» и полуфинальный отбор программы УМНИК. В работе Форума запланированы: конкурс молодых ученых, конкурс на лучший стендовый доклад.

Проведение Форума поддержано Российской академией наук, Министерством здравоохранения РФ, Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также Правительством Санкт-Петербурга в лице Комитета по здравоохранению и Комитета по науке и высшей школе.

Оргкомитет считает своим приятным долгом выразить благодарность Генеральному спонсору – компании «Медипал Онко», Главным спонсорам – компаниям «Бекман Культер» и «НПО Петровакс Фарм», а также спонсорам и участникам выставки, финансовая поддержка которых сделала возможными организацию и проведение Форума.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ, ИММУНОДИАГНОСТИКИ И ИММУНОКОРРЕКЦИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ)

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ АУТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ КАК СПОСОБ ВЫЯСНЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ИДИОТИПИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ И АКТИВАЦИИ АУТОРЕАКТИВНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Абишева Н.Н., Чалый И.А., Фролов М.Л.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Введение. Иммунная сеть, возникающая на основе идиотип-антиидиотипических (ИАИ) взаимодействий между лимфоцитами, является механизмом специфической регуляции активности лимфоцитов, в том числе аутореактивных. Однако как организована и функционирует иммунная сеть, в частности как контролирует аутореактивные лимфоциты и теряет контроль над ними, остается предметом современных дискуссий (Schulz, 2014; Menshikov, 2015).

Цель. Выяснение механизмов идиотипической регуляции и активации аутореактивных лимфоцитов.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования выполнены на модели аутоиммунной гемолитической анемии (АГА) у мышей, так как лимфоциты, специфичные к аутоэритроцитам, и лимфоциты, специфичные к эритроцитам крыс (ЭК) (антиген-индуктор классической модели АГА у мышей), связаны в ИАИ взаимодействиях. АГА у мышей индуцировали введением ЭК и аллогенных эритроцитов. Были исследованы кинетика антител против ЭК и аутоантител против ЭМ в крови мышей, а также уровень эритроцитов в крови в ответ на иммунизацию ЭК или аллоэритроцитами. Теоретические исследования выполнены на компьютерной модели иммунной сети, созданной на основе математической модели иммунной сети (Menshikov, 2015). Компьютерная модель описывает шесть идиотипически связанных клонов, замкнутых в кольцо, один из клонов был задан как аутореактивный.

Результаты. На модели АГА у мышей, вызванной введением ЭК, выявлен феномен опережающей продукции антиидиотипических антител (аутоантител к ЭМ) в ответ на иммунизацию ЭК в относительно низкой дозе. Компьютерная модель иммунной сети, содержащая аутореактивный клон, также показывает, что продукция антиидиотипических антител (аутоантител), опережающая продукцию идиотипических антител (антител к чужеродному антигену), наблюдается в ответ на введение чужеродного антигена в относительно низких дозах. Возможность воспроизведения в компьютерной модели иммунной сети экспериментального феномена указывает на то, что он является универсальным, а также позволяет предполагать механизм данного явления. Причиной опережающей продукции антиидиотипических антител, если они являются аутоантителами, в ответ на введение чужеродного антигена является асимметрия в ИАИ взаимодействиях между аутоклоном и клоном, специфичным к чужеродному антигену-индуктору аутоиммунной реакции, возникающая как результат градиента активационного сигнала, поступающего в пару аутоклон–клон против чужого со стороны аутоантигена. Асимметрия в свою очередь может детерминировать регуляторные свойства клона против чужеродного антигена по отношению к связанному с ним аутоклону. Обнаружено также, что иммунизация мышей аллоэритроцитами приводит не только к появлению аутоантител к эритроцитам и развитию анемии, но и антител к ЭК. Обращает на себя внимание и необычная кинетика иммунного ответа, вызванного аллоэритроцитами. Выявлено, что продукция антител к ЭК синхронизирована с продукцией аутоантител к эритроцитам и характеризуется прогрессивным ростом. Чтобы выяснить причину появления антител к ЭК и прогрессивной синхронной продукции антител к ЭК и аутоантител в ответ на иммунизацию аллогенными эритроцитами, были проведены исследования на компьютерной модели иммунной сети. Добиться сходства теоретической и экспериментальной кинетики иммунного ответа, вызванного аллоантигеном, не прибегая к прямой активации аутоклона и связанного с ним клона против чужого, который имитирует лимфоциты, специфичные к ЭК, можно только подачей сигнала на клон, находящийся на достаточно удаленном расстоянии от аутоклона. Компьютерное моделирование показало, что активация такого клона приводит к активации всего исследуемого фрагмента иммунной сети. При этом все клоны фрагмента иммунной сети демонстрируют прогрессивный незавершающийся рост активности, что свидетельствует о выходе из зоны толерантности. Данный факт позволяет предполагать, что иммунизация аллоантигенами может вызывать системные хронические аутоиммунные процессы.

Заключение. Неравноценность активационного сигнала, испытываемого аутоклоном и идиотипически связанным с ним клоном против чужеродного антигена, вызывает асимметрию в ИАИ взаимодействиях между этими клонами и может тем самым детерминировать регуляторные свойства клона против чужеродного антигена по отношению к связанному с ним аутоклону. Возникновение системных хронических аутоиммунных процессов может быть следствием иммунного ответа на антигены, активирующие лимфоциты, специфичность которых сходна, но не идентична специфичности лимфоцитов, регулирующих аутоклоны.

ВЛИЯНИЕ МНОГОКРАТНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК С ОПРЕДЕЛЕННЫМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУННОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ РЕЦИПИЕНТОВ

Аникеева О.С., Маркова Е.В.

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

Введение. Ранее нами был продемонстрирован феномен и механизмы направленной регуляции поведенческих реакций у половозрелых экспериментальных животных трансплантацией иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками, а также возможность формирования определенного стереотипа поведения у половозрелых животных путем многократной трансплантации иммуноцитов, проведенной в ювенальном периоде онтогенеза.

Цель. Исследование механизмов влияния многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками на уровень основных регуляторных цитокинов в головном мозге и селезенке животных-реципиентов в сопоставлении с интенсивностью иммунного ответа и уровнем сформированного ориентировочно-исследовательского поведения.

Материалы и методы. Исследование выполнено на мышах-самцах (CBAxC57BL/6)F1 в количестве 280 особей, которым, начиная с 4-5-недельного возраста (животные-реципиенты), проводилась трехкратная внутривенная трансплантация спленоцитов от сингенных доноров 3-месячного возраста с оппозитными (активным и пассивным) типами ориентировочно-исследовательского поведения. Контрольной группе животных вводилась среда RPMI-1640 в аналогичных условиях эксперимента. У животных-реципиентов и мышей контрольной группы по достижении половозрелого возраста проводилось исследование поведения в тесте «открытое поле», определение содержания ряда регуляторных цитокинов в головном мозге и селезенке методом иммуноферментного анализа и определение интенсивности гуморального и клеточного иммунного ответа.

Результаты. Ранее нами было показано, что мыши-самцы CBAxC57BL/6)F1 с оппозитными типами поведения различны также по функциональной активности клеток иммунной системы. В настоящем исследовании продемонстрировано, что трехкратная трансплантация спленоцитов от доноров с оппозитными типами поведения сингенным реципиентам в ювенильный период их развития вызывает у последних направленное изменение параметров ориентировочно-исследовательского поведения, сопровождаемое модуляцией содержании цитокинов в селезенке и головном мозге и интенсивности иммунного ответа.

В случае трансплантации спленоцитов от доноров с активным типом поведения в группе реципиентов в половозрелом возрасте регистрировалось увеличение доли животных с активным типом поведения относительно контрольной группы (28,4% *vs* 11,7%; p = 0,003), что ассоциировалось с более высоким содержанием у реципиентов IL-10 в лизатах селезенки (26,1 [5,03÷68,3] *vs* 3,2 [0,12÷6,9] pg/ml; p = 0,035) и повышением интенсивности иммунного ответа. В частности, высота реакции ГЗТ у мышей-реципиентов и в контрольной группе животных составляла 38,2 (30÷47,4) и 23,8 (12,25÷30,8) соответственно; интенсивность гуморального иммунного ответа, оцененная по относительному числу антителообразующих клеток селезенки (АОК), у указанных групп мышей также повышалась (101,3 [60,2÷184,9] *vs* 42,7 [14,9÷45,5]).

В группе реципиентов, подвергнутых трехкратной трансплантации спленоцитов от доноров с пассивным типом поведения, регистрировалось увеличение доли животных с аналогичным донорам пассивным типом поведения: 36,6 % *vs* 23,4% относительно группы контроля (p = 0,05), что сопровождалось более высоким содержанием в лизатах головного мозга реципиентов IFNγ (2205(2095,5÷2322,5) *vs* 1975,8 (1832,4÷2103,4) pg/ml; p = 0,023) и TNFα (41,7±[0,91÷141,9] *vs* 0,0±[0,0÷25,9] pg/ml; p = 0,05) относительно соответствующих показателей в контрольной группе животных. Со стороны иммунного ответа у животных-реципиентов отмечалось снижение высоты реакции ГЗТ (15,85 [13,6÷20] и 23,8 [12,25÷30,8] относительно контрольной группы мышей) при повышении интенсивности гуморального иммунного ответа (относительное число АОК селезенки составляло у животных реципиентов и мышей контрольной группы соответственно 71,4 [46,8÷102,3] *vs* 42,7 [14,9÷45,5]).

Заключение. Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о модулирующем влиянии многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками, проведенной в ювенильный период развития экспериментальных животных, на функциональную активность иммунной и нервной систем реципиентов половозрелом возрасте.

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРЕДОПРЕДЕЛЯЕТ ВОЗНИКНОВЕНИЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СПОНТАННОЙ МЫШИНОЙ МОДЕЛИ

Аронов Д.А., Моисеева Е.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием у женщин. Персональное предсказание времени возникновения РМЖ может существенно облегчить раннюю диагностику, способствуя снижению смертности. Например, в модели Гейла прогноз строится на основании данных анамнеза жизни женщины с учетом наличия мутаций BRCA1/2 и других известных генов, определяющих врожденную предрасположенность к развитию РМЖ. Однако существующие в клинической онкологии модели по-прежнему не позволяют даже приблизительно предсказать возраст, в котором у данной женщины возникнет РМЖ. Отдельного внимания заслуживает прогностический потенциал показателей иммунный системы: для ряда субпопуляций клеток иммунной системы (ИС) пациентов с РМЖ описаны как про-, так и противоопухолевые эффекты. Имеются данные о связи инфильтрации РМЖ лимфоцитами Treg с плохим прогнозом, а цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) – с благоприятным (в зависимости от типа РМЖ, возраста пациента и пр.). Однако влияние уровня/дисбаланса отдельных компонентов ИС на время клинического проявления рака по-прежнему не описано: невозможно выявить момент инициации РМЖ у человека, а стандартные (в том чис-

ле и генномодифицированные) мышиные модели, как правило, не отражают последовательную динамику естественных патофизиологических процессов в момент зарождения, промоции и прогрессии опухолевого ростка. Линия мышей BLRB конвенционального разведения характеризуется высокой частотой естественно возникающего (спонтанного) РМЖ у самок по мере старения. Проведенный ранее патоморфологический анализ позволил выявить в данной линии мышей наличие всех основных типов РМЖ человека, а также этапы прогрессии от гиперплазии до карциномы *in situ* и инвазивного РМЖ (как лобулярного, так и протокового). Ранее было выявлено сходство состава лейкоцитарных инфильтратов мыши в этой модели и пациентов с РМЖ.

Цель. Оценить прогностический потенциал иммунологических показателей крови, измеренных до возникновения опухоли в спонтанной мышиной модели РМЖ человека BLRB.

Материалы и методы. У интактных самок BLRB (n = 81) нашей коллекции в возрасте от 27 до 99 недель (средний возраст 55,2±2,0) были прижизненно взяты образцы крови из ретроорбитального синуса в объёме 200 мкл. Методом проточной цитометрии (FACSCalibur, BD Biosciences, США) был измерен уровень 11 основных показателей ИС крови: лимфоцитов (CD45highSSClow), моноцитов (F4/80+SSCint), нейтрофилов ($CD11b^+F4/80negSSCint$), эозинофилов (F4/80+SSChigh), $CD4^+$ Т-хелперов, $CD8^+$ЦТЛ,$CD19^+$В-лимфоцитов, $NK1.1^+$NK-лимфоцитов, $NK1.1^+CD3^+$NK-Т лимфоцитов, $CD4^+CD25^+$ активированных (акт.) Т-хелперов, $CD8^+CD25^+$ акт. ЦТЛ. Далее в течение 7 месяцев ежедневно оценивали выживание стареющих самок, еженедельно индивидуально проводили пальпацию, регистрируя появление новых РМЖ. Статистическую значимость различий оценивали в программе STATISTICA 10 (StatSoft, США) по U-критерию Манна–Уитни, связь между параметрами оценивали по коэффициенту корреляции Спирмена.

Результаты. Спустя 7 месяцев РМЖ был выявлен у 21/81 самок (26%), 37/81 самок (46%) погибли без клинических признаков РМЖ и 23/81 самок (28%) были живы без РМЖ. Изначальный уровень моноцитов в крови выживших без РМЖ самок был ниже уровня у погибших самок ($p = 0,02$), так и у самок группы с РМЖ ($p = 0,04$). Изначальный уровень Т-хелперов в крови выживших без РМЖ самок был выше, чем у самок с РМЖ ($p = 0,04$). Однако не было обнаружено статистически значимых различий между группой погибших без РМЖ самок и группой самок с РМЖ. Далее мы обнаружили достоверную связь 9 из 11 измеренных показателей с возрастом самки на момент забора крови ($p < 0,05$): уровень лимфоцитов, эозинофилов, Т-хелперов, акт. Т-хелперов, NK-клеток снижался, а уровень нейтрофилов, ЦТЛ, акт. ЦТЛ и В-лимфоцитов повышался с возрастом. Обнаруженный у самок BLRB по мере старения иммунологический дисбаланс послужил основанием для разделения исходной популяции самок на условно «молодых» (от 27 до 55 нед., в среднем 42,0±1,4 нед., n = 45) и «старых» (от 56 до 99 нед., средний возраст 71,2±2,1 нед., n = 36) и рассматривать эти две группы отдельно. Оказалось, что у «молодых» самок с РМЖ изначальный уровень NK-клеток был ниже, чем у погибших без РМЖ ($p = 0,009$) и выживших без РМЖ ($p = 0,032$). У «старых» самок с РМЖ обнаружили сочетание изначально низкого уровня В-лимфоцитов с высоким уровнем Т-хелперов, в то время как у погибших без РМЖ оба параметра были низкие ($p = 0,02$), а у выживших без РМЖ – высокие ($p = 0,011$).

Выводы. 1) Иммунологический дисбаланс усиливался по мере старения еще до возникновения РМЖ. 2) У относительно «молодых» и более «старых» самок прогностическим потенциалом в крови обладают разные иммунологические показатели. 3) Только стратифицируя самок по возрасту, удалось выявить, какие параметры ИС предопределяют появление спонтанного РМЖ в модели BLRB.

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ ЭКСПОЗИЦИИ С БЕТА-ЭНДОРФИНОМ НА СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ СПЛЕНОЦИТОВ И МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ

Баева Т.А., Гейн С.В.

ФБГНУ «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, Пермь, Россия

Бета-эндорфин (БЕ) – представитель эндогенной опиоидной системы, активно участвующий в регуляции функций иммунной системы. Это короткоживущее пептидное соединение, оказывающие непродолжительные биологические эффекты. Большой интерес представляет наличие у БЕ опосредованных, отсроченных по времени эффектов на функциональную активность клеток иммунной системы. Одним из механизмов опосредованных эффектов БЕ может являться модуляция продукции гормонов гипоталамо-гипофизарной оси, в частности, кортикостерона. **Целью** настоящего исследования являлось изучение влияния БЕ на уровни кортикостерона в плазме периферической крови мышей, секрецию IL-2, IL-4 и IFNγ мышиными спленоцитами, а также продукцию IL-1β и IL-10 перитонеальными макрофагами *in vivo* через 1 час и через 6 ч после введения пептида.

Материалы и методы. Исследования были выполнены на беспородных мышах-самцах массой 22-25 грамм. В экспериментах использовали БЕ (Skytek Laboratories, США), который вводили однократно внутрибрюшинно в дозах от 100 до 0,0005 мкг/кг массы животного. Животным контрольной группы вводили эквивалентный объем 0,9% NaCl. Одну половину животных выводили из эксперимента через 1 час, а вторую через 6 часов после введения БЕ. Выделение и культивирование спленоцитов и перитонеальных макрофагов осуществляли по стандартным методикам. Каждая культура содержала 1×10^6 клеток в 1 мл полной культуральной среды, которую готовили *ex tempore* на основе среды RPMI 1640 с добавлением 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина, меркаптоэтанола (10^{-3}M) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. В качестве митогена для спленоцитов использовали конканавалин А (КонА) в концентрации 20 мкг/мл, а для макрофагов – опсонизированный зимозан (ОЗ) в концентрации 150 мкг/мл. Культивирование осуществляли во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37 °С в течение 24 (для IL-2, IL-1β, IL-10) или 48 (для IFNγ и IL-4) часов. Концентрацию кортикостерона определяли методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческой тест-системы Enzo (США). Количественное определение цитокинов в супернатантах клеточных культур проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов для мышей по методике, предложенной производителем. Полученный материал обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа для непарных данных. Статистическую значимость раз-

личий между группами оценивали с помощью критерия наименьшей значимой разницы (LSD-тест) Фишера.

Результаты и обсуждение. Установлено, что BE угнетал продукцию про-(IL-1β) и противовоспалительных (IL-10) факторов, наиболее выражено – в нестимулированных культурах за 1 час до выведения животных из эксперимента. Так, введение BE за 1 час до выведения животных из эксперимента приводило к угнетению только спонтанной продукции IL-1β макрофагами в дозах 100, 0.01, 0.0005 мкг/кг. Аналогичный эффект пептид оказывал в отношении спонтанной секреции IL-10, активными оказались дозы 1 и 0, 01 мкг/кг. При введении пептида за 6 часов до забоя активность проявила дозировка 1 мкг/кг, которая приводила к угнетению продукции IL-1β и IL-10 в стимулированных культурах макрофагов. В культурах, стимулированных Кон А наблюдалось усиление продукции IL-4 – как через 1 ч, так и через 6 ч после инъекции BE. На спонтанную продукцию IL-4 спленоцитами BE не оказывал значимого влияния. В работе не было выявлено эффекта пептида на Кон А – индуцированную продукцию IL-2, независимо от времени введения. В то же время было зарегистрировано разнонаправленное влияние BE на уровни IL-2 в спонтанных культурах макрофагов: в группе животных, которым пептид вводили за 1 час до забоя, наблюдалось угнетение секреции IL-2, а через 6 ч после введения – стимуляция. Продукция IFNγ как в спонтанных, так и в стимулированных клеточных культурах статистически значимо не изменялась под воздействием BE. Было отмечено, что концентрация кортикостерона в плазме крови интактных мышей под воздействием BE не изменяется как в ранние, так и в поздние сроки после введения пептида, что, в свою очередь, свидетельствует об отсутствии опосредованности эффекта пептида через продукцию кортикостерона. Таким образом, BE играет важную роль в регуляции функций клеток адаптивного и врожденного иммунитета и, независимо от времени воздействия, усиливает продукцию спленоцитами IL-4, угнетает продукцию IL-1β и IL-10 макрофагами перитонеальной полости. С другой стороны, направленность эффектов BEa на секрецию IL-2 зависит от продолжительности действия пептида. Данные эффекты не связаны с изменением уровня кортикостерона в плазме крови экспериментальных животных.

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ В ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ NK-КЛЕТОК ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Баженов Д.О.[1], Соколов Д.И.[1, 2], Сельков С.А.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

NK-клетки являются ведущей популяцией иммунных клеток в зоне маточно-плацентарного барьера. Они обладают фенотипическими и физиологическими особенностями, поэтому их выделяют в отдельную субпопуляцию – децидуальных NK-клеток. Ряд данных указывает на то, что пул этих клеток формируется из NK-клеток периферической крови, которые мигрируют в зону маточно-плацентарного кровотока. Однако до сих пор остается малоизученным вопрос о том, какие факторы направляют миграцию NK-клеток.

Цель. Изучить миграцию NK-клеток через эндотелий в присутствии цитокинов и секреторных продуктов плацент (СПП) 1-го и 3-го триместров.

Материалы и методы. Клетки линии EA.hy 926 вносили в верхнюю камеру поликарбонатной вставки (диаметр пор 8 мкм) для 24-луночных планшетов, инкубировали 24 часа. Затем в верхнюю вносили NK-клетки линии NK-92MI. В нижнюю камеру вносили кондиционированные среды из-под плацент и цитокины: IL-10 (100 Е/мл), SDF-1 (100 Е/мл), инкубировали 24 часа. Затем NK-клетки из нижней и верхней камеры обрабатывали антителами к CD45. Абсолютный подсчет количества мигрировавших в нижнюю камеру NK-клеток измеряли на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (BD, США).

Результаты. Установлено, что цитокин IL-10 увеличивал количество мигрировавших NK-клеток через монослой эндотелия в 1,2 раза. Хемокин SDF-1 увеличивал количество мигрировавших клеток в 2.5 раза. В присутствии кондиционированных сред плацент 1-го и 3-го триместров количество мигрировавших NK-клеток снижалось в 2,2 и 1,9 раза соответственно.

Выводы. SDF-1 может выступать в качестве хемоаттрактанта для NK-клеток. IL-10, концентрация которого в зоне маточно-плацентарного контакта возрастает, также усиливает миграцию NK-клеток.

МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ И ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ТРАНЗИТОРНОМ НАРУШЕНИИ КРОВООБРАЩЕНИЯ СЕТЧАТКИ: ВОЗМОЖНОСТИ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ

Балацкая Н.В., Киселева Т.Н., Чудин А.В., Андрюшин А.Е.

ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Ретинальная ишемия – частая причина значительного снижения и потери зрения, развивающаяся на фоне сосудистых заболеваний (оптические нейропатии, окклюзии ретинальных сосудов, диабетическая ретинопатия, глаукома и т. д.). Транзиторные нарушения кровообращения глаза включают два периода – отсутствие кровотока (ишемия) и его восстановление (реперфузия), которые являются частью одного патологического процесса – ишемии-реперфузии (И/Р). Известно, что активные формы кислорода, образующиеся в результате И/Р, запускают каскад воспалительных иммуномедиаторов, миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, способствующих дальнейшему повреждению тканей. Поэтому фармакологическая модуляция реперфузии может улучшить функциональное состояние сетчатой оболочки и последующее клиническое течение. В настоящее время в качестве одного из возможных терапевтических агентов рассматривается антиоксидант ресвератрол, терапевтический эффект которого уже был продемонстрирован в ряде экспериментальных работ.

Цель. Анализ динамики маркеров повреждения нервной ткани и воспаления в раннем и позднем постишемическом периоде в ходе терапии ресвератролом при моделировании И/Р сетчатки в эксперименте.

Материалы и методы. Исследование проведено на 15 крысах (30 глаз) породы Wistar (в возрасте от 3 до 5 мес.) при общей (принятой в лабораторной практике), а также местной анестезии 0,4% р-ром оксибупрокаина. Моделирование односторонней И/Р сетчатки проводилось путем однократного субконъюнктивального введения в левый

глаз 0,2 мл 4*10-6 М раствора эндотелина-1фосфатном буфере (0,05 М, pH = 7,4 по ранее предложенному нами методу. Животных, которым моделировали одностороннюю И/Р, разделили на две группы: I-ю группу составили 5 крыс (10 глаз), II-ю – 5 животных (10 глаз), получавших ресвератрол с питьевой водой (сут. доза – 20 мг/кг) в течение 30 дней. III-я – контрольная группа включала 5 грызунов (10 глаз). Материалом иммунологического исследования служили образцы сыворотки крови (СК; n = 20) и тканевые гомогенаты комплекса сетчатка-хориоидея (ТК; n = 20) крыс. Содержание глиального кислого фибриллярного белка (GFAP), моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1) в тест – пробах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) помощью тест-систем, разработанных Cloud-CloneCorp. (США), произведенных USCN Life Science Inc. (КНР) на спектрофотометре – ридере для микропланшет Labsystems Multiskan® PLUS (Финляндия) при длине волны 450 нм.

Результаты. Анализ GFAP и MCP-1 представлен в таблице. В группе животных на 3 сутки ИР наблюдалось статистически значимое повышение уровня MCP-1 в ТК и СК ($p < 0,05$) с максимальным усилением воспалительного ответа к 7 суткам (повышение содержания в ТК в 5,5 раз ($p < 0,001$) и незначительным снижением концентрации цитокина к 30 суткам И/Р. Динамика GFAP в системном кровотоке была аналогична таковой MCP-1 и свидетельствовала о повышении проницаемости гематоофтальмического барьера, а выявленные повышенные концентрации GFAP соответствовали данным исследований апоптоза, указывали на деструктивные процессы в нервной ткани. Применение ресвератрола в суточной дозе 20 мг/кг в течение во II группе грызунов способствовало снижению уровня маркёра воспаления MCP-1 в ТК и концентрации GFAP в СК в раннем и позднем постишемическом периоде ($p < 0,05$).

Выводы. Данные исследования динамики маркеров повреждения нервной ткани и воспаления GFAP и MCP-1 в раннем и позднем постишемическом периодах в ходе терапии ресвератролом демонстрируют защитные и противовоспалительные свойства антиоксиданта в отношении тканей глаза (ретинопротекторные, нейропотекторные) при моделировании И/Р в эксперименте у крыс.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СИНТЕЗ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* 3 СЕРОТИПА

Барановская С.А., Токарская М.М., Елкина С.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАН, Москва, Россия

Для профилактики пневмококковой инфекции применяют конъюгированные пневмококковые вакцины, созданные на основе капсульного полисахарида (КПС). Поскольку серотиповой пейзаж *S. pneumoniae* на различных территориях отличается, то при разработке современных иммунобиологических препаратов необходимо учитывать данные эпидемиологических исследований. Известно, что 3 серотип пневмококка был актуален для территории нашей страны с начала изучения серотипового пейзажа, и до сих пор его наиболее часто (до 18% случаев) высевают при острых средних отитах, самой распространенной форме пневмококковой инфекции у детей до 5 лет (Харит С.М. и соавт., 2011). Качество препаратов, на основе которых будут в дальнейшем созданы иммунобиологические препараты, является ключевым моментом, поскольку от него зависит протективный эффект вакцин. Так как КПС получают из культуральной жидкости, то необходимо, чтобы питательная среда обеспечивала максимальную скорость роста и высокий уровень синтеза КПС, а также не содержала продукты животного происхождения и высокомолекулярные соединения, которые осложняют очистку КПС. Поэтому **целью** данного исследования являлась оценка накопления КПС штаммом *S. pneumoniae* 3 серотипа при выращивании в полусинтетических питательных средах, различного состава. Для достижения данной цели поставлены был подобран состав питательной среды, обеспечивающий высокий выход КПС, определена динамика роста штамма и накопление им КПС.

В работе использовали штамм *S. pneumoniae* серотипа 3 (№ 10196), предоставленный лабораторией микробиологии НЦЗД МЗ РФ. В ранее проведенных исследованиях показано, что данный штамм является продуцентом КПС. Посевную культуру выращивали в течение 16 часов при 37 °С на плотной питательной среде с 5% CO_2. В ка-

ТАБЛИЦА. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИНАМИКА GFAP И MCP-1 ТК И СК У КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ И/Р: БЕЗ ПРИЕМА (I ГРУППА), НА ФОНЕ ПРИЕМА РЕСВЕРАТРОЛА (II ГРУППА) И ГРУППЫ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ (M±m) (К ТЕЗИСАМ БАЛАЦКОЙ Н.В. И ДР.)

Группы	Показатели	Срок наблюдения		
		3 суток	7 суток	30 суток
I (И/Р; n = 5)	MCP-1 (ng/mL) ТК	0,317±0,005*	1,73±0,16*	0,75±0,09*
	СК	0,404±0,06*	0,32±0,01	0,332±0,01
	GFAP (pg/mL) СК	334,12±190,4	810,9±269,3*	720,5±29,8*
II (И/Р + ресвератрол; n = 5)	MCP-1 (ng/mL) ТК	0,303±0,004**	0,31±0,02**	0,34±0,002**
	СК	0,33±0,013**	0,31±0,04	0,339±0,005
	GFAP (pg/mL) СК	27,56±5,4**	112,6±28,4**	96,33±37,4**
III (контрольная; n = 10)	MCP-1 (ТК ng/mL)	0,30±0,002		
	СК	0,31±0,005		
	GFAP (pg/mL) СК	267,9±27,2		

Примечание. n – количество тест-проб; *- достоверно относительно показателей контрольной группы; ** – достоверно относительно I-й группы (* ** – $p < 0,05$).

честве солевой основы использовали среду Ледерберга. В качестве источника аминокислот применяли: аминопептид, панкреатический пептон казеиновый, кислотный гидролизат казеина, а также соевый пептон. Глюкозу и минеральные соли стерилизовали при 1 атмосфере в течение 30 минут. Витамины стерилизовали фильтрованием. Культивирование штамма проводилось в бактериологических пробирках, содержащих по 30 мл питательной среды. В каждую пробирку засевали 0,2 мл посевной культуры. Выращивание осуществляли в течение 24 и 96 часов при температуре 37 °С в термостате с 5% подачей CO_2. Посевные дозы составили 1,1 и 0,67 млрд/мл соответственно. Для определения динамики роста штамма и накопления им КПС проводили культивирование в ферментере объемом 10 л. Посевная доза составила 0,125 млрд/мл. Каждый час в течение 16 часов, а также спустя 24 часа проводили контроль оптической плотности и измерение pH. Накопление КПС оценивали при помощи ракетного иммуноэлектрофореза формалинизированных проб культуральной жидкости. В качестве референс-препарата использовали очищенный КПС.

Проведенные исследования показали, что наиболее высокий уровень КПС наблюдался при щелочном значении pH в тех питательных средах, в которых источниками являлись пептоны (среда с соевым пептоном – концентрация КПС от 20,1±2,5 до 28,0±4,3 мкг/мл; среда с казеиновым пептоном – от 16,8±2,1 до 26,4±5,3 мкг/мл) независимо от длительности культивирования. При выращивании в средах, содержащих другие источники белка, было выявлено незначительное накопление КПС (среда с кислотным гидролизатом казеина – от 2,4±0,8 до 7,8±1,5 мкг/мл; с аминопептидом – от 1,8±0,8 до 6,5±1,5 мкг/мл). Схожие данные были получены при выращивании в средах с пониженным значением pH. Вместе с тем выявлено, что выраженную продукцию КПС позволило получить использование в качестве источника аминокислот аминопептида (10,4±1,3 мкг/мл). Вероятно, наблюдавшееся спустя 96 часов снижение уровня КПС по сравнению с результатами через 24 часа произошло в результате действия ферментов *S. pneumoniae*, либо является следствием более низкой посевной дозы. При выращивании штамма в ферментере с использованием полусинтетической среды, содержащей соевый пептон, содержание КПС спустя 24 часа составило около 160 мкг/мл.

Таким образом, выращивание *S. pneumoniae* сер.3 в ферментере в течение 24 часов в полусинтетической питательной среде, содержащей соевый пептон, позволяет получить КПС в концентрации 22 мкг/мл.

ВКЛАД ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В РЕГЕНЕРАТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ПРОДУЦИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ МИКРОВЕЗИКУЛЯРНЫХ ЧАСТИЦ

Белогородцев С.Н., Кащенко Э.А., Селедцова Г.В.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Исследования последних лет показали, что цитопротективное действие мезенхимальных стромальных клеток (МСК) обусловлено не процессами их хоминга и дифференцировки, а стимуляцией эндогенной регенерации резидентных клеток. Одним из механизмов подобного действия, кроме секреции цитокинов и факторов роста, могут быть микровезикулярные частицы (МВ), которые осуществляют транспорт мРНК, микроРНК и сигнальных белков.

Цель. Изучить прорегенераторные свойства МВ, продуцируемых МСК и возможное участие в этом иммунной системы.

МСК получали из костного мозга лабораторных мышей путем прилипания к культуральному пластику. Для получения МВ, МСК подвергали апоптозу путем культивирования в условиях депривации кислорода и в бессывороточной среде в течение 1 суток. МВ получали из культуральной среды апоптотических клеток после предварительного удаления клеточного дебриса и последущем центрифугировании при 100 000 g в течение 60 минут. Для стандартизации суспензии МВ определяли содержание белка по методу Брэдфорда.

Для исследования влияние МВ на регенерацию тубулярного почечного эпителия *in vivo* у линейных мышей путем внутримышечного введения 50% глицерола была индуцирована острая почечная недостаточнось (ОПН). МСК или МВ вводили в внтривенно через 24 часа после индуцирования ОПН. Животные были разделены на 3 группы: ОПН-контроль, ОПН+МСК, ОПН+МВ.

Почечные эпителиоциты и спленоциты получали из гомогенатов соответствующих органов. Суспензию клеток почки пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм, что позволяло избавиться от гломерул и клеточных агрегатов, и культивировали в течение 2-х недель, что позволяло получить гомогенную популяцию клеток.

После индукции ОПН, уровень мочевины плазмы крови повышался у мышей на 4-е сутки в контрольной группе в 2 раза (12,43 мкг/мл против 6,59 мкг/мл у интактных мышей) и снижался к 8-м суткам до 9,64 мкг/мл. Использование МСК и МВ приводило практически к одинаковому результату: на 4-е сутки уровень мочевины составил 9,3 и 9,37 мкг/мл соответственно, что на 25% ниже, чем в глицерол-контроле. К 8-м суткам уровень мочевины составил 7,9 мкг/мл после введения МСК и 7,6 мкг/мл после введения МВ, что на 21% ниже, чем в глицерол-контроле.

Уровень пролиферации спленоцитов в тесте с H^3-тимидином составил 118 имп/мин, Кон А-стимулированная пролиферация составила 1208 им/мин. Культивирование в присутствии МВ в дозе 10 мкг/мл повышало пролиферативную способность спленоцитов почти в 3 раза (342 имп/мин – спонтанная, 3889 имп/мин – Кон А-стимулированная). Стимулирующий эффект на пролиферацию повышался, хоть и не пропорционально) с увеличение дозы МВ: 475 имп/мин – спонтанная и 4667 имп/мин – Кон А-стимулированная при добавлении МВ в дозе 30 мкг/мл; 492 имп/мин – спонтанная и 5012 имп/мин – Кон А-стимулированная при добавлении МВ в дозе 90 мкг/мл.

Аналогичный эффект наблюдался в отношении ПЭ. Добавление МВ в культуральную среду на 3 суток в дозе 10 мкг/мл повышало пролиферацию ПЭ в 4 раза (254 имп/мин против 65 имп/мин в контроле). Увеличение дозы МВ также повышало пролиферацию ПЭ: 337 имп/мин при дозе МВ 30 мкг/мл и 392 имп/мин при дозе МВ 90 мкг/мл.

Влияние МВ на апоптогенное действие доксирубицина на спленоциты определяли в тесте с окраской пропидум иодидом. При этом использовали спленоциты как от интактных мышей, так и от мышей с глицерол-индуцированной ОПН. Интересно, что сама по себе индук-

ция ОПН вызывает уменьшение количества апотозных спленоцитов почти в 2 раза (16,3% против 29,17% у интактных мышей). Добавление МВ вызывает снижение уровня апоптоза как у интактных мышей (21,73%), так и мышей с ОПН (13,28%). Соответственно, обратно пропорционально увеличивался процент клеток, находящихся в S/M фазе клеточного цикла.

Полученные в результате эксперимента *in vivo* результаты показали, что внутривенное введение как МСК, так и МВ, продуцируемых МСК, в одинаковой степени приводит к более раннему восстановлению выделительной функции почек после глицерол-индуцированной ОПН. Это говорит о том, что про-регенераторное действие МСК в значительной степени, если не полностью, обусловлено продуцируемыми ими микровезикулярными частицами. Указанное действие МВ подтверждается результатами *in vitro* – продуцируемые МСК микровезикулярные частицы усиливали пролиферацию ПЭ, причем при увеличении дозы МВ это влияние усиливалось. Аналогичное действие МВ оказывают на клетки иммунной системы: *in vitro* отмечается дозозависимое усиление пролиферции спленоцитов и увеличение их устойчивости к влиянию апоптогенных факторов. Таким образом, продуцируемые МСК микровезикулярные частицы оказывают иммуностимулирующее действие. Этот результат противоречит литературным данным, что при ОПН, независимо от генеза, наблюдается активация иммунной системы, приводящая к усилению повреждения и про-регенераторное действие МСК обусловлено их иммуносупрессорным действием. Указанные результаты требуют дальнейших исследований о влиянии МВ на функции иммунной системы *in vivo*.

ВЛИЯНИЕ NK-КЛЕТОК НА АНГИОГЕНЕЗ В ПРИСУТСТВИИ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

Белякова К.Л.[1], Шевелева А.Р.[1], Сельков С.А.[1], Соколов Д.И.[1, 2]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Физиологическое функционирование органов и тканей организма невозможно без адекватного снабжения их кислородом, питательными веществами и удаления из них продуктов обмена, которое осуществляется при помощи разветвленной сети кровеносных сосудов. Формирование сосудов является важнейшим процессом, протекающим в организме человека, каждый этап которого зависит от характера взаимодействия эндотелиальных клеток (ЭК) с клетками микроокружения, а также от баланса между стимуляторами и ингибиторами ангиогенеза, основными источниками которых являются клетки иммунной системы. Естественные киллеры – важнейшая популяция клеток иммунной системы, обладающая цитотоксическими функциями и участвующая в защите организма от вирусов и трансформированных клеток. Помимо этого, естественные киллеры являются источниками различных цитокинов и факторов роста, которые могут оказывать влияние на ангиогенез. В связи с этим изучение взаимодействий эндотелиальных клеток и естественных киллеров является актуальной задачей современной биологии и медицины.

Цель. Изучить влияния естественных киллеров на формирование капилляроподобных структур ЭК в присутствии фактора роста эндотелия сосудов.

Материалы и методы. В работе использовали ЭК линии EA.Hy926 и естественные киллеры линии NK-92mi. В лунки 24-луночного планшета с трехмерным матриксом Matrigel (BD, США) вносили ЭК, к части лунок добавляли клетки линии NK-92mi либо непосредственно в лунку к ЭК (контактное культивирование), либо в поликарбонатную вставку с диаметром пор 0,1 мкм (дистантное культивирование), инкубировали в течение 24 часов. Для активации клеток использовали VEGF в различных концентрациях. При помощи микроскопа AxioObserver.Z1 и компьютерной системы анализа изображений оценивали длину и количество образованных капилляроподобых структур.

Результаты. Установлено, что при контактном и дистантном культивировании ЭК с NK-клетками как в присутствии VEGF, так и в его отсутствие наблюдали увеличение длины и снижение количества капилляроподобных структур по сравнению с монокультивированием ЭК. Количество тяжей снижалось при контактном культивировании ЭК с NK-клетками в присутствии VEGF в концентрации 100 нг/мл по сравнению с контактным культивированием ЭК с NK-клетками без VEGF. При дистантном культивировании ЭК с NK-клетками отмечали снижение длины капилляроподобных структур как в присутствии, так и в отсутствие VEGF по сравнению с контактным культивированием ЭК с NK-клетками. При дистантном культивировании ЭК с NK-клетками в присутствии VEGF в концентрации 1 нг/мл наблюдали снижение длины и увеличение количества клеточных тяжей по сравнению с контактным культивированием ЭК с NK-клетками в присутствии VEGF в той же концентрации. При дистантном культивировании ЭК с NK-клетками в присутствии VEGF наблюдали дозозависимое увеличение длины клеточных тяжей по сравнению с дистантным культивированием ЭК с NK-клетками без VEGF.

Вывод. Естественные киллеры за счет секреторной активности и контактного взаимодействия с ЭК влияют на формирование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками.

МОДУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕМЕНТА АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ ЖИВОТНЫХ

Берлов М.Н.[1, 2], Умнякова Е.С.[1], Кокряков В.Н.[1, 2]

[1] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Неконтролируемая или избыточная активация системы комплемента вносит существенный вклад в патогенез многочисленных заболеваний. Отсутствие доступных терапевтических средств, направленных на регуляцию комплемента, представляет собой серьезную медицинскую проблему. В настоящее время в клиническую практику внедрены всего два ингибитора комплемента, относящихся к числу наиболее дорогих лекарстве в мире. В качестве возможного источника новых более дешевых лекарственных средств, модулирующих актив-

ность комплемента, могут рассматриваться катионные антимикробные пептиды (АМП) животных, включая как пептиды млекопитающих, для которых регуляция комплемента может быть одной из физиологических функций, так и структурно сходные с ними пептиды беспозвоночных. Согласно литературным данным, некоторые АМП (дефенсины, тахиплезин) способны формировать межмолекулярный комплекс с белком C1q и влиять на уровень активации комплемента.

Цель и задачи. Изучение способности ряда АМП млекопитающих и беспозвоночных животных формировать комплекс с белком C1q и оказывать влияние на активацию комплемента.

Материалы и методы. Комплексы АМП с C1q выявляли с использованием специфических антител к C1q либо C1q, конъюгированного с пероксидазой, а также методом поверхностного плазмонного резонанса. Активацию комплемента оценивали по лизису сенсибилизированных антителами эритроцитов барана. Активность С3-конвертаз оценивали по уровню С3а, определяемому методом иммуноферментного анализа. Антимикробную активность дефенсинов оценивали методом подсчета колоний.

Результаты. Показано формирование комплексов с C1q для ряда исследованных пептидов: α-дефенсин HNP-1 и β-дефенсин HBD-2 человека, протегрин-1 свиньи, ареницин-1 пескожила *Arenicola marina*, тахиплезин-1 мечехвоста *Tachypleus tridentatus*. Интересно отметить, что все перечисленные пептиды характеризуются доминированием β-структуры в молекуле. Пептиды с иной структурной организацией (α-спиальный LL-37 и полипролиновый профенин) не проявляют способности к взаимодействию с C1q. Полученные данные позволяют предполагать наличие в молекуле C1q множественных сайтов связывания β-структурных АМП различной аффинности.

Характер влияния АМП на активацию комплемента проявляет зависимость от природы пептида. При оценке активации комплемента по лизису сенсибилизированных эритроцитов барана дефенсины HNP-1-3 и ареницин демонстрируют ингибирующую активность. В то же время тахиплезин, пептид, проявляющий высокую степень гомологии с ареницином по первичной структуре, действует противоположным образом, усиливая активацию комплемента. Наблюдаемые эффекты подтверждаются и на уровне генерации С3а в соответствующих пробах (в присутствии дефенсинов и ареницина его концентрация достоверно меньше, а в присутствии тахиплезина – достоверно больше, чем в контрольных пробах). Таким образом, изученные АМП действуют на активацию комплемента на ранних стадиях, не позднее уровня С3-конвертазы. Учитывая способность данных пептидов взаимодействовать с белком C1q, можно предположить, что они в первую очередь оказывают влияние на функционирование комплекса C1. Интересно отметить, что в комплексе C1q-АМП влияние на функциональные свойства может быть взаимным. Нами показано, что в присутствии C1q (но не контрольного белка овальбумина) минимальная ингибирующая концентрация дефенсинов в отношении бактерии *Listeria monocytogenes* возрастает.

Заключение. Полученные данные позволяют рассматривать β-структурные АМП животных в качестве перспективных молекул для создания на их основе терапевтических средств для направленного воздействия на систему комплемента на уровне компонента C1.

Работа поддержана грантами РФФИ № 15-04-06471а и №16-34-00136 мол_а.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ГЕМОГЛОБИНА КОСТНОГО МОЗГА И СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОРГАНИЗМ

Бриллиант С.А., Юшков Б.Г.

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия
Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

В последние десятилетия ученые активно занимаются исследованиями в области изучения влияния экстремальных факторов на изменение соотношения изоформ гемоглобина в периферической крови. Следует отметить, что, помимо изменений белковых изоформ системы крови, немаловажную роль играют в процессе адаптации и модификации белковых фракций гемоглобина в костном мозге. Для этого необходимо понимание физиологического значения гетерогенности гемоглобина крови (ПК) и костного мозга (КМ), а также роли отдельных изоформ в компенсаторно-приспособительных реакциях организма в условиях экстремальных воздействий.

В связи с этим **цель** данного исследования – изучение гетерогенности белковых фракций гемоглобина костного мозга крыс при острой массивной кровопотере и иммобилизационном стрессе.

Материалы и методы. Острую массивную кровопотерю (ОМК) осуществляли из расчета 2,5% от массы тела животного. В качестве стрессорного фактора применяли предложенную H. Selye модель нервно-мышечного напряжения (иммобилизация животных на операционном столике на спине) в течение 6 часов однократно. Животные были поделены на 5 групп: 1 группа – интактные животные (n = 12). Животных 2-ой (n = 10) и 3-ей групп (n = 10) забивали спустя 6 ч и 2 сут. после ОМК. Животных 4-ой (n = 10) и 5-ой групп (n = 10) забивали спустя 6 ч и 2 сут. после иммобилизации.

Для определения соотношения между фракциями гемоглобина использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле по Г. Мауреру. Статистическую обработку данных проводили в программе «Statistica 6.0».

Результаты. Анализ данных показал, что у интактной группы животных общее содержание гемоглобина в КМ – 8,01 г/л и ПК- 135,6 г/л.

После кровопотери в костном мозге спустя 6 ч наблюдается увеличение 2,4,5 и 6 изоформ гемоглобина за счет снижения 1 и 3. Данная динамика продолжается и на более поздний срок после воздействия (2 сут.) за счет увеличения 1,4, 5 и 6 белковых фракций костного мозга. В периферической крови лишь на 2 сут. отмечается увеличение 1, 5 и 6 изоформ.

В условиях иммобилизации происходит изменение соотношения отдельных белковых фракций гемоглобина в костном мозге и периферической крови крыс. В КМ наблюдается понижение 1, 2 белковых фракций на ряду с повышением 3, 4 изоформ гемоглобина. 5 белковая фракция в костном мозге падает, так же как и в ПК. Однако 6 белковая фракция гемоглобина достоверно увеличивается на 6 ч после воздействия в сравнении с интактной группой как в КМ, так и ПК.

Рассматривая динамику изменения гемоглобинового профиля костного мозга и периферической крови после иммобилизации, было установлено, что доминирующими фракциями остаются 3 и 4 на фоне снижения 1 и 2 белковых изоформ.

Выводы. Изменения гемоглобинового профиля костного мозга и системы крови при действии на организм острой массивной кровопотери и иммобилизации обусловлены качественной перестройкой эритропоэза. Острая массивная кровопотеря и иммобилизационный стресс вызывают увеличение интенсивности эритропоэза на поздние сроки после воздействия, которое сопровождается возрастанием числа молодых эритроцитов и незрелых форм (ретикулоцитов).

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В ЛОКАЛЬНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ОСТРОВКОВОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Булавинцева Т.С.[1, 2], Данилова И.Г.[1, 2]

[1] Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия
[2] Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Введение. Инсулинозависимый сахарный диабет (СД1) является аутоиммунным заболеванием, которое сопровождается разрушением β-клеток островков Лангерганса и развитием абсолютного дефицита инсулина. Макрофагам, локализованным в поджелудочной железе, принадлежит центральная роль, как в поддержке воспалительной реакции, так и в регуляции регенерации. Основными факторами, обеспечивающими эти два процесса, являются цитокины, локально выделяющиеся клетками моноцитарно-макрофагального ряда в очаг повреждения (Gusdon A.M., Corbett J.A., Mathews C.E., 2006).

Цель. Оценить секреторную активность макрофагов в поджелудочной железе и ее влияние на пролиферацию β-клеток в течении СД 1.

Материалы и методы. Исследование проведено на половозрелых крысах – самцах Wistar. Аллоксановый диабет был вызван путем введения раствора аллоксана в дозе 30 мг/100г (Danilova I.G. et al., 2015). Через 30 дней после первой инъекции аллоксана животные получали лечение иммунномодулятором (дериваты аминофталгидрозида) в течение 30 дней по схеме (Jukic T., Abidov M., Ihan A., 2011). В крови животных определяли уровень глюкозы, гликозилированного гемоглобина (HbA1c) и инсулина. В микропрепаратах поджелудочной железы с помощью иммуногистохимического исследования проведена оценка количества β-клеток, Ki-67$^+$β-клеток, макрофагов (CD68) а также особенности их локализации. В гомогенате поджелудочной железы путем иммуноферментного анализа определялось содержание основных макрофагальных цитокинов – IL-1α, IL-6, IL-10.

Результаты. В периферической крови группы животных с аллоксановым диабетом были отмечены гипергликемия, повышение уровня Hb A1c, уменьшение содержание инсулина. В поджелудочной железе выявлено снижение общего количества инсулин-синтезирующих клеток более чем в 10 раз, а пролиферативная активность β-клеток (Ki-67$^+$β-клеток) уменьшалась в 2 раза. Количество CD68$^+$ клеток возрастало в 9 раз относительно интактных животных, что сопровождалось значительным увеличением количества провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-1α, IL-6). Компенсаторно возрастал уровень IL-10 в железе.

Модуляция функциональной активности макрофагов на фоне аллоксанового диабета способствовала снижению уровня глюкозы, нормализации Hb A1c и увеличению концентрации инсулина в периферической крови. Содержание β-клеток в поджелудочной железе увеличилось в 3 раза по сравнению с контрольными животными с аллоксановым диабетом, а количество Ki-67$^+$β-клеток соответствовало уровню интактных крыс. Макрофаги локализовались преимущественно возле островков, а их число уменьшалось в 3 раза. Данный факт отразился и на содержании цитокинов в поджелудочной железе. Уровень IL-1α снижался в 2 раза, а IL-6 в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой животных, а содержание IL-10 соответствовало показателям интактных крыс.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования выявлена зависимость между содержанием макрофагов инфильтрирующих островки Лангерганса, уровнем провоспалительных цитокинов в поджелудочной железе и пролиферативной активностью β-клеток в островке. Модуляция макрофагов, с одной стороны, обеспечивала снижение альтерации за счет уменьшения содержания «медиаторов воспаления», а с другой – стимуляцию пролиферации и функциональной активности β-клеток островкового аппарата. Сочетание этих процессов способствует повышению уровня инсулина в крови и частичного уменьшения гипергликемии. Полученные результаты представляют несомненный интерес с позиций раскрытия механизмов регуляции регенераторных процессов при развитии СД1 и имеют непосредственное отношение к решению задач клинической практики.

Исследование поддержано грантом РНФ № 16-15-00039.

КОРРЕКЦИЯ АДАПТИВНЫХ И ВРОЖДЕННЫХ ФОРМ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ОСТРОМ ДЕСТРУКТИВНОМ ПАНКРЕАТИТЕ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Бушмина О.Н., Локтионова А.В., Долгарева С.А., Литвинова Е.С., Локтионов А.Л.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Актуальность дальнейшего изучения деструктивных форм острого алкогольного панкреатита не вызывает сомнения, поскольку характеризуется максимально высокой летальностью и наибольшим числом осложнений. Это связано с объективными трудностями диагностики и выбора обоснованной лечебной тактики. Недостаточно ясен вопрос о сроках и методах проведения иммунореабилитации при остром деструктивном панкреатите (ОДП), развивающимся на фоне хронической алкогольной интоксикации (ХАИ).

Цель и задачи. Оценка фармакологической эффективности различных сочетаний иммуномодуляторов, антиоксидантов и мембранопротекторов в коррекции врожденных и адаптивных форм иммунного ответа при экспериментальном остром деструктивном панкреатите на фоне хронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы. В исследовании использовано 189 крыс Вистар средней массой 150 г с соблюдением

всех принципов работы с лабораторными животными. ХАИ моделировали 30- или 60-кратным (ХАИ-30 и ХАИ-60), через 24 часа, внутрижелудочным введением 20% раствора этанола, соответственно, в дозах 3 и 2 мл/кг. Экспериментальный ОДП моделировали на 25 и 55 день, соответственно, от первого введения этанола путем перевязки протоков левой и правой долей поджелудочной железы и трехкратной через 60 мин стимуляцией прозерином в дозе 0,2 мг/кг. Экспериментальных животных с ОДП и ХАИ-30 делили на 3 равные части: 1-я группа фармакотерапию не получала; во 2-й группе вводили гепон (5 мг/кг внутрь через 24 часа, № 14), гипоксен (750 мг/кг внутрь в 1% крахмальной суспензии, № 14) и фосфоглив (800 мг/кг, внутрь в 1% крахмальной суспензии, № 14); в 3-й группе вводили глутоксим (20 мг/кг внутримышечно через 24 часа, № 5), мексидол (50 мг/кг внутрибрюшинно через 24 часа, № 5) и гептрал (760 мг/кг внутрибрюшинно через 24 часа, № 5). При ОДП на фоне ХАИ-60 одна часть животных получала только этанол, вторая – сочетание глутоксима, мексидола и гептрала. Забой крыс осуществляли через 24 часа после последнего введения этанола и препаратов. В качестве контроля использовали 15 животных без внешних признаков заболеваний. Формирование гуморального иммунного ответа оценивали на пятые сутки после иммунизации путем определения в селезенке числа АОК адаптивных форм иммунного ответа оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК). Гиперчувствительность замедленного типа оценивали по разнице масс регионарного и контрлатерального лимфатических узлов (РМ) и по разнице количества в них кариоцитов (РК) после введения разрешающей дозы антигена. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови оценивалась по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному числу (ФЧ) и индексу активности фагоцитоза (ИАФ). Кислородзависимую активность оценивали по НСТ-тестам, спонтанному (НСТ-сп.) и стимулированному опсонизированным и неопсонизированным зимозаном (НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з), коэффициентам активации на опсонизированный и неопсонизированный зимозан, коэффициент опсонизации (Кан, КАо, КО).

Результаты. У крыс с моделируемым ОДП на фоне ХАИ-30, в большей степени при ХАИ-60, установлено по сравнению со здоровыми животными снижение количества иммунных АОК в селезенке, РМ, РК, выраженное снижение числа фагоцитирующих клеток и поглощенных ими частиц, повышение метаболической активности нейтрофилов в НСТ-сп., НСТ-ст. о/з и н/з тестах. Однако резервы кислородзависимой активности фагоцитов (КАо, КАн и КО) снижались. Введение комбинации препаратов гепон, гипоксен и фосфоглива крысам с ОДП в сочетании с 30-дневной ХАИ корригировало, но не до нормы формирование адаптивных форм иммунного ответа (АОК и РМ), ФП, ФЧ, ИАФ, НСТ-сп. и НСТ-ст. о/з и н/з, еще более значимо КАн и КО. Использование сочетания глутоксима, мексидола и гептрала нормализовало число иммунных АОК в селезенке экспериментальных животных, ФЧ, НСТ-ст. о/з и н/з, КАн, КО, корригировало, но не до контрольной группы РМ, РК, ФП, ИАФ, НСТ-сп., КАо. Использование глутоксима, мексидола и гептрала в условиях ОДП и ХАИ-60 корригировало уровень АОК, РМ, РК, фагоцитарную активность нейтрофилов, НСТ-сп. и НСТ-ст. о/з и н/з, КАн, но не влияло на сниженные КАо и КО.

Заключение. Таким образом, более эффективным сочетанием в коррекции адаптивных и врожденных форм иммунного ответа при ОДП, моделируемом на фоне ХАИ, оказалось сочетание глутоксима, мексидола и гептрала.

АНАЛИЗ КЛОНАЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНОВ ИММУНОГЛОБУЛИНА ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ ЕДИНИЧНЫХ В-ЛИМФОЦИТОВ

Бязрова М.Г.[1, 2], Лушова А.А.[2], Садыкова Г.К.[3], Прилипов А.Г.[3]

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Государственный научный центр "Институт иммунологии"» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия
[3] ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Известны несколько некомбинаторных стратегий получения антигенспецифических моноклональных антител. К ним относятся гибридомная технология, иммортализация В-лимфоцитов вирусом EBV, а также создание моноклональных антител путем секвенирования генов иммуноглобулина методом NGS из пула клеток или стандартного секвенирования из единичных В-лимфоцитов. Последний метод имеет ряд преимуществ при выявлении редких клонотипов и в настоящее время активно разрабатывается. Метод состоит из следующих этапов: выявление и выделение антигенспецифических В-лимфоцитов, выделение мРНК из единичных клеток, секвенирование генов иммуноглобулина с последующей экспрессией в клетках-продуцентах. Каждый из отмеченных этапов представляет определенные трудности и требует оптимизации. Сложность метода связана с незначительным количеством мРНК, содержащейся в единичном В-лимфоците.

Цель. Создание человеческих терапевтических моноклональных антител против вируса клещевого энцефалита.

Задача работы состояла в отработке отдельных этапов технологии секвенирования генов иммуноглобулинов из единичных В-лимфоцитов: получение конъюгатов антител, необходимых для многоцветного окрашивания клеток; сортировка субпопуляции активированных В-лимфоцитов; амплификация и секвенирование генов Ig из единичных клеток.

Объекты исследования: лимфоциты периферической крови и костного мозга человека.

Методы. Обогащение лимфоцитов методом магнитной сепарации, проточная цитометрия, гнездовая ПЦР и секвенирование методом Сэнгера.

Результаты. Для окрашивания клеток использовали следующие комбинации антител: IgG-FITC/CD19-PE, CD19-FITC/CD27-PE, CD38-FITC/CD27-PE, а также CD19-FITC/CD38-PE/CD27-PE-Cy5.5. В препаратах лимфоцитов периферической крови и костного мозга человека были определены субпопуляции В-лимфоцитов: $CD19^+IgG^+$, $CD19^+CD27^+$, $CD19^+CD38^+$, $CD19^+CD27^+CD38^+$.

Популяции $CD19^+IgG^+$, $CD19^+CD27^+$, $CD27^+CD38^+$ и $CD27^+CD38^+CD3^-CD16^-$ были отсортированы и разнесены по одной клетке в пробирки для ПЦР. Далее была проведена реакция обратной транскрипции с последующей амплификацией генов иммуноглобулина с помощью гнездовой ПЦР. Полученные ПЦР-фрагменты секвени-

ровали методом Сэнгера, при этом были получены отдельные сиквенсы генов иммуноглобулинов.

Выводы. Были отработаны некоторые этапы технологии получения человеческих моноклональных антител путем секвенирования генов иммуноглобулина из единичных клеток.

ГАЛЕКТИН-3 МОДУЛИРУЕТ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ Th-ЛИМФОЦИТАМИ *IN VITRO*

Васильева О.А., Прохоренко Т.С., Зима А.П., Новицкий В.В.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Томск, Россия

Введение. Галектин-3 функционирует как экстрацеллюлярная регуляторная молекула и принимает участие в активации различных типов клеток, таких как моноциты, макрофаги, тучные клетки, нейтрофилы и лимфоциты.

Цель. Оценить влияние рекомбинантного галектина-3 на продукцию профильных цитокинов Th-лимфоцитами здоровых доноров *in vitro*.

Материалы и методы. Исследование проведено на лимфоцитах, выделенных методом градиентного центрифугирования из крови здоровых доноров (n = 25), с дальнейшим культивированием в течение 72 ч в питательной среде с добавлением рекомбинантного галектина-3 в дозах 0,5 и 1 мкг/мл (R&D, США). Для создания *in vitro* условий, близких к естественным, использовали моноклональные активирующие антитела – анти-CD3/анти-CD28 (BD Pharmingen™, США). За 4 ч до окончания инкубации к клеткам добавляли стимуляторы синтеза цитокинов ФМА (50 нг/мл) и кальция иономицин (1 мкг/мл). Определение уровня продукции интерлейкинов (IL) 17A, IL-10, интерферона (IFN) γ и IL-13, IL-22, TGF-β_1, TNFα в культуральных супернатантах осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич» согласно протоколам фирмы-производителя (R&D, США).

Результаты. Установлено, что при действии галектина-3 на лимфоциты здоровых доноров концентрация Th1-цитокинов – IFNγ и TNFα – достоверно увеличивалась относительно соответствующих значений в контрольной группе. Стимулирующее влияние отмечалось при исследовании влияния галектина-3 на продукцию IL-13, свойственного Th2-лимфоцитам. При анализе влияния галектина-3 на Th-17 лимфоциты регистрировалось статистически значимое повышение концентрации профильных цитокинов – IL-17A и IL-22 (при дозе галектина-3 0,5 мкг/мл). Увеличение дозы данного лектина до 1 мкг/мл приводило к снижению концентрации IL-17 и IL-22 относительно значений соответствующих показателей в культуре с меньшей концентрацией галектина-3 и было достоверно ниже значений в контрольной группе (только для IL-17). Влияние галектина-3 на функциональную активность субпопуляции Т-регуляторных лимфоцитов проводили путем анализа продукции IL-10 и TGF-β_1. В результате экспериментов наблюдалось достоверное уменьшение концентрации IL10 и TGF-β_1 относительно значений данных показателей в группе контроля.

Заключение. Проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что влияние рекомбинантного галектина-3 является дозозависимым, и с увеличением его концентрации до 1 мкг/мл степень стимулирующего влияния на Th-лимфоциты становится менее выраженной, и преобладает ингибирующее действие на лимфоциты, что может быть обусловлено активацией апоптотической гибели клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (№ НШ-7906.2016.7, МД-3455.2017.7).

Breg ПРИ ГУМОРАЛЬНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ

Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Снегирева Н.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. В последние годы выяснилось, что В-клетки, также как и Т-лимфоциты, обладают регуляторными функциями. В основном их роль сводится к угнетению воспалительных и аутоиммунных процессов. Влияние регуляторных В-клеток (Breg) на патологические процессы, главным образом, обусловлено синтезируемым ими IL-10. Основным источником Breg являются, по-видимому, В1-лимфоциты. Роль Breg в развитии гуморального иммунного ответа практически не изучена. Исследования такого рода удобно проводить в системе *in vitro*. Ранее нами была разработана модельная система, позволяющая использовать минимальное количество В1-лимфоцитов при изучении их взаимодействий с другими клетками *in vitro*. В этой системе в качестве клеток-«филлеров» используются спленоциты XID-мышей CBA/N, не имеющих В1-клеток. С другой стороны, адоптивный перенос Breg мышей линии CBA мышам конгенной линии CBA/N позволяет исследовать влияние этих клеток на гуморальный иммунный ответ *in vivo*.

Цель. Изучение роли Breg в гуморальном иммунном ответе. В задачи исследования входило: определение влияния Breg на иммунный ответ субпопуляций В-лимфоцитов на Т-зависимый антиген (ТЗ АГ) в модельной системе *in vitro* и на модели адоптивного переноса *in vivo*.

Материалы и методы. В1-лимфоциты выделяли из перитонеальной полости, В2 – из селезенки мышей линии CBA методом иммуномагнитной сепарации. При культивировании *in vitro* В1- и В2-клетки смешивали со спленоцитами линии мышей CBA/N в соотношении 1:9 соответственно. Breg выделяли из перитонеальной полости мышей линии CBA с использованием Regulatory B cell isolation kit. Методом проточной цитометрии было определено, что > 90% Breg синтезировало IL-10. Контрольные В-лимфоциты (Вконтр), получали так же, как и Breg, за исключением добавления активаторов. Вконтр содержали не более 4% синтезирующих IL-10 В-клеток. В качестве ТЗ АГ использовали водорастворимый антиген бараньих эритроцитов (ВРАБЭ), который добавляли в конечной концентрации 25 мкг/мл. Для раздельного культивирования Breg использовали мембранные вставки с полупроницаемой мембраной. Breg или Вконтр вносили в верхнюю камеру в количестве 1×10^6, в нижнюю помещали 5×10^6 клеток смешанных культур. Клетки инкубировали в полной среде в CO_2-инкубаторе при 37 °C в течение 4 дней с АГ или без него. Функциональную активность В-лимфоцитов оценивали по числу АТ- и ИГ-образующих клеток (АОК и ИГОК соответственно) в культурах методом ELISPOT.

В опытах *in vivo* Breg вводили конгенным XID-мышам линии CBA/N по 1,5 млн внутривенно (в/в). Одновременно мышей иммунизировали в/в ВРАБЭ в дозе 50 мкг/мышь. В качестве контроля использовали нормальных мышей линии CBA/N и мышей CBA/N, получивших Вконтр и ВРАБЭ, и только Вконтр. На 4-й день

после адоптивного переноса клеток и иммунизации у мышей-реципиентов получали селезенки и определяли в них число АОК и ИГОК.

Результаты. Добавление ВРАБЭ индуцировало иммунный ответ в смешанных культурах: прирост числа АОК для культуры с B2-клетками составил 478±190/10^6 клеток, а числа ИГОК – 3745±2565/10^6 клеток. Для культуры с B1-лимфоцитами соответствующие показатели составили для АОК 345±186/10^6, а для ИГОК – 13133±6023/10^6 клеток. Внесение в верхнюю камеру Вконтр в культуре с B2-лимфоцитами приводило к увеличению прироста АОК и ИГОК ~ в 2 раза. Добавление Breg значительного влияние на прирост АОК и ИГОК не оказывало. На культуру, содержащую B1-клетки, Вконтр и Breg действовали по-другому. Внесение в верхнюю камеру Вконтр почти не влияло на образование АОК и ИГОК, индуцированных ВРАБЭ. В то же время добавление в верхнюю камеру Breg уменьшало в смешанной культуре с B1-лимфоцитами прирост АОК с 344±185/10^6 до значения 201±94/10^6 и ИГОК – с 13133±6023/10^6 до 7045±1924/10^6 клеток.

Таким образом, Breg угнетали индуцированный ВРАБЭ специфический и поликлональный иммунный ответ в культурах с B1-лимфоцитами. Очевидно, что это угнетение в значительной степени обусловлено выделяемым Breg-клетками IL-10.

Для исследования влияния Breg на иммунный ответ на ВРАБЭ *in vivo* была использована модель адоптивного переноса. Оказалось, что Breg, перенесенные одновременно с введением ТЗ АГ конгенной линии мышей CBA/N, способствовали снижению прироста числа АОК на 31%. Это свидетельствует о том, что *in vivo* Breg могут угнетать первичный специфический ответ на ТЗ АГ. Вконтр не оказывали такого влияния на иммунный ответ. Таким образом, данные *in vivo* о влиянии Breg на иммунный ответ согласуются с результатами исследований, полученными в модельной системе *in vitro*.

Заключение. Установлено, что Breg оказывают угнетающее действие на образование АТ-продуцентов на ТЗ АГ (ВРАБЭ) в модельной системе *in vitro* и при адоптивном переносе *in vivo*.

ВЛИЯНИЕ МП-5 И МП-6 НА МИКРОБИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ И ПРОДУКЦИЮ IL-1β И IL-10 ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ ПРИ СТРЕССЕ

Гаврилова Т.В.[4], Гейн С.В.[1, 3], Никитина А.А.[3], Гейн О.Н.[6], Черешнева М.В.[2], Черешнев В.А.[2], Кирилина Е.А.[4]

[1] ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, Пермь, Россия
[2] ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия
[3] ФГБОУ ВПО «Пермский государственный научно-исследовательский университет», Пермь, Россия
[4] ФГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера», Пермь, Россия
[5] ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Пермь, Россия
[6] ФГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», Пермь, Россия

Введение. Миелопептиды – группа короткоцепочных биорегуляторных молекул пептидной природы, обладающая широким спектром иммунорегуляторной активности за счет возможного направленного влияния отдельных пептидных фракций на различные звенья иммунной системы.

Цель. Исследовать влияние миелопептидов МП-5 и МП-6 на продукцию активных форм кислорода, IL-1β и IL-10 перитонеальными макрофагами мышей на фоне иммобилизационного стресса *in vivo*.

Материалы и методы. Эксперименты в системе *in vivo* выполнены на мышах-самцах породы Swiss, массой 17-22 г. В качестве стрессорного воздействия использовался 2-часовой иммобилизационный стресс. МП-5 или МП-6 вводили внутрибрюшинно за 30 минут до начала стресса в дозе 40 мкг/кг. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными клетками производили с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции. Для оценки продукции цитокинов перитонеальные макрофаги культивировали в 24-луночных планшетах 10^6 клеток в 1 мл полной культуральной среды. Количественное определение IL-1β и IL-10 проводили с помощью наборов (R&D, США).

Результаты. Уставновлено, что иммобилизационный стресс не влиял на спонтанную продукцию активных форм кислорода. Миелопептид МП-5 стимулировал спонтанную продукцию активных форм кислорода макрофагами, в то время как статистически значимых эффектов МП-6 на спонтанную ЛЗХЛ зарегистрировано не было. При анализе стимулированной ЛЗХЛ было установлено, что стресс угнетал продукцию активных форм кислорода в зимозан-стимулированных культурах, а МП-5 отменял эффект стресса. В группах животных, подвергнутых стессу на фоне введения МП-6, наблюдалось усиление продукции активных форм кислорода по сравнению с контрольной группой и с группой животных, подвергнутых стрессу. В дальнейшем мы оценивали влияние МП-5 и МП-6 при стрессе на продукцию IL-1β и IL-10. Стресс угнетал зимозан-индуцированную продукцию IL-1β, предварительное введение мышам МП-5 и МП-6 стресс-индуцированное угнетение IL-1β отменяло. На продукцию IL-10 стресс влияния не оказывал, в то же время наблюдалось выраженное снижение спонтанной и стимулированной продукции IL-10 в группе животных, подвергнутых стрессу на фоне введения МП-5.

Заключение. Таким образом, миелопептиды МП-5 и МП-6 оказывают модулирующее действие на функции стимулированных зимозаном перитонеальных макрофагов, отменяя стресс-индуцированное угнетение продукции активных форм кислорода и IL-1β. В общем полученные нами данные указывают на перспективность дальнейшего исследования иммуномодулирующих эффектов МП-5,6 и других отдельных миелопептидов.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-44-590156-р-а.

ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Гейн С.В.[1, 2], Шаравьева И.Л.[1]

[1] Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия
[2] Пермский государственный научно-исследовательский университет, Пермь, Россия

Введение. Холодовой стресс – стрессорное воздействие, вызванное низкой температурой окружающей

среды. Хорошо известно, что переохлаждение вызывает характерный для любого стресса гормональный сдвиг, ухудшает двигательные и когнитивные функции, модулирует продукцию IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10. Роль опиоидных пептидов в регуляции функций клеток иммунной системы при стрессе заслуживает особого внимания, поскольку секретируемые при стрессе в периферическую кровь опиоидные пептиды, оказывают стресс-протективный, обезболивающий и иммунорегуляторный эффекты.

Цель и задачи. Исследовать влияние блокады опиатных рецепторов на уровень кортикостерона в плазме крови, продукцию активных форм кислорода, IL-1β, TNFα, IL-10 перитонеальными макрофагами при остром холодовом стрессе у мышей *in vivo*.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на белых мышах самцах массой тела 20-22 г. Мыши подвергались острому переохлаждению при -20 °С в течение 10 или 60 минут. Антагонист опиатных рецепторов налоксона гидрохлорид вводили в дозе 0,2 мг/кг подкожно за 20 мин до стресса. Через 1 час после окончания стрессорного воздействия мышей выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными макрофагами осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции. Для определения продукции цитокинов перитонеальные макрофаги культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки, 100 ЕД/мл гентамицина, в 24-луночных планшетах, содержащих $2,5 \times 10^6$ клеток на лунку. Через 24 часа супернатанты собирали в пробирки «Эппендорф», замораживали и хранили при -20 °С. Определение концентрации цитокинов в супернатантах клеточных культур проводили с использованием иммуноферментных тест-систем R&D (США). Концентрацию кортикостерона в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем Enzo (США). Статистическая обработка результатов проведена с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и LSD-критерия для межгруппового сравнения. Все данные на рисунках представлены в виде средней и ее стандартной ошибки.

Результаты. Установлено, что экспозиция мышей при -20 °С в течение 10 мин приводила к угнетению продукции АФК макрофагами, эффект нивелировался на фоне введения налоксона. В группе животных, подвергнутых 60 мин стрессу, напротив, наблюдалась налоксон-зависимая стимуляция продукции АФК. Оба варианта холодового стресса не оказывали значимого влияния на продукцию IL-1β. Продукция TNFα на фоне 60 мин охлаждения налоксон-зависимо стимулировалась как в спонтанных, так и в зимозан-стимулированных культурах. Продукция макрофагами IL-10 усиливалась независимо от продолжительности холодового воздействия, в условиях стимуляции и без нее, и отменялась на фоне блокады опиатных рецепторов.

Заключение. Таким образом, направленность действия острого холодового стресса на функции макрофагов зависела как от исследуемого параметра, так и времени воздействия, при этом блокада опиатных рецепторов существенно модифицировала иммунорегуляторные эффекты переохлаждения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-96002-р-а.

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОЙ БЛОКИРОВКИ TNF НА РОСТ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ MCA 205 ФИБРОСАРКОМЫ *IN VIVO*

Гоголева В.С.[1,2], Атретханы К.-С. Н.[1,2], Носенко М.А.[1,2], Недоспасов С.А.[1,2,3], Друцкая М.С.[1,2]

[1] ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[3] Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Фактор некроза опухолей (TNF) – цитокин с широким спектром действия, выполняющий важную роль в иммунной регуляции и воспалении. На данный момент блокаторы TNF широко применяются в терапии аутоиммунных заболеваний (Drutskaya M.S. et al., 2010). Роль TNF в развитии опухолей неоднозначна (Balkwill F., 2009). Одной из функций TNF в опухолевом микроокружении является поддержание метастазирования. При этом 90% случаев смерти онкологических больных связано именно с возникновением метастазов, а не первичной опухолью (Lambert A.W. et al., 2017). Изучение роли TNF в метастазировании актуально не только с точки зрения понимания молекулярных механизмов метастатического каскада, но может также иметь клиническое значение.

Цель. Исследование роста и метастазирования перевиваемой опухолевой линии MCA 205 фибросаркомы у мышей на фоне системной анти-TNF терапии.

Работу проводили на гуманизированных по TNF мышах, которым каждые три дня вводили блокаторы TNF инфликсимаб или этанерцепт, а контрольной группе – PBS. Опухолевые клетки MCA 205 фибросаркомы вводили через неделю после начала применения блокаторов TNF. Объем опухоли измеряли каждые 3-5 дней. В конце эксперимента проводили анализ различных популяций спленоцитов методом проточной цитофлуориметрии, оценивали уровень экспрессии генов в опухоли методом ПЦР в реальном времени, осуществляли иммуногистохимический анализ опухолевых образцов, а также изучали развитие миелоидных клеток *in vitro* на фоне нейтрализации TNF.

В ходе данной работы было обнаружено, что фармакологическая блокировка TNF приводит к замедлению роста опухолей у самок, что коррелирует с уменьшением накопления миелоидных супрессорных клеток, обладающих проопухолевой активностью (Atretkhany K.S. et al., 2016). Кроме того, мы обнаружили, что нейтрализация TNF влияет на развитие миелоидных клеток: при дифференцировке *in vitro* в присутствии блокаторов TNF моноцитарная популяция незрелых миелоидных клеток в большей степени подвержена клеточной смерти. Системная нейтрализация TNF у самцов не влияла на первичный рост опухоли, но на более позднем этапе предотвращала возникновение метастазов. При нейтрализации TNF происходило понижение экспрессии ангиогенных и супрессорных белков, таких как *Hif1a*, *Vegfa, Fgf2* и *Icam1*, в опухолевых образцах. Иммуногистохимический анализ показал, что нейтрализация TNF может приводить к подавлению ангиогенеза.

Таким образом, мы обнаружили, что TNF необходим для роста перевиваемой опухолевой линии MCA 205 фи-

бросаркомы *in vivo*. Кроме того, TNF способствует выживанию миелоидных клеток, а также играет важную роль в ангиогенезе и метастазировании.

Работа была осуществлена при поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ НШ-10014.2016.4

ДЕФИЦИТ АРГИНИНА, ВЫЗВАННЫЙ АКТИВНОСТЬЮ СТРЕПТОКОККОВОЙ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ, СНИЖАЕТ ПРОДУКЦИЮ МАКРОФАГАМИ ОКСИДА АЗОТА

Головин А.С.[1], Бурова Л.А.[1], Соколов А.В.[1, 2], Старикова Э.А.[1], Фрейдлин И.С.[1, 2, 3]

[1] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[3] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Ключевым компонентом врожденного иммунитета, контролирующим агрессию патогенных стрептококков (*Streptococcus pyogenes)* в организме, являются макрофаги. Одним из механизмов антибактериальной активности этих клеток служит продукция оксида азота (NO). Продукция оксида азота макрофагам опосредована ферментом NO-синтазой II, субстратом которого является аргинин. NO является важной внутри и межклеточной сигнальной молекулой, регулирующей пролиферацию и дифференцировку клеток адаптивного иммунитета, а также, обладает бактерицидной активностью. Аргинин используется в качестве субстрата бактериальным ферментом аргининдеиминазой (АД), который продуцирует *S. pyogenes*. Дефицит аргинина, вызванный действием аргининдеиминазы *S. pyogenes*, может приводить к дизрегуляции воспаления и нарушению формирования адекватного иммунного ответа.

Цель. Оценить влияние стрептококковой АД на продукцию NO макрофагами линии J774.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на модельной системе мышиных макрофагов перевиваемой линии J774. В работе использовали супернатанты разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена АД M49-16delAD (любезно предоставлены проф. Суворовым А.Н., отдел молекулярной микробиологии, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург), содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты бактерий. Клетки линии J774 вносили в планшет и добавляли в лунки супернатанты разрушенных стрептококков исходного или мутантного штамма. Для индукции синтеза NO в лунки планшета вносили ЛПС. В некоторые лунки вносили аргинин дополнительно. После 24 часов инкубации измеряли концентрацию оксида азота в надосадке с помощью реактива Грисса. Количество аргинина в экспериментальных пробах определяли с помощью модифицированной реакции Сукагуши.

Результаты. Предварительно проводили подбор концентрации супернатанта M49-16, в которой он обладал максимальной способностью гидролизовать аргинин. Для этого оценивали количество аргинина в экспериментальных пробах после инкубации с различными разведениями супернатанта исходного штамма. Для дальнейшей работы было выбрано оптимальное разведение супернатантов разрушенных стрептококков 1 мкл/100 мкл культуральной среды. В этом разведении наблюдалось достоверное снижение количества аргинина в экспериментальных пробах, содержащих супернатант исходного штамма ($p < 0,001$). Количество аргинина в пробах с супернатантом штамма M49-16delAD достоверно не снижалось. Исследование показало, что супернатант *S. pyogenes* M49-16 достоверно подавлял индуцированную ЛПС продукцию NO клетками линии J774 ($p < 0,0001$). При этом продукция NO в присутствии супернатанта *S. pyogenes* M49-16delAD не изменялась. Добавление аргинина приводило к трехкратному увеличению продукции NO клетками линии J774, инкубированными в присутствии супернатанта исходного штамма ($p < 0,0001$). Продукция NO клетками, инкубированными в присутствии супернатанта M49-16delAD, при добавлении аргинина достоверно не отличалась от контрольного уровня.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о способности стрептококковой АД приводить к снижению продукции NO клетками линии J774 за счет деплеции аргинина в культуральной среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00150.

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ НА ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО СОЕДИНЕНИЯ КРЕМНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Гордова В.С., Григорьева Е.А., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т.

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия
Институт вегетативной анатомии, клиника Шарите, университет Гумбольдта, Берлин, Германия

Макрофаги печени – особая популяция резидентных макрофагов, которым в последнее время, в связи с изучением иммунных функций печени, уделяется большое внимание. Нами уже было изучено влияние длительного поступления в организм с питьевой водой соединения кремния на макрофаги тимуса, селезенки, лимфоидных узелков тонкого кишечника и прилежащих к ним кишечных ворсинок и показано, что макрофаги уменьшаются в размерах, в них меняется содержание нейромедиаторных биогенных аминов, на их цитоплазме увеличивается экспрессия MHC II. Однако вопрос, является ли действие кремния, поступающего с питьевой водой идентичным для всех популяций макрофагов, остается открытым.

Цель. Изучение макрофагов печени лабораторных крыс на длительном сроке поступления в организм водорастворимого соединения кремния.

Материалы и методы. Изучали печень 10 нелинейных крыс-самцов. Контрольная группа (5 крыс), получала *ad libitum* стандартизованную питьевую воду, подопытная (5 крыс), получала *ad libitum* ту же воду с добавлением девятиводного метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний. Через девять месяцев животные были выведены из эксперимента, макрофаги в парафиновых срезах печени выявляли непрямым иммуногистохимическим методом. Первичные антитела – мышиные антитела против CD68 (clon ED1, Abcam, Cambrige, UK), вторичные антитела – меченные биотилином козьи антитела (Vector Laboratories, U.S.). Для визуализации позитивного окрашивания срезы инкубировались с авидин-биотиновым комплексом и диамино-бензидином (Vector Laboratories, U.S.). Изучали макрофаги в десяти полях зрения (×400, ×900), о степени экспрессии CD68 судили

по интенсивности светопропускания мембраны и цитоплазмы макрофагов, которую проводили с помощью демо-версии программы Sigma Scan Pro5.

Результаты. Макрофаги, экспрессирующие маркер CD68, имеют темно-коричневую окраску мембраны и светло-коричневую цитоплазму, располагаются преимущественно вдоль синусоидных капилляров. Их количество сопоставимо для обеих групп крыс и составляет 18-20 клеток в поле зрения (×400), однако у крыс, получавших кремний с водой, визуально макрофаги имеют меньшее количество отростков и более темную цитоплазматическую мембрану. Средняя площадь макрофагов составила 179,23±5,94 мкм^2 и 117,04±3,35 мкм^2 для контрольной и подопытной групп соответственно ($p < 0,001$). Интенсивность светопропускания цитоплазматической мембраны составляет 110,20±11,06 у.е. и 102,47±1,66 у.е., цитоплазмы – 88,15±8,15 у.е. и 83,96±1,82 у.е. для контрольной и подопытной групп соответственно, что свидетельствует о том, что на поверхности звездчатых макрофагов крыс, получавших кремний, находится большее количество маркера CD68. Таким образом, морфологическая реакция макрофагов как печени, так и лимфоидных органов при данном виде воздействия в течение длительного времени имеет сходный характер.

Заключение. Наши наблюдения свидетельствуют, что при поступлении с питьевой водой соединения кремния макрофаги печени, уменьшаясь в размерах, компенсируют это увеличением экспрессии CD68 на своей цитоплазматической мембране, что можно расценивать как адаптационную реакцию в ответ на снижение фагоцитарной функции.

ЭФФЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО БЭКГРАУНДА НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ K72W ЦИТОХРОМА С *IN VIVO*

Горшкова Е.А.[1], Недоспасов С.А.[1, 2], Шилов Е.С.[1]

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2] ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

Цитохром С является незаменимым элементом дыхательной цепи митохондрий, а также выступает в роли одного из медиаторов внутреннего пути апоптоза. У мышей полный генетический нокаут соматического цитохрома С приводит к эмбриональной летальности. Ранее было показано, что точечная мутация замены лизина-72 нарушает только проапоптотические функции белка и на смешанном генетическом фоне приводит к различным эффектам для разных систем организма *in vivo*.

Мы перевели ранее полученных мышей с заменой остатка лизина-72 на триптофан (K72W-мыши) в последовательности соматического цитохрома С на смешанный генетический бэкграунд линий C57BL/6 и 129S2, поскольку на чистом генетическом фоне C57BL/6 они демонстрировали нормальный фенотип. Мы предположили, что проявление аномального фенотипа гомозиготных по *K72W* мышей зависит от генов-модификаторов, специфических для линии 129S2, и поэтому не наблюдается у мышей, несущих мутацию на чистом генетическом фоне линии C57BL/6. **Целью** данной работы является характеристика влияния мутации *K72W* на нервную и иммунную системы мыши и нахождение возможных механизмов модификации эффекта мутации, зависящих от генетического бэкграунда.

Для характеристики морфологии мозга *K72W/K72W* мышей был использован анализ гистологических и томографических изображений, а также цитофлуориметрический анализ инфильтрирующих клеток мозга. Оценка популяций иммунных клеток тимуса и селезенки гомозиготных мышей была произведена при помощи проточной цитофлуориметрии.

По результатам работы была подтверждена зависимость проявления фенотипа с нарушениями развития мозга и тимуса у гомозиготных особей от линиеспецифических генов-модификаторов: при скрещивании мышей, несущих мутацию *K72W* на чистом C57BL/6 бэкграунде, с мышами дикого типа линии 129S2 в поколении F_2 появляются особи, демонстрирующие аномалии развития. В дальнейших скрещиваниях было установлено, что аномальный фенотип проявляется примерно у 40% гомозигот, что указывает на наличие не менее двух генов-модификаторов. На основании литературных данных мы предположили, что такими модификаторами могут быть гены *Casp4, Birc6, Naip1-6,* однако проверка методом аллелеспецифической ПЦР не установила соответствия между проявлением аномального фенотипа и носительством аллелей данных генов, специфичных для линии 129S2, в гомозиготном или гетерозиготном состояниях.

Аномальный фенотип гетерогенен и включает такие признаки, как разрастание клеток коры и базальных ганглиев головного мозга, гидроцефалию, уменьшение размера тимуса и увеличение популяции DN-тимоцитов. Аномальные признаки сочетаются независимо друг от друга: встречаются *K72W/K72W* мыши, со значительно измененной морфологией головного мозга и нормальным распределением популяций тимоцитов, и наоборот. Также мы показали, что несмотря на аномальное развитие головного мозга у части гомозигот *K72W/K72W*, экзоэнцефалия не приводит к нарушению гематоэнцефалического барьера и массовой инфильтрации иммунных клеток в головной мозг.

Полученные результаты указывают на важность исследования эффектов генетического бэкграунда в моделях генетических нокинов и нокаутов. Мы планируем продолжить поиск генов-модификаторов апоптотического пути, определение которых может расширить существующее представление о механизмах апоптоза.

Работа была осуществлена при поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ НШ-10014.2016.4.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-01216 мол-а.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ TNF *IN VIVO* С ПОМОЩЬЮ НАНОАНТИТЕЛ, СЛИТЫХ С БЕЛКОМ KATUSHKA

Горшкова Е.Н.[1], Южакова Д.В.[1, 2], Василенко Е.А.[1], Ширманова М.В.[2], Ефимов Г.А.[3], Ермакова К.Д.[1], Недоспасов С.А.[1, 4], Астраханцева И.В.[1]

[1] Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
[2] Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия
[3] Гематологический научный центр, Москва, Россия
[4] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Введение. Фактор некроза опухоли (TNF) является провоспалительным цитокином, который играет важную

роль в нормальных физиологических процессах. Однако при многих аутоиммунных заболеваниях отмечается увеличение экспрессии TNF. В связи с этим важным для понимания роли TNF как в патологических, так и в нормальных процессах является выявление основных сайтов экспрессии этого цитокина. Применение методов прижизненной визуализации для изучения экспрессии TNF при аутоиммунных патологиях может открыть новые возможности в понимании биологии этого цитокина. Нами были получены конструкции, состоящие из наноантитела против TNF человека и дальне-красного флюоресцентного белка Katushka (TurboFP635), которые могут претендовать на роль как флюоресцентных сенсоров, так и агентов для тераностики TNF-зависимых патологий.

Цель и задачи. Оценить перспективы применения полученных конструктов для визуализации TNF *in vivo,* исследуя уровень флюоресценции тела и органов, гуманизированных по гену TNF мышей в модели ЛПС/D-галактозамин (D-GalN)-индуцированной острой гепатотоксичности.

Материалы и методы. В работе использовались 2 флюоресцентных конструкта: нейтрализующий биологическую активность TNF белок NTN-Kat и связывающий TNF, но не блокирующий его биологическую активность белок BTN-Kat. Анти-TNF активность этих белков была оценена ранее по результатам *in vitro*- и *in vivo*-тестов. Белки вводили животным внутрибрюшинно (150 пМ/г веса животного). Затем через 30 минут животным внутрибрюшинно вводили ЛПС (400 нг/г веса) и D-GalN (800 мкг/г веса) либо PBS. Для оценки автофлюоресценции мышам вводили PBS за 30 мин до инъекции ЛПС/D-GalN. Флюоресцентный имиджинг животных и их органов проводился через 1 час, 3 часа и 6 часов после введения ЛПС на установке IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США) *ex vivo* в режиме регистрации эпилюминесценции. Флюоресценцию возбуждали на длине волны 605/15 нм, регистрировали – на 660/10 нм. Для получения изображений животных шерсть удаляли машинкой для бритья и дополнительно проводили депиляцию кремом. При количественном анализе в программе LivingImage (Perkin Elmer) определяли усредненную по интересующей области интенсивность флюоресценции. В работе использовали трансгенных 750huTNFKI мышей, полученных на генетической основе линии C57Bl/6, продуцирующих человеческий TNF вместо мышиного.

Результаты. Поскольку модель острой гепатотоксичности, индуцированная одновременным введением D-GalN и ЛПС, характеризуется воспалительным процессом в брюшной полости, как и ожидалось, наибольший уровень флюоресценции наблюдался при получении изображений животных со стороны живота. При этом через 1 час после введения ЛПС и D-GalN у мышей наблюдалось диффузное усиление сигнала (BTN-Kat – $1{,}83 \times 10^8$, NTN-Kat – $1{,}15 \times 10^8$ [p/s/cm^2/sr]/[μW/cm^2]) по сравнению с контрольными мышами, после введения PBS (BTN-Kat – $1{,}41 \times 10^8$, NTN-Kat – $2{,}55 \times 10^7$ [p/s/cm^2/sr]/[μW/cm^2]). Аналогичное увеличение сигнала через 1 час мы также наблюдали для органов, при этом наиболее интенсивной флюоресценцией обладали легкие (BTN-Kat – $3{,}83 \times 10^7$, NTN-Kat – $6{,}83 \times 10^7$[p/s/cm^2/sr]/[μW/cm^2]), кишечник (BTN-Kat – $8{,}24 \times 10^7$, NTN-Kat – $6{,}68 \times 10^7$ [p/s/cm^2/sr]/[μW/cm^2]) и кожа (BTN-Kat – $6{,}19 \times 10^7$, NTN-Kat – $5{,}32 \times 10^7$ [p/s/cm^2/sr]/[μW/cm^2]). По результатам анализа сигнала через 6 часов после начала эксперимента мы могли наблюдать, что у контрольных мышей, не стимулированных ЛПС и D-GalN, уровень флюоресценции BTN-Kat снижался до значения $9{,}76 \times 10^6$ (p/s/cm^2/sr)/(μW/cm^2), сопоставимого с аналогичным значением автофлюоресценции ($2{,}17 \times 10^7$ [p/s/cm^2/sr]/[μW/cm^2]), что, вероятно, свидетельствует о полном его выведении из организма. В то же время мы могли наблюдать накопление белка NTN-Kat как при оценке сигнала от животного со стороны живота ($7{,}04 \times 10^7$ [p/s/cm^2/sr]/[μW/cm^2]), так и при оценке органов (преимущественно легкие и кожа).

Заключение. Таким образом, можно сделать вывод, что использование белков BTN-Kat и NTN-Kat возможно для прижизненного изучения экспрессии TNF. При этом белок BTN-Kat способен быстро выводиться из организма, что характеризует его как эффективный сенсор с коротким временем жизни. В то же время белок NTN-Kat способен в свободном виде или в виде комплексов с TNF накапливаться в организме и сохранять при этом свою нейтрализующую активность, что было ранее подтверждено с помощью *in vivo*-тестов.

Работа выполнена при поддержке Грантов РФФИ № 16-34-00561, № 17-04-01478 и в рамках государственного задания (шифр проекта 20.6159.2017/П220).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ IL-6 В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АСТМЫ У МЫШЕЙ

Губернаторова Е.О.[1, 2], Друцкая М.С.[1, 2], Недоспасов С.А.[1, 2], Туманов А.В.[1]

[1] ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН Москва, Россия
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Частота и тяжесть хронических заболеваний легких, таких как аллергическая астма, растет с каждым годом, затрагивает от 200 до 300 миллионов человек. Первопричина, приводящая к развитию многих хронических заболеваний легких, остается неизвестной, и современные методы терапии астмы направлены преимущественно на облегчение симптомов. Таким образом, существует острая потребность в разработке новых методов лечения астмы. IL-6 представляет собой провоспалительный цитокин с плейотропными функциями – от гемопоэтической регуляции и регенерации тканей до индукции хронического воспаления и развития рака. Недавние исследования подтверждают связь IL-6 и воспаления в легких, следовательно, IL-6 может быть важной мишенью для терапии астмы (Doganci A. et al., 2005).

Цель. Изучение роли IL-6 в экспериментальной модели астмы у мышей, индуцированной белковым экстрактом из домашнего пылевого клеща (HDM, house dust mite).

Для исследования влияния IL-6 на аллергическое воспаление дыхательных путей нами была оптимизирована мышиная модель острой астмы (Blanchet M.R. et al., 2012). Сенсибилизирующее введение 1 мг HDM осуществляли за неделю до основного курса. Индукцию проводили посредством ежедневного интраназального введения HDM из расчета 0,5 мг/г веса мыши в течение 2 недель. Антитела против IL-6 мыши (из расчета 2,5/г веса мыши) вводили внутрибрюшинно перед каждой иммунизацией. Контрольной группе мышей вместо инъекции anti-IL-6 антител производили инъекции физиологического раствора. По окончании эксперимента

оценивали интенсивность и характер воспаления в легких, а также уровень провоспалительных цитокинов, ассоциированных с астмой.

В ходе данной работы было обнаружено, что, по сравнению с контрольными мышами, мыши, подвергавшиеся анти-IL-6 терапии, демонстрируют значительное снижение тяжести воспаления дыхательных путей. Подсчет иммунных клеток в тканях легких и бронхоальвеолярной жидкости, проведенный в конце эксперимента, показал снижение общего числа лимфоцитов в группе мышей, которым вводили антитела блокирующие IL-6. Кроме того, цитофлуориметрический анализ выделенных из легких и бронхоальвеолярной жидкости лимфоцитов выявил существенное снижение как доли, так и абсолютного числа гранулоцитов и патогенных при астме Th2-клеток у мышей на фоне анти-IL-6 терапии. Методом количественного ПЦР было установлено, что блокировка IL-6 приводила к снижению экспрессии активирующих цитокинов, таких как IL-4, IL-5, и IL-13, участвующих в индукции и поддержании воспаления при астме. Иммуноферментный анализ (ELISA) сыворотки и бронхоальвеолярной жидкости показал снижение уровня IgE, маркера астматического поражения легких, у мышей, подверженных anti-IL6 терапии по сравнению с контрольными мышами. Наконец, экспрессия муцина *Muc5ac* и маркера бокаловидных клеток *Gob5* была снижена на фоне анти-IL-6 терапии. Следует отметить, что медикаментозное подавление продукции слизи в дыхательных путях является одним из способов облегчения состояния при астме.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что введение антител против IL-6 может снижать гиперреактивность дыхательных путей и аллергическое воспаление в мышиной модели HDM-индуцированной астмы. Данные результаты предоставляют рациональную основу для начала разработки терапии астмы, основанной на блокировке IL-6. Дальнейшие эксперименты необходимы для определения конкретного клеточного источника IL-6 в данной модели, а также с целью установления молекулярного механизма, определяющего патогенность этого цитокина в астме.

Работа была осуществлена при поддержке гранта РНФ 14-25-00160.

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЭХИНОХРОМА А В КАЧЕСТВЕ СОПРОВОДИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ БЛЕОМИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ЛЕГКИХ НА РАННЕМ ЭТАПЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Гусева О.Е., Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Кузнецова М.С.

Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровск, Россия

Введение. Блеомицин – смесь гликопептидных антибиотиков с цитостатическим эффектом, механизм действия которого связан со способностью вызывать фрагментацию молекул ДНК. Блеомицин входит в «золотые» стандарты терапии различных форм лимфогранулематоза у детей и подростков. Повсеместно известен его пневмотоксический эффект, который характеризуется развитием воспалительных и фибротических изменений. Одним из ключевых молекулярных механизмов формирования и прогрессирования воспалительно-фиброзных процессов является оксидативный стресс, нарушающий баланс редокс-сенситивной регуляции апоптоза, пролиферации, дифференцировки, миграции мезенхимальных и эпителиальных клеток. Препараты на основе природного антиоксиданта Эхинохрома А (2,3,5,6,8-пента-гидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон) в настоящее время широко используются в офтальмологии, кардиологии, неврологии.

Цель и задачи. Изучение влияния Эхинохрома А на показатели оксидативного стресса, индуцированного блеомицином, в легких крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза. Исследование влияния Эхинохрома А на блеомицин-индуцированные нарушения процессинга свободных радикалов (СР) в легких крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза.

Материалы и методы. Исследование проводилось в рамках программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Новые лекарственные формы, биопрепараты и медицинские технологии, преимущественно на основе молекул и надмолекулярных комплексов из биологических объектов Дальнего Востока и Мирового океана», научный проект 15-I-5-030. Опыт поставлен на крысах линии Вистар. Животные были разделены на три группы. Первая группа – «блеомицин» – введение блеомицина крысам в возрасте 30 дней, однократное, внутрибрюшинное, в дозе 1 мг/кг. Вторая группа «блеомицин + эхинохром» – введение блеомицина, как и в первой группе, а также введение эхинохрома А через желудочный зонд в форме водного раствора, приготовленного extempore, в дозе 10 мг/кг в течение 5 суток (в день введения блеомицина, а также на 2, 3, 4 и 5-е сутки после этого). Третья группа – «контроль» – однократное внутрибрюшинное введение 30-дневным крысам физиологического раствора в эквиобъемных блеомицину дозах. Для интегральной оценки процессов биогенеза СР в гомогенатах легочной ткани использовали метод хемилюминесценции (ХМЛ) на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER».

Результаты. Результаты ХМЛ-исследования легких крыс, повергнутых воздействию блеомицина, свидетельствовали о развитии выраженного оксидативного стресса. Зарегистрировано повышение генерации свободных радикалов в целом – показатель Ssp превышал аналогичный в группе «контроль» в 2,6 раза, при этом продукция супероксид-анион радикалов (Sluc), перекисных радикалов (Sind-1) возросла в 2,8 и 3,2 раза соответственно. Зарегистрирована интенсификация первичного этапа перекисного окисления липидов: концентрация гидроперекисей липидов (h) превышала значения в группе «контроль» в 3,1 раза. Нарушение процессинга СР сопровождалось ослаблением антиоксидантной антирадикальной защиты и снижением перекисной резистентности: величина Sind-2 возросла в 3,4 раза, амплитуда H – в 3,2 раза соответственно. Известно, что Эхинохром А способен одновременно блокировать ряд звеньев свободнорадикальных реакций, действует как перехватчик активных форм кислорода, нейтрализует липопероксидные радикалы, хелатирует ионы металлов, ингибирует перекисное окисление липидов. Эти свойства были продемонстрированы им в данной экспериментальной модели – величины всех ХМЛ-параметров, характеризующих оксидативный статус в группе «блеомицин+эхинохром» (Ssp, Sluc, Sind-1, h, Sind-2, H), были достоверно меньше, чем в группе «блеомицин» – в 1,9; 2,0; 1,9; 2,0; 2,4; 2,3 раза соответственно.

Заключение. Признанной стратегией фармакотерапии при пневмофиброзе является коррекция локальных проявлений оксидативного стресса (Walters D.M., Cho H.Y., 2014). Полученные нами результаты согласуются с данной стратегией, расширяя возможности для создания на основе Эхинохрома А официнального препарата для патогенетической и сопроводительной терапии в детской пульмонологической и онкологической практике.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОПЛЕНКИ НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Колесников О.Л., Пичугов С.М., Галагудин И.В.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия

Введение. Первой линией защиты от микроорганизмов выступает врожденная противоинфекционная система макроорганизма, самыми многочисленными клетками которой являются нейтрофилы. Нейтрофилы, выходя из периферической крови в ткани и на поверхность слизистых оболочек, участвуют в антимикробных и воспалительных реакциях. Известно, что бактерии сосуществуют в виде биопленки, обладая повышенной по сравнению с планктонными культурами устойчивостью к экстремальным физико-химическим условиям среды и биологическим факторам (неблагоприятной температуре, pH, концентрации соли, антимикробным веществам, фагоцитозу). Несмотря на многочисленные исследования антибиопленочных реакций врожденного иммунитета роль внеклеточного матрикса в формировании нейтрофильных внеклеточных ловушек остается невыясненной.

Цель. Определить влияние бактериальной биопленки на формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Задачи. 1) Оценить *in vitro* влияние планктонной культуры *E. coli* и ее биопленки на формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек. 2) Определить *in vivo* способность нейтрофильных гранулоцитов к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек до и после хирургической обработки инфицированной ожоговой раны.

Материалы и методы. Для решения первой задачи использовали взвесь суточной и 3-суточной культуры *E. coli* и нейтрофилы, выделенные из периферической крови условно-здоровых доноров на двойном градиенте фиколла-верографина. Исследование проводили в 5 повторах. Результаты взаимодействия изучали с помощью люминесцентной микроскопии при окраске акридиновым оранжевым. Для решения второй задачи было проведено цитологическое исследование препаратов раневого отделяемого, окрашенных по Романовскому–Гимзе, до и после выполнения хирургической обработки ожоговых ран 15 пациентов с помощью аэрозольной струи 0,05% раствора хлоргексидина биглюконата под давлением воздушного потока. В цитологических препаратах изучали содержание нейтрофильных гранулоцитов в поле зрения и определяли процентное содержание нейтрофильных внеклеточных ловушек от 100 просмотренных морфологических форм нейтрофилов с помощью световой микроскопии при увеличении 100×10×2. Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке.

Результаты. В результате проведенных исследований установили, что после 3-минутного взаимодействия суточной культуры *E. coli* со взвесью донорских нейтрофилов происходило формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек, через 30 минут совместного культивирования *in vitro* 95% нейтрофильных гранулоцитов экстрагировали свою ДНК. Иначе выглядела морфология нейтрофильных гранулоцитов при взаимодействии с 3-суточной культурой *E. coli*. В препаратах микроорганизмы были представлены плотно упакованными клетками, напоминающими кукурузные початки, а нейтрофилы сохраняли морфологию сегментоядерных гранулоцитов в течение 40 минут наблюдения и не формировали нейтрофильные внеклеточные ловушки.

При изучении цитологических препаратов раневого отделяемого до проведения хирургической обработки в поле зрения визуализировалось 9,01±1,38 нейтрофилов, после обработки 4,94±0,88 ($p = 0,04$). Процентное содержание нейтрофильных внеклеточных ловушек до обработки составляло 40,94±5,55%, а после – 59,91±5,70% ($p = 0,01$)

Заключение. Таким образом, при взаимодействии биопленки *E. coli* и нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте *in vitro* показано отсутствие формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек. В то же время на примере использования хирургической обработки инфицированной ожоговой раны, при которой происходит механическое разрушение биопленки аэрозольной струей, высвобождение планктонных форм микроорганизмов и представление незащищенных бактериальных клеток тканевым нейтрофилам, было обнаружено интенсивное формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек.

ВЛИЯНИЕ САПОЗИНА D НА ФОРМИРОВАНИЕ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Евстифеев В.В., Шепелькова Г.С., Еремеев В.В.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Сапозины (Sap) – подгруппа гликопротеинов большого семейства сапозин-подобных белков. Сапозины A, B, C и D образуются в кислых эндосомах путем расщепления просапозина (pSap). Сапозины участвуют в процессе презентации антигенов микобактерий на молекулах CD1. Ранее было показано, что макрофаги, полученные от мышей-нокаутов по гену pSAP, подавляли рост *M. tuberculosis* слабее, чем макрофаги мышей дикого типа. При добавлении к культуре клеток рекомбинантного человеческого сапозина D (Sap-D) наблюдалось полное восстановление функций макрофагов. При инкубации *M. tuberculosis* с рекомбинантными Sap наблюдалось подавление метаболизма бактерий, причем наибольшей активностью обладал Sap-D. Методами флуоресцентного мечения и электронной микроскопии было обнаружено повреждающее действие Sap-D на мембрану *M. tuberculosis*. Результаты экспериментов, проведенных в лаборатории, позволяют сделать вывод, что Sap-D является важным компонентом в формировании иммунного ответа к туберкулезу (ТБ). Однако неясно как влияет дефицит Sap-D на формирование противотуберкулезного иммунного ответа *in vivo* у мышей при экспериментальной туберкулезной инфекции.

Мышей C57BL/6 (B6) и B6.Sap-D$^{-/-}$ аэрозольно инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Через 3 и 5 недель после инфицирования исследовали степень поражения легочной ткани и рост микобактерий в легком.

Было показано, что у B6.Sap-D$^{-/-}$ микобактериальная нагрузка легочной ткани и селезенки достоверно выше, чем у мышей B6 как через три, так и через пять недель после инфицирования. Анализ клеточного состава легочной ткани показал, что для «наивных» Sap-D$^{-/-}$ по сравнению с мышами дикого типа (B6) характерно меньшее количество макрофагов как в легочной ткани, так и в селезенке. Причем через три недели после инфицирования *M. tuberculosis* H37Rv содержание макрофагов у нокаутов по сапозину D и мышей дикого типа в легких выравнивается, а в селезенке различия сохраняются. Через пять недель после инфицирования количество макрофагов у мышей нокаутов достоверно выше, чем у B6. Также было показано, что через пять недель после заражения мыши B6.Sap-D$^{-/-}$ отличаются от мышей дикого типа большей инфильтрацией легочной ткани, большим количеством нейтрофилов. Исследование чувствительности к апоптозу клеток легочной ткани Sap-D мышей и мышей дикого типа показало, что содержание апоптотических клеток в легких мышей нокаутов по сапозину D через три и пять недель после инфицирования достоверно выше, чем у мышей линии B6.

Итак, дефицит Sap-D существенно усиливает воспаление при экспериментальной туберкулезной инфекции, а также влияет на предрасположенность к апоптозу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-05519).

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНЕМИИ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС И ЕГО КОРРЕКЦИИ СОЕДИНЕНИЕМ РЯДА 1,3,4-ТИАДИАЗИНА

Емельянов В.В.[1], Булавинцева Т.С.[1,2], Сидорова Л.П.[1], Цейтлер Т.А.[1], Чупахин О.Н.[1], Черешнев В.А.[1,2]

[1] ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия
[2] ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия

Введение. Метаболические нарушения при сахарном диабете (СД) в эксперименте и клинике существенно изменяют продукцию про- и антивоспалительных цитокинов клетками иммунной системы. Выявлена роль провоспалительных цитокинов в повреждении сосудистого эндотелия и развитии диабетических ангиопатий. Предшествующими исследованиями показана способность соединений ряда 1,3,4-тиадиазина корригировать метаболические нарушения при аллоксановом СД у крыс, а также изменять течение воспалительной реакции при экспериментальном панкреонекрозе и инфаркте миокарда.

Цель и задачи. Оценить уровень цитокинемии при развитии аллоксанового СД у крыс и его коррекции соединением ряда 1,3,4-тиадиазина.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 30 крысах-самцах линии Wistar массой 210-250 г в соответствии с этическими нормами Директивы Совета ЕС 2010/63. СД моделировали введением аллоксана по ранее разработанной методике в течение 3 суток в суммарной дозе 300 мг/кг массы животного. Синтетическое соединение L-17 ряда 1,3,4-тиадиазина и вещество сравнения липоевую кислоту (ЛК, препарат «Октолипен», Россия) вводили внутримышечно в дозе 40 мг/кг массы животного 3 раза в неделю в течение 4 недель. На 30-е сутки эксперимента в крови крыс определяли содержание интерлейкинов (IL) IL-1α, IL-6 и IL-10 методом ИФА наборами фирмы «Thermo Scientific» на автоматическом анализаторе «LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM».

Результаты. Развитие СД у крыс приводило к статистически значимому повышению концентрации IL-1α, IL-6 и IL-10 от 1,1 до 3,6 раз по сравнению с интактными животными. Введение ЛК частично корригировало показатели цитокинемии, снижая концентрации IL-6 и IL-1α до уровня интактных животных, при этом концентрация IL-10 продолжала оставаться повышенной. Наиболее полной коррекции цитокинемии удалось достичь соединением IL-17, введение которого приводило к снижению концентраций всех исследованных цитокинов до уровня интактных крыс.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об участии иммунологических механизмов в корригирующем действии соединения ряда 1,3,4-тиадиазина при аллоксановом СД у крыс.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № проекта 16-15-00039.

ВЛИЯНИЕ АУТОПРОБИОТИКОВ НА ИММУНИТЕТ ПРИ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБИОЗА

Ермоленко Е.И.[1,2], Котылева М.П.[1], Кудрявцев И.В.[1], Лавренова Н.С.[1], Крамская Т.А.[1], Леонтьева Г.Ф.[1], Куляшова Л.Б.[3], Суворов А.Н.[1,2]

[1] ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[3] Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Дисбиоз кишечника корректируется при помощи пробиотиков, полезных бактерий, как правило, выделенных из пищевых продуктов или организма здоровых людей и животных. Однако использование пробиотиков в ряде случаев бывает недостаточно эффективным и кратковременным. Индигенные, или собственные, бактерии (аутопробиотики) имеют ряд преимуществ, связанных с наличием по отношению к ним иммунологической толерантности и отсутствием у них выраженной антагонистической активности к облигатным представителям микробиоты. До сих пор методология создания аутопробиотических препаратов окончательно не разработана. Во многом выбор состава аутопробиотиков связан с особенностями их влияния на иммунитет. **Целью** данного исследования явилось сравнение иммуномодулирующего эффекта различных по составу аутопробиотиков после введения крысам при дисбиозе кишечника.

В эксперименте использованы 5 групп крыс (самцы, Вистар). Индукция дисбиоза осуществлена введением ампициллина и метронидазола в течение трех дней. Затем животные в течение 5 дней получали индигенные бифидобактериии (группа Б), энтерококки (группа Е), консорциум аутопробиотических микроорганизмов, выращенных в анаэробных условиях (группа А) или фосфатный буфер (группа К1). Крысы из второй контрольной группы (К2) получали воду и фосфатный буфер. На 9-ый день эксперимента пробы крови и биоптаты селезенки исследованы при помощи проточной цитометриии клеток, окрашенных комбинацией флуоресцентно меченых моноклональных антител к CD3$^+$, CD4$^+$, CD8$^+$, CD161$^+$, FoxP3$^+$ и CD45RA$^+$ маркерам (Biolegend, США). Был использован проточный

цитометр Navios™ (Beckman Coulter). Фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови оценивали, анализируя особенности их взаимодействия со смесью стафилококков. Содержание цитокинов в сыворотке крови (IL-10, MCP-1 и TGF-β) определяли, используя тест-системы для ИФА (Bender MedSystems, США). Исследование иммунных клеток крови выявило снижение количество NK ($CD3^-CD161^+$) клеток в группе Б по сравнению с другими группами крыс. При этом процентное содержание NKT ($CD3^+CD161^+$) было выше у животных, у которых коррекция дисбиоза не проводилась (группа К1). При анализе биоптатов селезенки обращало на себя внимание низкое содержание $FoxP3^+CD25^+$ лимфоцитов у животных из группы К1 (по сравнению с остальными крысами) на фоне повышения содержания этой популяции клеток в группах А, Б и Е по сравнению с К2. Выявлена тенденция к снижению пула В-лимфоцитов ($CD45RA^+$) в селезенке животных из групп Е и А. Содержание противовоспалительного и регуляторного цитокина IL-10 в сыворотке крови было минимальным в группе К1, а в группах Б и Е содержание IL-10 было выше, чем у крыс из групп А и К2. Не было обнаружено достоверных различий в количестве MCP-1 и TGF-β в сыворотке крови животных из различных групп. Фагоцитарная активность лейкоцитов периферической крови была наиболее низкой у крыс из группы К1 и у крыс из групп А и Б, однако она была выше, чем в группе К2. Таким образом, выявлены общие тенденции и специфические особенности изменений в иммунитете при коррекции дисбиотических нарушений с использованием аутопробиотических энтерококков, бифидобактерий и анаэробного консорциума. Последний воспроизводит положительные эффекты нескольких моноштаммовых аутопробиотиков.

Работа поддержана грантом РНФ № 16-15-10085.

ЭКСПРЕССИЯ HLA-DR НА NK-КЛЕТКАХ АССОЦИИРОВАНА ПРЕИМУЩЕСТВЕННО С МЕНЕЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ С ПОВЫШЕННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Ерохина С.А., Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И.

Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

В норме в периферической крови человека содержится небольшая доля NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR, которая увеличивается при стимуляции NK-клеток IL-2 *in vitro*. *In vivo* повышенный уровень $HLA\text{-}DR^+$ NK-клеток регистрируется при определенных патологических состояниях, таких как иммунодефицит на фоне HIV-инфекции, рассеянный склероз, IgA-нефропатия. Функциональное значение этой молекулы на NK-клетках все еще обсуждается: есть доказательства того, что NK-клетки могут использовать HLA-DR для презентации антигенов, в других работах HLA-DR рассматривается как маркер активации или пролиферации NK-клеток. **Целью** данной работы было изучение взаимосвязи между экспрессией HLA-DR и стадиями развития NK-клеток, а также их функциональной активностью. Работа проводилась на свежевыделенных NK-клетках и клетках, полученных в системе активации *in vitro* с использованием IL-2 и клеток K562, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21 (K562-mbIL21). Данная комбинация стимулов используется для наращивания NK-клеток в целях иммунотерапии.

Анализ экспрессии HLA-DR на различных стадиях дифференцировки свежевыделенных NK-клеток показал, что в целом доля HLA-DR-позитивных клеток в периферической крови была значительно выше среди менее дифференцированных NK-клеток $CD56^{bright}$, чем среди относительно более зрелых клеток $CD56^{dim}$. Однако у некоторых людей наблюдалась достаточно высокая доля HLA-DR-положительных NK-клеток в терминально дифференцированной субпопуляции $CD56^{dim}CD57^+$ (группа 2). Индивидуумы из группы 2 также показали более высокий уровень $NKG2C^+$ NK-клеток в HLA-DR-положительной субпопуляции по сравнению с HLA-DR-отрицательной. $CD56^{dim}CD57^+NKG2C^+$ фенотип указывает на то, что экспрессия HLA-DR может быть в данном случае связана с так называемыми NK-клетками памяти. Функциональный тест показал, что свежевыделенные HLA-DR-позитивные NK-клетки продуцируют IFNγ интенсивнее, чем HLA-DR-отрицательные, как в субпопуляции $CD56^{bright}$, так и в субпопуляции $CD56^{dim}$.

При стимуляции свежевыделенных NK-клеток IL-2 и K562-mbIL21, но не растворимым IL-21, мы наблюдали многократное увеличение доли HLA-DR-положительных NK-клеток. Помимо увеличения экспрессии HLA-DR, большинство NK-клеток после 6 дней стимуляции демонстрировали фенотип $CD56^{bright}CD57^-NKG2A^+$, который характеризует «ранние» NK-клетки. Кроме того, после стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 NK-клетки $HLA\text{-}DR^+$ все так же демонстрировали более интенсивную продукцию IFNγ по сравнению с клетками $HLA\text{-}DR^-$.

Таким образом, как в состоянии покоя, так и после активации экспрессия HLA-DR в основном была ассоциирована с менее зрелыми NK-клетками. Однако ее также можно обнаружить *in vivo* в терминально дифференцированных NK-клетках. Происхождение и особенности данной субпопуляции $HLA\text{-}DR^+CD56^{dim}CD57^+$ еще предстоит выяснить. HLA-DR-позитивные NK-клетки как *ex vivo*, так и после стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 характеризовались повышенной способностью к продукции IFNγ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 16-34-00836.

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ФЕНОТИП ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИОЦИТОВ КОРРЕЛИРУЕТ С ТЯЖЕСТЬЮ ЗАБОЛЕВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АНТИТЕЛО-ЗАВИСИМОГО АРТРИТА У МЫШЕЙ

Жданова А.С.[1,2], Гоголева В.С.[1,2], Зварцев Р.В.[1,2], Недоспасов С.А.[1,2], Друцкая М.С.[1,2]

[1] ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание, приводящее к прогрессирующему повреждению суставных и околосуставных структур, которое характеризуется образованием аутоантител и синовиальной гиперплазией. Важную роль в процессе разрушения суставов играют фибробластоподобные синовиоциты (FLS). В норме их функция заключается в производстве внеклеточных матриксных компонентов, которые поддерживают нормальный состав синовиальной жидкости и суставную поверхность. Однако показано, что во время воспалительного процесса эти клетки приобретают патогенный фенотип (Hardy R.S. et al., 2013). Активированные цитокинами FLS являются главным источником IL-6 и других

цитокинов, хемокинов, а также молекул адгезии и металлопротеиназ, способствуя активации остеокластов, миграции и пролиферации клеток иммунной системы в очаг воспаления, что приводит к разрушению хрящевой и костной ткани (Шнайдер М.А. и соавт., 2016). Несмотря на растущий интерес к фибробластоподобным синовиоцитам и их роли в патогенезе РА, большинство работ произведено на культурах клеток, полученных от больных пациентов (Crowley T. et al., 2017). Следовательно, изучение провоспалительных свойств FLS, выделенных из мышиных суставов, *in vitro* остается актуальной проблемой и имеет особый интерес не только для лучшего понимания патологии в экспериментальных моделях воспалительных заболеваний суставов, но также может представлять интерес для изучения новых подходов антицитокиновой терапии.

Цель. Изучить патогенный фенотип FLS, выделенных из воспаленных суставов мышей, больных артритом, в сравнении с фибробластоподобными синовиоцитами, полученными от здоровых доноров.

В работе сравнивали культуры FLS, полученные от мышей дикого типа и мышей, дефицитных по TNF, в экспериментальной модели антитело-зависимого артрита. На четвертом пассаже первичные клеточные культуры стимулировали TNF и оценивали уровень экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени в культурах, полученных из здоровых и артритных мышиных суставов. Также был произведен анализ продукции IL6 культурами после стимуляции TNF и без нее методом иммуноферментного анализа (ELISA).

Было установлено, что активированные TNF фибробластоподобные синовиоциты от артритных мышей характеризуются повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии в сравнении с FLS из здоровых суставов. При этом было обнаружено, что у фибробластоподобных синовиоцитов, полученных от TNF KO мышей, в которых был индуцирован артрит, уровень продукции IL-6 значительно снижен относительно артритной культуры дикого типа, но превышает уровень его продукции у FLS из здоровых суставов, что коррелирует с отсутствием внешних признаков развития артрита и пониженной продукцией системного IL-6 у TNF-дефицитных мышей.

Полученные результаты подтверждают, что мышиные фибробластоподобные синовиоциты сохраняют патологический фенотип на протяжении нескольких пассажей, и в дальнейшем культуры FLS, полученные из артритных суставов мышей, можно использовать для изучения и создания новых подходов анти-цитокиновой терапии ревматоидного артрита.

Работа была осуществлена при поддержке РНФ 14-25-00160.

РОЛЬ КАТЕПСИНА G В МОДУЛЯЦИИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ С УЧАСТИЕМ ЛОКАЛЬНЫХ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВЫХ СИСТЕМ

Замолодчикова Т.С.[1], Толпыго С.М.[1], Свирщевская Е.В.[2]

[1] Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия
[2] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Многофункциональная сериновая протеаза иммуноцитов катепсин G (Kat G), обладающая необычной двойной трипсино- и химотрипсиноподобной специфичностью, синтезируется в нейтрофилах, моноцитах и тучных клетках. Kat G воздействует на функциональное состояние иммунных клеток, способствует миграции нейтрофилов и нейтрализации антигенов и считается фактором поддержания равновесия между защитой ткани и ее повреждением в условиях воспаления. Kat G является также компонентом ренин-ангиотензиновой системы (РАС), способен активировать ренин и обладает ангиотензин-превращающими свойствами. Ангиотензин-II (A-II) является одним из ключевых медиаторов воспаления и, в качестве иммуномодулятора, может активировать инфильтрацию иммунокомпетентных клеток, воздействовать на клеточную пролиферацию, дифференцировку и хемотаксис. Локальная РАС слизистой тонкого кишечника представлена полным набором компонентов, локализованных, преимущественно в покровном эпителии, собственной пластинке (*lamina propria*) и мышечной пластинке (*muscularis mucosae*). Клетки иммунной защиты слизистой (нейтрофилы, тучные клетки, Т-лимфоциты) экспрессируют собственную клеточную РАС. Регуляция всех уровней функциональной активности кишечника осуществляется при непосредственном участии локальной РАС. Для установления возможной роли катепсина G в модуляции иммунных реакций с потенциальным участием ренин-ангиотензиновой системы, была проведена иммуногистохимическая локализация катепсина G в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки (СОДПК) человека при отсутствии клинически выраженного воспаления и при воспалении (дуоденит II-III степени). В работе использовали моноклональные антитела к Kat G, меченые FITC и к компоненту рецептора CD14 (Novus Biologicals, USA). Биоптаты дуоденальной слизистой оболочки были получены в ходе эндоскопического обследования пациентов (диагноз – поверхностный проксимальный гастрит, дуодено-гастральный рефлюкс) с их информированного согласия.

В результате исследования были выявлены новые клеточные источники биосинтеза Kat G в СОДПК: межэпителиальные лимфоциты, лимфоциты собственной пластинки слизистой оболочки, большие глобулярные лимфоциты, кишечные макрофаги и специализированные эпителиоциты кишечных желез – клетки Панета. Биосинтез Kat G показан также в тучных клетках. В нашем исследовании мы впервые показали, что Kat G, традиционно рассматриваемый как один из эффекторов воспалительного процесса, конститутивно синтезируется в нормальной СОДПК, не имеющей клинически выраженных признаков воспаления. Полученные данные позволяют отнести Kat G к основным протеазам местного кишечного иммунитета. При воспалении уровень экспрессии катепсина G значительно возрастает за счет инфильтрата. В ходе двойного окрашивания биопсии воспалённой СОДПК антителами, специфичными к Kat G и к CD14 была выявлена ко-локализация Kat G и CD14 в значительной части иммуноцитов воспаленной слизистой оболочки, которые были идентифицированы как нейтрофилы и макрофаги. В некоторых случаях Kat G -специфическая флуоресценция обнаруживается на щеточной кайме энтероцитов и секрете бокаловидных клеток. В цитоплазме энтероцитов эпизодически встречаются мелкие гранулы, окрашивающиеся Kat G -специфическими антителами, что может быть следствием всасывания Kat G, сорбированного на щеточной кайме энтероцита путем эндоцитоза. Сорбция Kat G на щеточной

кайме и на слизистом секрете бокаловидных клеток указывает на возможность непосредственного контакта этой протеазы с имеющимися в этой зоне потенциальными субстратами, в том числе, проренином и ангиотензиногеном, что предполагает существование Кат G-зависимого пути активации локальной кишечной РАС.

Таким образом, каталитические свойства и клеточная локализация предполагают существование Кат G-зависимого пути активации локальной РАС в кишечном эпителии в норме. В условиях воспаления локальная РАС может дополняться нейтрофил-зависимой ангиотензин-генерирующей системой, инициирующей в очаге воспаления образование ангиотензинов, в том числе А-II, воздействующего на кровоток, проницаемость сосудов и инфильтрацию клеток, что, по-видимому, играет компенсаторную роль в экстремальных условиях.

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫС ПРИ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ В ЭФФЕКТОРНУЮ ФАЗУ ИММУННОГО ОТВЕТА

Зенков А.Л.[1], Годовалов А.П.[1], Шилов Ю.И.[1, 2]

[1] ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, Пермь, Россия
[2] ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, Пермь, Россия

Ранее выявлена зависимость направленности изменений иммунного ответа от тяжести экспериментального тиреотоксикоза у крыс и участие в них функциональной экспрессии бета-адренорецепторов (Годовалов А.П., Шилов Ю.И., 2009; Шилов Ю.И., Годовалов А.П., 2012). Однако изменения функций перитонеальных лейкоцитов при тиреотоксикозе изучены недостаточно.

Цель. Оценка количественного состава и фагоцитарной активности перитонеальных клеток крыс при экспериментальном тиреотоксикозе в эффекторную фазу иммунного ответа.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 33 самцах белых крыс с исходной средней массой 313±4 г. Для моделирования тиреотоксикоза ежедневно подкожно вводили L-тироксин в течение 14 дней в суточной дозе 0,04 (1-я группа) или 4 мг/кг массы тела (2-я группа) (Годовалов А.П., Шилов Ю.И., 2009; Шилов Ю.И., Годовалов А.П., 2012). Крысы контрольной группы получали растворитель гормона. На 10-е сутки от начала эксперимента всех животных сенсибилизировали эритроцитами барана (108 клеток подкожно в правую стопу). На 4-е сутки после сенсибилизации вводили разрешающую дозу антигена (109 эритроцитов подкожно в правую стопу). Через 24 ч (15-е сутки эксперимента) оценивали количественный состав перитонеальных клеток и их фагоцитарную активность по отношению к формалинизированным эритроцитам барана по ранее описанному методу (Шилов С.Ю., Шилов Ю.И., 2012). Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и критерия Дункана для множественных сравнений.

Результаты. Установлено, что у животных 1-й группы абсолютное число всех перитонеальных лейкоцитов составляет 164,2±2,7 ($p < 0,05$), у крыс 2-й группы – 104,0±8,9 ($p > 0,05$), а в контрольной группе – 132,1±15,6 млн клеток. У животных 1-й группы выявляется увеличение абсолютного числа перитонеальных лимфоцитов (85,0±5,6 млн клеток, а в контрольной – 51,6±7,7 млн клеток; $p < 0,05$). Абсолютное количество перитонеальных мононуклеарных фагоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и тучных клеток в сравниваемых группах статистически значимо не различается. При оценке фагоцитарной активности перитонеальных клеток установлено, что во 2-й группе существенно выше абсолютное число активно фагоцитирующих клеток, чем в контрольной и 1-й группах. Выявленные изменения фагоцитарной активности перитонеальных клеток связаны, в первую очередь, с изменением фагоцитарной активности мононуклеарных фагоцитов.

Заключение. Таким образом, при экспериментальном тиреотоксикозе, вызванном подкожным введением тироксина в суточной дозе 4 мг/кг массы тела, отмечается повышение фагоцитарной активности перитонеальных лейкоцитов преимущественно за счет мононуклеарных фагоцитов.

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЦИТОКИНОВЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМОЙ МЕЛАНОМЫ МЫШЕЙ

Золотарева Е.И., Златник Е.Ю., Шульгина О.Г., Новикова И.А., Быкадорова О.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Цитокиновые препараты нашли применение в комплексном лечении злокачественных опухолей, в частности меланомы, однако их введение осуществляется преимущественно системно. Тем не менее, при проведении иммунотерапии, наряду с системным действием представляется возможным использовать и локальные эффекты цитокинов, способствующие коррекции микроокружения опухоли. Кроме того, оптимизация комбинаций цитокиновых препаратов для максимального проявления их противоопухолевого и иммуномодулирующего действия рассматривается как важное направление иммунотерапии опухолей.

Цель. Разработка и экспериментальное обоснование новых методов иммунотерапии перевиваемой меланомы с применением цитокиновых препаратов.

Материалы и методы. Эксперимент поставлен на 75 мышах линии C57Bl/6 с перевиваемой меланомой B16, у которых после паратуморального введения в течение 8 дней различных комбинаций препаратов рекомбинантных цитокинов изучали динамику опухолевого роста. После эвтаназии, которую проводили через 3 дня, оценивали метастазирование в легкие и селезенку, морфологические характеристики меланомы, селезенки и тимуса, состав субпопуляций лимфоцитов в селезенке с помощью проточной цитофлюориметрии. Исследовали 6 групп животных-опухоленосителей, получавших Ронколейкин (IL-2), Ронколейкин + Доксорубицин, Ронколейкин + Ингарон (IFNγ), Ронколейкин + Ингарон + Рефнот (TNFα с тимозином), цитостатик Доксорубицин (внутрибрюшинно); контроль (физиологический раствор). Суммарные дозы препаратов рассчитывали, исходя из клинически рекомендованных в пересчете на массу тела мышей (18-20 г): Ронколейкин и Ингарон по 1200 МЕ, Рефнот 400 МЕ, доксорубицин 32 мкг.

Результаты. Оптимальной комбинацией оказалась Ронколейкин + Ингарон, которая как в ходе введения, так и после его окончания вызывает торможение роста опухоли на

30-38% по сравнению с контролем. При применении данной комбинации наблюдается выраженный (100%) антиметастатический эффект, т. е. полное отсутствие метастазов у животных, тогда как в контрольной группе они выявлены у 60% мышей в количестве 12 (9 в легких и 3 в селезенке). Торможение роста опухоли сопровождается морфологически регистрируемыми дистрофическими изменениями опухолевых клеток и выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Морфологическое исследование тимуса выявило развитое корковое вещество с плотным расположением тимоцитов, что свидетельствует об активном состоянии Т-клеточного звена иммунитета, которое подтверждается результатами субпопуляционного анализа спленоцитов: содержание Т-клеток было выше контроля (60,33±1,42% против 46,1±2,06%) за счет Th. При этом уровень Th у мышей данной группы был максимальным среди животных всех групп, составляя 47,9±1,5%, тогда как в других он колебался от 15 до 35%. Все указанные различия статистически достоверны, $p < 0,05$. По-видимому, стимуляция Т-клеточного звена в данной группе происходит преимущественно под действием Ронколейкина, который обнаруживает аналогичный эффект и при паратуморальном введении в монорежиме. Однако введение одного Ронколейкина не вызывает торможения роста опухоли и только частично ингибирует развитие метастазов. Добавление к комбинации Ронколейкин + Ингарон третьего иммуномодулятора Рефнота не приводит к дальнейшей положительной динамике: антиметастатический эффект сохраняется, но составляет 95,4% на фоне незначительного торможения роста меланомы. Сравнение групп, получавших Доксорубицин в монорежиме и Доксорубицин с Ронколейкином, показывает, что Ронколейкин усиливает торможение опухолевого роста как в процессе введения (-27 против -16,2%), так и на момент эвтаназии (-11,55 против +1,9%), но не оказывает значимого влияния на метастазирование в данной комбинации. Иммунологические показатели в комбинации Ронколейкин + Доксорубицин обнаруживают динамику, аналогичную таковой в других группах, получавших Ронколейкин (повышение уровня Т-клеток за счет Th и снижение В-клеток по сравнению с контролем), в то время как Доксорубицин вызывает депрессию Т-клеточного звена.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют об антиметастатическом и иммуномодулирующем эффекте паратуморального применения комбинации Ронколейкин + Ингарон в эксперименте, а также о целесообразности ее использования в лечении онкологических больных. Дальнейший поиск может выявить и другие эффективные сочетания иммунопрепаратов, что позволит оптимизировать цитокинотерапию и уточнить ее роль и место в комплексном лечении злокачественных опухолей, в том числе в комбинации с химиотерапией.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Зотова А.[1,3], Лопатухина Е.[1,3], Мазуров Д.[1,2,3]

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2] ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия
[3] Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Программируемые эндонуклеазы вносят разрыв в определенном участке ДНК, который подвергается репарации в клетках по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ), что, как правило, приводит к нокаутированию гена, или по механизму гомологичной рекомбинации (HDR), если присутствует ДНК-донор, который точно замещает участок поврежденного генома (knock-in). Редактирование генома лимфоидных клеток человека представляет собой сложную задачу из-за низкой трансфекционной способности этих клеток. Дополнительные трудности вносит неэффективная репарация ДНК-разрывов путем HDR. Тем не менее, интерес к редактированию генома лимфоидных клеток не угасает, что связано, прежде всего, с необходимостью лечения различных наследственных иммунодефицитов и ВИЧ-инфекции.

Перед нами стояла задача оценить эффективность и динамику получения нокаута и нокина в линиях Т- и В-клеток человека посредством изменения матрицы для репарации ДНК, локусов ДНК-мишеней и типов геномных нуклеаз. Используя нуклеазу, содержащую домены «цинковых пальцев» (ZFN), мы сконструировали клеточные линии Jurkat и CEM с геномом вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1), интегрированным в локус AAVS1. При дополнительной трансфекции вспомогательными векторами такие клетки стабильно производят вирусные частицы. Также было показано, что применение как ZFN, так и CRISPR/Cas9 технологии в равной степени эффективно для получения нокаутов в лимфоидных клетках. Однако нами было отмечено значительное снижение on-target активности высокоточной нуклеазы eCas9 1.1, работающей как никаза. Таким образом, для изучения функциональной роли генов в лимфоидных клетках необходимо учитывать баланс между эффективностью нуклеазы в отношении целевого гена и ее off-target (побочной) активностью.

Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ «Поиск новых факторов рестрикции ВИЧ-1, ограничивающих репликацию вируса в условиях его межклеточной трансмиссии, путем скрининга библиотеки нокаутов GeCKO» 15-15-00135.

ОЦЕНКА УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ

Зурочка А.В.[1,2], Зурочка А.В.[1,2], Дукардт В.В.[1], Зуева Е.Б.[1], Добрынина М.А.[1], Тяпаева Я.В.[3], Гриценко В.А.[3,4]

[1] ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (Национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия
[3] ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН, Оренбург, Россия
[4] ФГБУН «Оренбургский научный центр» УрО РАН, Оренбург, Россия

Введение. Инфицирование тканей макроорганизма бактериальными агентами сопровождается развитием воспалительной реакции, в регуляции которой участвуют различные цитокины, вырабатываемые клетками иммунной системы. В то же время в опытах *in vitro* нами было показано, что бактерии и супернатанты их бульонных культур при контакте с нейтрофилами существенно влияют на продукцию фагоцитами цитокинов, причем направленность (стимулирование/ингибирование) и выраженность этих эффектов зависели от видовой принадлежности микроорганизмов

(Зурочка А.В. и соавт., 2016). Учитывая выявленное разнообразие модифицирующего действия бактерий и их супернатантов на нейтрофилы, мы предположили, что подобное влияние может быть связано с синтезом самими микроорганизмами ряда цитокинов (цитокиноподобных веществ – ЦПВ). Цель работы – проверка данного предположения.

Материалы и методы. В опытах использовали 65 клинических изолятов *Staphylococcus aureus* (n = 23), коагулазоотрицательных стафилококков (КОС) – *S. haemolyticus* и *S. epidermidis* (n = 14), *Enterococcus faecalis* и *E. faecalis* (n = 8), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* (n = 12), выделенный из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из влагалища у женщин с миомой матки, из пустул у новорожденных с пиодермией. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокинов (ЦПВ) определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1β, TGF-α); контролем служил МПБ без бактерий. Опыты проводили в двух повторностях; результаты измерений округляли до 0,1 пкг/мл; при регистрации в супернатантах цитокинов в концентрации меньше 3 пкг/мл считали, что в образце ЦПВ отсутствуют. Данные обработаны методами вариационной статистики.

Результаты. Установлено, что в супернатантах бульонных культур бактерий обнаруживаются те или иные ЦПВ, наличие и концентрация которых зависели от видовой/родовой принадлежности микроорганизмов. Наиболее активными продуцентами ЦПВ оказались штаммы *S. aureus*, в супернатантах которых присутствовали 13 из 15 тестируемых цитокинов (все, кроме IL-5 и TGF-α); бактерии остальных таксонов в порядке убывания числа продуцируемых ЦПВ распределились в ряд: КОС (7 цитокинов – G-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-12p70, IL-17A, IL-1β, MIP-1β), энтерококки (4 – G-CSF, IFNγ, IL-12p70, IL-17A), энтеробактерии и псевдомонады (1 – G-CSF). В то же время наблюдалось внутривидовое разнообразие бактерий по наличию и концентрации в супернатантах ЦПВ – доля штаммов-продуцентов с учетом их вида и типа ЦПВ колебалась в диапазоне 4,3-83,3%, а уровни варьировали от 3,3 до 239,6 пкг/мл. При этом максимальные (штаммовые и средние) значения концентраций ЦПВ регистрировались у изолятов *S. aureus* и *S. haemolyticus*. Следует отметить, что 5 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-12p70, IL-17A) тестировались в супернатантах у ряда изолятов *S. aureus, S. haemolyticus* и *E. faecalis* в относительно высоких концентрациях (> 20 пкг/мл), другие ЦПВ в изученных образцах либо не обнаруживались, либо их уровень был ниже указанного порога.

Заключение. У изученных грамположительных и грамотрицательных бактерий в супернатантах бульонных культур выявляется ряд цитокинов (цитокиноподобных веществ – ЦПВ), причем их продукция (наличие и уровень) зависит от таксономической принадлежности микроорганизмов и характеризуется внутривидовой вариабельностью. Наиболее активными продуцентами ЦПВ являются стафилококки (*S. aureus* и КОС, в частности *S. haemolyticus*), которые способны синтезировать 7-13 цитокинов, причем 5 из них (G-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-12p70, IL-17A) в относительно высоких концентрациях (> 20 пкг/мл). Учитывая принадлежность указанных цитокинов к провоспалительным и ростовым факторам, нельзя исключить их причастность к развитию начальных этапов воспалительной реакции при инфицировании тканей макроорганизма цитокин-продуцирующими бактериями, в частности путем ранней активации иммунокомпетентных клеток, что требует дальнейшего изучения данного феномена. С другой стороны, необходимо выяснить структурно-молекулярное сходство/различие ЦПВ бактерий с цитокинами макроорганизма, определить их генетическое детерминирование, эволюционное происхождение и роль в биологии прокариотов, а также их участие в формировании патогенного потенциала микроорганизмов.

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА GM-CSF НА ПРОДУКЦИЮ БАКТЕРИЯМИ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ В БУЛЬОННЫХ КУЛЬТУРАХ

Зурочка В.А.[1, 2], Зурочка А.В.[1, 2], Дукардт В.В.[1], Зуева Е.Б.[1], Добрынина М.А.[1], Тяпаева Я.В.[3], Гриценко В.А.[3, 4]

[1] ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (Национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия
[3] ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН, Оренбург, Россия
[4] ФГБУН «Оренбургский научный центр» УрО РАН, Оренбург, Россия

Введение. В очаге воспаления бактериальные агенты неминуемо вступают во взаимодействие с различными регуляторными молекулами макроорганизма, в том числе цитокинами, которые могут не однозначно влиять на их жизнеспособность и биологические свойства. Так, нами экспериментально показано, что синтетический пептид активного центра GM-CSF оказывал ингибирующее действие на репродуктивный потенциал некоторых бактерий (в частности стафилококков) и их биопленкообразование (Зурочка А.В. и соавт., 2015; Гриценко В.А. и соавт., 2015). В то же время в предварительных опытах нами выявлена способность клинических изолятов *Staphylococcus aureus* и ряда других бактерий экскретировать в культуральную среду цитокиноподобные вещества (ЦПВ), с наличием которых, возможно, связано разнонаправленное модифицирующее действие бактерий и их супернатантов на продукцию нейтрофилами широкого спектра цитокинов (Зурочка А.В. и соавт., 2016). Это послужило основанием для изучения влияния синтетического пептида активного центра GM-CSF на продукцию бактериями ЦПВ.

Материалы и методы. В опытах использовали 28 клинических изолятов *S. aureus* (n = 14), *Enterococcus faecalis* и *E. faecalis* (n = 8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* (n = 6), выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из влагалища у женщин с миомой матки, из пустул у новорожденных с пио-

дермией. Бактерии выращивали в течение 24 часов в мясопептонном бульоне (МПБ) с синтетическим пептидом активного центра GM-CSF (в конечной концентрации 10 мкг/мл) и без него, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут и отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокинов (ЦПВ) и их уровень определяли на приборе MAGPIX-100 (USA) с использованием тест-системы мультиплексного анализа (Multiplex) компании Luminex (USA) для определения 15 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1,MIP-1β, TGF-α); контролем служил МПБ без бактерий. Опыты проводили в двух повторностях; результаты измерений округляли до 0,1 пкг/мл; при регистрации в супернатанте цитокинов в концентрации меньше 3 пкг/мл считали, что в образце ЦПВ отсутствуют. Данные обработаны методами вариационной статистики. О достоверности отличий между опытными и контрольными группами судили по критерию Стьюдента – t ($p < 0,05$).

Результаты. Добавление в МПБ синтетического пептида активного центра GM-CSF по-разному влияло на продукцию ЦПВ бактериями в зависимости от их видовой/родовой принадлежности. Так, при наличии в среде данного пептида у всех культур энтерококков регистрировалось снижение в супернатантах уровня продуцируемых ими ЦПВ (G-CSF, IFNγ, IL-12p70, IL-17A) на 58,5-98,3%, тогда как у энтеробактерий (*K. pneumoniae* и *E. coli*) уменьшение концентрации G-CSF наблюдалось только у 33,3% культур, а у остальных изолятов фиксировалось повышение уровня указанного ЦПВ в 2,2-2,5 раза. Среди изолятов *S. aureus* реакция на синтетический пептид GM-CSF была еще более вариабельной и касалась всех продуцируемых ими ЦПВ (G-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, MCP-1, MIP-1β). С учетом изменения под действием пептида концентрации ЦПВ в супернатантах культур *S. aureus* выделено 3 группы изолятов: 1 – 7,1-42,9% штаммов, у которых наблюдалось снижение продукции указанных ЦПВ (в среднем на 15,0-65,8%); 2 – 7,1-57,1% штаммов, у которых уровень ЦПВ существенно не изменялся (±10% от контроля – индифферентность); 3 – 35,7-64,3% штаммов, у которых фиксировалось повышение концентрации ЦПВ (в 1,4-3,6 раза; $p < 0,05$). Эта же закономерность касалась и тех ЦПВ (G-CSF, IFNγ, IL-12p70, IL-17A), которые секретировались *S. aureus* в контроле на относительно высоком уровне (> 20 пкг/мл) – их продукция под действием синтетического пептида GM-CSF у одних изолятов бактерий стимулировалась в 1,4-2,3 раза, у других – ингибировалась на 15,0-32,6%.

Заключение. Анализ полученных данных свидетельствует, что присутствие в питательной среде синтетического пептида активного центра GM-CSF отражается на способности грампозитивных и грамнегативных бактерий продуцировать цитокиноподобные вещества (ЦПВ), а направленность и выраженность этой реакции на пептид характеризуются не только видовой/родовой детерминированностью, но и штаммовой вариабельностью. Следует отметить, что большинство изолятов *S. aureus*, у которых под влиянием пептида наблюдалась стимуляция выработки ЦПВ, были выделены из ран у больных с синдромом диабетической стопы. Изучение механизмов продукции бактериями ЦПВ и её регуляции синтетическим пептидом активного центра GM-CSF должно стать предметом дальнейших исследований.

ЗАВИСИМОСТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МАКРОФАГОВ ОТ СТРУКТУРЫ ИМПЛАНТИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Калмыкова Н.В., Демьяненко И.А., Хац Ю.С., Суслов А.П.

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

При контакте макрофагов с имплантируемым материалом происходит их активация и последующая поляризация на два подтипа – классически активированных М1 и альтернативно активированных М2. Так как одной из основных проблем регенеративной медицины и трансплантологии является ответ организма хозяина на введенный материал, то поляризация макрофагов крайне важна, так как именно соотношение подтипов М1/М2 в зоне введения определяет выраженность воспаления, деградацию материала и скорость регенерации ткани. В литературе имеется множество данных о связи поляризации иммуногенеза с физическими и механическими свойствами имплантируемого, но мало известно о зависимости поляризации от морфологической структуры. В настоящей работе было изучено влияние структуры имплантируемого материала на вызываемый им макрофагальный ответ, а именно на соотношение М1 и М2 подтипов макрофагов.

Цель. Исследовать дифференцировку макрофагов на подтипы М1 и М2 при имплантации разных структурных форм биоматериала на основе очищенного внеклеточного матрикса (ВКМ), полученного методом щелочной обработки дермы быка домашнего.

Для анализа тканевой реакции мышам (n = 48) делали подкожные инъекции исследуемых образцов в область спины. Животным опытной группы вводили биоматериал на основе очищенного ВКМ в форме геля и в форме порошка с жидким компонентом глюкозой для удобства введения. Гель представляет собой солюбилизированный матрикс, а порошок – измельченный матрикс с сохраненной структурой пучков волокон и волокон с размером частиц не более 500 мкм. Животным контрольной группы вводили аналогичный объем 10% раствора глюкозы. На 1-е и 5-е сутки после инъекций мышей выводили из эксперимента и проводили иссечение участков кожного лоскута, содержавших имплантированный образец. На срезах кожного лоскута проводили иммуногистохимическое выявление специфического макрофагального антигена f4/80, а также антигенов, характерных для различных подтипов макрофагов: для М1 – CCR7, для М2 – CD163, при этом характеризовали соединительную ткань, располагающуюся между *panniculus carnosus* и имплантатом и дерму. Исследовали по 20 полей зрения для каждого животного.

Результаты исследования показали, что количество М1 макрофагов в соединительной ткани зоны имплантации порошка ВКМ статистически достоверно больше, как на 1-е, так и на 5-е сутки после введения, по сравнению с контрольной группой. Также было обнаружено увеличение числа М2 макрофагов на 5-е сут в дерме прилежащей кожи в той же группе. Кроме того, было выявлено статистически достоверное увеличение соотношения М1/М2 на 1-е сутки в соединительной ткани, окружающей порошок ВКМ. Количество макрофагов в группе имплантации геля статистически не отличалось от контроля на обоих исследованных сроках.

Полученные данные свидетельствуют об интенсификации макрофагальной реакции в коже при субдермальном введении ВКМ в форме порошка.

ПЕРСПЕКТИВЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Калошин А.А., Солдатенкова А.В., Зимина Е.М., Михайлова Н.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Одним из наиболее серьезных возбудителей оппортунистических инфекций является синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*). Этот микроорганизм характеризуется высокой способностью к быстрому развитию резистентности к антибиотикам, что делает неэффективными общепринятые методы лечения. Поэтому актуальным является разработка иммунобиологических препаратов для борьбы с синегнойными инфекциями. Создание вакцин на основе протективных антигенов возбудителя пока не увенчалось положительными результатами из-за технологических трудностей выделения целевых антигенов, что преодолимо с использованием генно-инженерных методов.

Ранее показано, что рекомбинантный белок F наружной мембраны (OprF) *P. aeruginosa* и делеционная форма экзотоксина А (анатоксин) *P. aeruginosa* способствовали защите иммунизированных мышей от экспериментальной внутрибрюшинной синегнойной инфекции. При этом комплексное введение обоих белков приводило к увеличению защитных свойств. Поэтому представляло интерес получение слитного рекомбинантного белка, включающего аминокислотные последовательности OprF и анатоксина. С этой целью ген, кодирующий белок OprF, встраивали в рекомбинантную конструкцию на базе плазмиды pET28b$^+$, несущей ген анатоксина. В результате экспрессии в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) созданной конструкции был синтезирован слитый рекомбинантный белок OprF-анатоксин, который хроматографически очищали на никель-активированном сорбенте. В иммуноблоттинге этот белок специфично реагировал с иммунными сыворотками к отдельным рекомбинантным белкам (OprF и анатоксину). Далее с целью увеличения спектра антигенных детерминант в плазмидную конструкцию был встроен ген еще одного мембранного белка *P. aeruginosa* (OprI). В результате получен слитый рекомбинантный белок OprF-анатоксин-OprI с молекулярной массой 107,2 кДа, специфично реагирующий в иммуноблоттинге с сыворотками к рекомбинантным белкам OprF, OprI и анатоксину. Содержание целевого рекомбинантного продукта в очищенном препарате, составляло 96,4%, что подтверждено капиллярным электрофорезом.

Оценку защитных свойств полученных слитых рекомбинантных белков проводили при двукратном, с двухнедельным интервалом, внутрибрюшинном введении мышам в дозах 50 и 100 мкг на животное. В качестве препарата сравнения использовали комплекс из отдельных рекомбинантных белков: OprF и анатоксина.

Через две недели после курса иммунизации мышей заражали живой вирулентной культурой *P. aeruginosa* штамма PA103 и далее в течение недели проводили подсчет погибших особей. Для животных, иммунизированных слитым белком OprF-анатоксин в дозе 50 мкг, $ЛД_{50}$ составила 40,61 млн м.к. (млн микробных клеток), а в дозе 100 мкг – 32,99 млн м.к. В группах животных, иммунизированных слитым белком OprF-анатоксин-OprI в дозе 50 мкг, $ЛД_{50}$ составила 53,59 млн м.к., а в дозе 100 мкг – 35,36 млн м.к. Для мышей, иммунизированных комплексом двух рекомбинантных белков, значение $ЛД_{50}$ соответствовало 46,65 млн м.к., а для контрольных животных $ЛД_{50}$ соответствовала 15,39 млн м.к.

Таким образом, полученные результаты открывают перспективы для создания иммунобиологических препаратов на основе рекомбинантных белков. В дальнейшем для выбора наиболее эффективной вакцины целесообразно более глубокое изучение влияния рекомбинантных препаратов на индукцию специфического иммунного ответа.

КРАТКОСРОЧНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ С РЕЛЬЕФНЫМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫМ ВЛИЯНИЕМ ОПСОНИЗАЦИИ НА ФАГОЦИТОЗ МИКРОБАКТЕРИЙ МАКРОФАГАМИ У МЫШЕЙ С РАЗНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ТУБЕРКУЛЕЗУ

Капина М.А., Рубакова Э.И., Логунова Н.Н., Майоров К.Б., Апт А.С.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Опсонизация – это биологический процесс прикрепления опсонинов, которыми являются белки плазмы крови или их фрагменты, к поверхности бактерий или вирусов, что обусловливает более легкое распознавание и захват их фагоцитами. К опсонинам, в частности, относятся молекулы антител (преимущественно, IgG и IgM), фрагменты компонентов комплемента, С-реактивный белок. Важность опсонизации при фагоцитозе микобактерий была показана в работах с антителами к арабиноманнану: инкубация микобактерий с антителами перед заражением животных снижала тяжесть течения инфекции (Hamasur B. et.al., 2004).

В нашей работе мы исследовали влияния опсонинов крови мышей генетически чувствительных и резистентных к туберкулезу (ТБ) линий на способность макрофагов фагоцитировать *M. tuberculosis* H37Rv. При отработке методов сыворотку крови здоровых и зараженных микобактериями H37Rv мышей резистентной линии B6 в разных процентных соотношениях (от 20 до 1,25 %) добавляли к микобактериям и инкубировали в течение 30 минут при 4 °С. После инкубации микобактерии добавляли к культуре выделенных из брюшной полости макрофагов в соотношении 1:5 (одна бактерия на 5 макрофагов) и оценивали фагоцитарную активность под микроскопом по окраске аурамином микобактерий, захваченных макрофагами. Результат оценивали по подсчету фагоцитарного числа (процент инфицированных клеток) и фагоцитарного индекса (среднее число микобактерий на инфицированный макрофаг). Наивысшие значения были получены при содержании сыворотки 1,5 – 5%, как от здоровых, так и от инфицированных мышей. В последующих экспериментах для опсонизации использовали 3-процентное содержание сыворотки. Помимо этого, мы оценили влияние опсонизации на жизнеспособность фагоцитированных бактерий по включению радиоактивного урацила микобактериями. При опсонизации 3-процентной сывороткой включение урацила было самым низким, что подтверждает благоприятное значение опсонизации для

организма-хозяина: после предварительного контакта с факторами плазмы крови внутриклеточные микобактерии размножаются хуже. После обработки микобактерий сывороткой, полученной от зараженных ранее мышей, рост микобактерий в макрофагах снижался в 3,5 раза по сравнению с микобактериями, обработанными не иммунной сывороткой, скорее всего, из-за присутствия в иммунной сыворотке специфичных к микобактериям антител.

В последующих экспериментах мы сравнили активность сывороток, полученных от мышей B6 и от выведенных в нашей лаборатории рекомбинантных конгенных линий мышей B6.I-9.3, B6.I-139 и B6.I-100, отличающихся по коротким фрагментам комплекса H2, которые были перенесены от чувствительной к ТБ линии I/St на генетическую резистентных мышей B6, в результате чего эти линии приобрели разную чувствительностью к ТБ (Logunova et al., 2015). Результаты показали, что при опсонизации микобактерий сывороткой более высокий фагоцитарный индекс давали сыворотки резистентных линий B6.I-139 (1, 68) и B6.I-9.3 (1,31) по сравнению с сывороткой чувствительной линией B6.I-100 (0,55). По фагоцитарному числу достоверных различий не наблюдалось.

Возможно, еще один из механизмов, определяющих восприимчивость мышей к туберкулезу – это эффективность опсонизации микобактерий, которая влияет на эффективность фагоцитоза.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 15-15-30020 (клеточные культуры) и гранта РФФИ 15-04-02002 (выведение и поддержание конгенных линий мышей).

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МОБИЛЬНОГО ТЕЛЕФОНА НА АКТИВАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ ДОНОРОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В ПОСТВАКЦИНАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Капустин И.В.[1], Тульская Е.А.[1, 2], Бляхер М.С.[1], Лопатина Т.К.[1], Котелева С.И., Нестеренко В.Г.[3], Суслов А.П.[3], Коноплёва М.В.[3]

[1] ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[3] ФГБУ ««Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Вопрос о влиянии электромагнитного излучения (ЭМИ) мобильных телефонов на разные функции организма привлекает внимание исследователей, работающих в разных областях науки – генетиков, онкологов, гериатров, иммунологов. Изучение этих вопросов проводится с использованием разных методических подходов в опытах *in vitro* или *in vivo*, с использованием в качестве источника ЭМИ либо разных моделей мобильных телефонов, либо имитирующих их искусственно созданных систем.

Цель. Сравнение чувствительности клеток периферической крови людей до и после вакцинации к воздействию ЭМИ мобильного телефона.

Материалы и методы. Объектом исследования служили цельная венозная кровь и выделенные из нее лимфоциты 21 взрослого донора (от 20 до 55 лет): 10 – это здоровые доноры и 11 человек, через 7 дней после вакцинации их менингококковой, полисахаридной (серогрупп A, C, Y и W-135), коньюгированной с дифтерийным анатоксином вакциной. Исследование влияния ЭМИ телефона на функциональную активность лимфоцитов периферической крови проводили следующим образом – лимфоциты или клетки цельной крови помещали в лунки культуральных планшетов, на планшеты воздействовали мобильным телефоном, принимавшем звонки на протяжении 5 часов, далее среди лимфоцитов определяли % $CD69^+$ лимфоцитов, а в надосадках – концентрацию IFNγ, TNFα, IL-6 и IL-8. По разнице этих величин в культуре клеток до и после воздействия ЭМИ телефона судили о наличии или отсутствии его воздействия на эти показатели.

Результаты. Состояние иммунной системы людей из группы здоровых доноров и доноров, которые в дальнейшем подверглись вакцинации, практически не отличалось и все показатели находились в пределах возрастной нормы. Через неделю после вакцинации наблюдались значимые отличия практически по всем основным субпопуляциям, которые выражались в повышении абсолютного количества лейкоцитов и лимфоцитов. Кроме того, процент активированных цитолитических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$), несущих разные активационные маркеры, через неделю после прививки имел тенденцию к снижению: % CD69 с 4,9±2,9 до 2,2±1,0; % HLADR с 4,1±1,5 до 2,5±0,8. Таким образом, в эксперименте были использованы клетки крови практически здоровых доноров и доноров, иммунная система которых была изменена под влиянием вакцины, т.е. в большей степени синхронизирована.

В результате исследования воздействия ЭМИ мобильного телефона на клетки крови выявлено, что изменение процента лимфоцитов, несущих ранний маркер активации CD69, наблюдали существенно чаще и с большей интенсивностью в группе доноров, находившимися в поствакцинальном периоде по сравнению со здоровыми донорами. Под воздействием ЭМИ телефона средние значения продукции изученных цитокинов не изменялись в образцах супернатантов в обеих группах, но у здоровых доноров были в 1,5 – 2 раза выше, чем у людей в поствакцинальном периоде. Продукция всех цитокинов клетками крови существенно чаще и с большей интенсивностью изменялась под влиянием ЭМИ телефона в группе здоровых доноров по сравнению с донорами, находящимися в поствакцинальном периоде. Продукция IFNγ клетками крови изменилась у 3 здоровых доноров (в среднем в 3,5 раза, а у одного человека – в 6,5 раз) и у 2 вакцинированных (в среднем в 1,4 раза, такого сильного изменения, как у здоровых доноров не было), т.е. интенсивность этих изменений была принципиально разная; продукция TNFα клетками крови изменилась у 5 здоровых доноров (в среднем в 1,9 раз, а у отдельных людей до 3,5 раз) и у 2 вакцинированных (в 1,4 раза), т.е. и в данном случае интенсивность этих изменений была IFNγ разная; продукция IL-6 клетками крови изменилась у 5 здоровых доноров (в среднем в 2 раза, а у отдельных индивидуумов – в 4 раза) то время, как этот показатель изменился под влиянием ЭМИ телефона только у одного вакцинированного (в 2,5 раза); продукция IL-8 клетками крови изменилась

у 7 здоровых доноров (в среднем в 3 раза, а у отдельных индивидуумов – в 5 раз) и у 4 вакцинированных (в среднем в 2,5 раза, но не более, чем в три раза).

Заключение. Основной вывод по результатам данного исследования заключается в том, что изменение продукции цитокинов клетками крови под воздействием ЭМИ телефона происходит индивидуально; это следует учитывать при решении вопроса о наличии или отсутствии влияния ЭМИ телефона на состояние лимфоцитов.

ОЦЕНКА ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛИНИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАК-РЕЗУС (*MACACA MULATTA*) АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА

Карал-оглы Д.Д., Игнатова И.Е., Мухаметзянова Е.И., Гварамия И.А., Агрба В.З.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», Сочи, Россия

Введение. Широко известно, что филогенетическое родство представителей отряда приматов делает обезьян адекватной моделью для воспроизведения на них различных патологических состояний человека. Данные, полученные на обезьянах, с минимальной коррекцией можно экстраполировать на людей, для чего необходимы точные сведения о функционировании их физиологических систем в норме.

Цель. Изучение в комплексе кроветворной и иммунной систем макаков-резусов Адлерского питомника,животных, наиболее востребованных в экспериментальной медицине. Все исследования на животных проводили в соответствии с требованиями комитета по биоэтике и федеральным законом РФ о защите животных от жестокого обращения (ст.4 Закона РФ о защите животных от жестокого обращения от 01 декабря 1999 г.).

Материалы и методы. Материалом для исследования служила цельная кровь, взятая в гепарин, а также сыворотка крови 30 макаков-резусов обоего пола в возрасте от 3 до 5 лет. В эксперименте были использованы следующие методы:

1. Метод проточной цитометрии на проточном цитометре Beckman Coulter EpicsXL-MCL (Beckton Coulter, США) с аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Для постановки реакции использовали моноклональные антитела (фирма «BectonDickinson»),специфичные для антигенов обезьян, в следующих комбинациях:CD3 – FITC/CD4-PE,CD3 – FITC/CD8-PE,CD3 – FITC/CD16-PE,CD3 – FITC/CD20-PE, CD3 – FITC/CD25-PE,CD3 – FITC/CD45RA,CD3 – FITC/HLA-DR. Цитограммы исследуемой клеточной взвеси выводили на основе регистрируемых параметров малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

2. Гематологический анализ крови обезьян проводили на гематологическом анализаторе фирмы «Beckman 5 diff»,USA.

3. Исследование функциональной активности лимфоцитов обезьян (IFNα, IFNγ, спонтанная продукция и циркулирующий в сыворотке IFN) изучали биологическим методом в нашей модификации путем определения способности лимфоцитов обезьян отвечать интерфероновой реакцией на адекватное воздействие.

4. Определение провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, TNFα) и С-реактивного белка проводили методом ИФА на приборе «УНИПЛАН» с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест».

Результаты. Показатели клеточного звена иммунитета клинически здоровых обезьян варьировали в широких пределах, отмечалось, что экспрессия CD3, CD4 и CD45RA у самцов незначительно выше, а экспрессия CD8 ниже, чем у самок. Данные, полученные на макаках-резусах как для самцов, так и для самок, максимально приближены к границам нормы таковых у людей, за исключением CD20, показатели которого колеблются от 12,75±8,25% у самцов и 13,45±9,55% у самок.

Поскольку результаты гематологического исследования позволяют выявить различные патологии и заболевания, представляло интерес оценить гематологические показатели клинически здоровых макаков-резусов Адлерского питомника. Исследование показало, что результаты гематологического анализа существенно не отличаются от таковых, установленных для людей и соответствуют данным, описанным раннее, за исключением повышенного содержания лейкоцитов – $14,6\pm6,5 \times 10^9$/л и низкой СОЭ-1-3 мм/ч по сравнению с человеком, что является характерным для приматов и объясняется лабильностью их физиологических показателей.

Исследование показателей интерферонового статуса выявило вариабельность в продукции некоторых интерферонов между самцами и самками обезьян, однако эти значения не выходили за рамки нормативных величин, установленных для людей (IFNα – 160±32Ед/мл, IFNγ – 48±16 Ед/мл, IFN-сп – 4±2Ед/мл, IFN-S – 4±2Ед/мл) и соответствует ранее установленным для макаков-резусов.

В настоящее время определение цитокинов достаточно широко используется в клинической практике, поскольку их количественное определение и соотношения между собой, как правило, отражают динамику патологического процесса, коррелируют с активностью заболевания и позволяют судить об эффективности проводимого лечения. Однако при этом необходимо четко знать «референтные» уровни цитокинов, свойственные здоровым животным. Полученные результаты показали, что содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови клинически здоровых половозрелых макаков-резусов обоего пола максимально приближено к нормам, установленным для людей. Колебания значений С-реактивного белка от 0,4 до 9,6 мг/мл объясняется вариабельностью многих показателей у обезьян.

Таким образом, в результате проведенных исследований были установлены гематологические показатели, изучены клеточное звено иммунитета, интерфероновый статус, определены провоспалительные цитокины и С-реактивный белок у клинически здоровых макаков-резусов Адлерского питомника. Показано, что исследованные показатели макаков-резусов максимально приближены к аналогичным у людей, что еще раз подтверждает возможность использования обезьян этого вида как адекватной модели для воспроизведения и изучения различных патологических состояний человека, а также доклинических испытаний новых фармакологических препаратов.

АНТИИДИОТИПИЧЕСКАЯ ВАКЦИНАЦИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТОИММУННОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ

Кащенко Э.А., Белогородцев С.Н., Селедцова Г.В.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Введение. Ключевую роль в патогенезе рассеянного склероза (РС) играют Т-лимфоциты, реактивные по отношению к поверхностным антигенам клеток нервной ткани. Показано, что адоптивный перенос активированных миелин-реактивных Т-клеток приводит к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у животных. Аутореактивные $CD4^+$Т-клетки продуцируют провоспалительные цитокины (IL-2, TNFα, IFNγ), которые поддерживают в ЦНС миелин-деструктивный воспалительный процесс. Является очевидным то, что элиминация аутоиммунных Т-лимфоцитов из организма должна лежать в основе патогенетического лечения рассеянного склероза (РС). Один из способов решения этой задачи связан с возможностью стимуляции антиидиотипического иммунного ответа, направленного на идиотипы рецепторов аутореактивных лимфоцитов. Вакцинация миелин-реактивными Т-клетками животных с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом приводит к остановке развития аутоиммунного демиелинизирующего процесса. Т-клеточная делеция является следствием литической активности антиклонотипических $CD8^+$Т-клеток, которые специфически распознают идиотипические структуры Т- клеточных рецепторов. Т- клеточная вакцинация также вызывает генерацию анти-клонотипических $CD4^+$Т-клеток, которые в активированном состоянии продуцируют противовоспалительные цитокины IL-4 и IL-10.

Цель. Разработать Т-клеточную вакцину на основе аутореактивных эффекторных Т-лимфоцитов в экспериментальной модели аутоиммунного энцефаломиелита, и оценить ее субпопуляционный состав.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на взрослых (4-5 месяцев) апатогенных мышах линии C57BL/6 (B6, H-2^b). Мышей иммунизировали подкожно смесью корпускулярного антигена головного мозга свиньи с основным белком миелина в адъюванте Фрейнда в дозе 100 мкг на мышь, на 0, 21 и 28 дни. Оценка неврологического дефицита проводилась по бальному индексу ЭАЭ. На 35 день у животных производили забор селезенки. Для приготовления антиидиотипической вакцины спленоциты культивировали с основным белком миелина в дозе 100 мкг/мл в течение недели. Затем спленоциты облучали и использовали в качестве антиидиотипической вакцины. Для оценки поверхностных маркеров пробы подвергали исследованию в проточном цитофлюориметре фирмы ,Becton Dikinson (США) с определением относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих соответствующий CD-маркер, среди 10000 просчитанных клеток. Специфичность пролиферативного ответа полученной культуры спленоцитов в отношении белков миелина подтверждали в пролиферативном тесте. Уровень пролиферативной клеточной активности определяли, используя стандартную процедуру, включавшую перенос клеток на стекловолоконный фильтр и учет радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционного b-счетчика. Индекс стимуляции (ИС) вычисляли по формуле: ИС = опыт (имп/мин) / контроль (имп/мин). Через 2,5 месяца после начала индукции ЭАЭ проводили курс экспериментальной терапии. Мыши получали однократную подкожную инъекцию антиидиотипической вакцины в дозе $5x10^6$ клеток/мышь или 100 мкг/мл ОБМ п/к. Статистическую обработку результатов проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни и критерия Каплан и Майер.

Результаты. Показано достоверное ($P < 0,001$) увеличение количества $CD4^+$ в Т-клеточной вакцине (с 21,8±1,2 до 28,2±2,3, $P < 0,01$). Отмечен 30% прирост абсолютного количества $CD4^+CD44^+$ и $CD8^+CD44^+$Т-клеток памяти в пуле $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клеток со сдвигом в сторону увеличения центральных $CD8^+CD44^+CD62L^+$Т-клеток памяти, обладающих цитотоксическим потенциалом. Количество активированных регуляторных клеток в Т-клеточной вакцине увеличивалось в разы при стимуляции антигеном (с 0,54±0,4 до 10,5±3,1 $P < 0,001$). Показано уменьшение неврологической симптоматики у мышей как при лечении Т-клеточной вакциной, так и при использовании антигена в качестве иммунизирующего агента, зафиксировано снижение индекса ЭАЭ через две недели после начала лечения Т-клеточной вакциной в четыре раза (с 2,71±0,36 до 0,57±0,4).

Заключение. Несмотря на наличие клинического улучшения у мышей, мы не отметили значимых изменений параметров Т-клеточного иммунитета в процессе лечения Т-клеточной вакциной. Дальнейшая работа будет посвящена поиску подходов в увеличении количества Т-регуляторных клеток и снижении количества Т-клеток памяти в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ИНТРАГАСТРАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ИНДИГЕННОГО ШТАММА *E. COLI* У САМЦОВ И САМОК КРЫС ЛИНИИ SPRAGUE DAWLEY

Козловская Г.В., Козловский Ю.Е., Силаенкова М.М., Пономаренко Е.А., Косырева А.М.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Цель. Изучение особенностей реации иммунной системы и микробиома кишечника на интрагастральное введение потенциального пробиотического штамма *E. coli* ЕВ.

Материалы и методы. Уровни экспрессии генов провоспалительных цитокинов в печени, селезенке и кишечнике самцов и самок крыс линии Sprague Dawley определяли методом количественной ПЦР на Rotor Gene 6000. Изменения качественного и количественного состава микробиома кишечника контрольных и опытных животных определяли посредством бактериологического анализа и методом qPCR путем амплификации специфических для каждого таксона последовательностей гена 16S rRNA. Для выделения нуклеиновых кислот, реакций ПЦР и обратной транскрипции использовали реактивы фирм Евроген, Изоген и ДНК-технологии. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.

Было установлено, что интрагастральное введение штамма *E. coli* ЕВ (2 недели, в дозе 5×10^9 живых бактерий)

не приводило к значительному изменению иммунного статуса животных, но выявило гендерные различия по показателю уровня продукции IL-2, IL-10 и IL-4, обусловленные действием изучаемого штамма. Анализ просветной и пристеночной микрофлоры подопытных животных продемонстрировал ряд изменений в качественном и количественном составе микробиома, выразившиеся в а) увеличении общего количества микроорганизмов в ЖКТ на 1 порядок; б) уменьшении титра Bifidobacterium в 13 раз; в) увеличении содержания индигенных *Lactobacillus* в 12,5 раз; г) увеличении количества представителей рода Enterococcus на 1 порядок. Все указанные изменения микробиома носили динамический характер.

Выводы. Продемонстрированы гендерные различия в продукции цитокинов, вызванные введением индигенного штамма *E. coli*. Интрагастральное введение живых микроорганизмов вызывало динамические изменения в микробиоме. Возрастание количества таких микроорганизмов, как лактобациллы и энтерококки, позволяет предполагать наличие у рассматриваемого штамма протективного действия.

Заключение. в результате работы показано, что организмы самцов и самок по-разному реагируют на введение апатогенного штамма, что необходимо учитывать в случае применения пробиотических препаратов.

АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ САМОК КРЫС ПРОТИВ МНС САМЦА И РОЛЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА G В ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Коренчук Ю.В., Шайдулина Р.Р., Тронина Т.И., Меньшиков И.В., Тютина А.А., Вайтина А.М.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Введение. Беременность, представляя собой феномен естественной аллотрансплантации, требует наличия эффективных регуляторных механизмов для предупреждения возможных антифетальных иммунных реакций. Сегодня ясно, что иммунологические взаимоотношения между организмами матери и плода являются двусторонним коммуникационным процессом, определенным, с одной стороны, презентацией фетальных антигенов, а с другой – распознаванием и реагированием на эти антигены материнской иммунной системы. Механизмы регуляции активности лимфоцитов матери специфичных к МНС плода, обеспечивающие срочную иммунологическую толерантность к плоду, как полуаллогенному трансплантату, остаются не ясны.

Цель и задачи. Выяснить как изменяется активность лимфоцитов самок крыс по отношению к МНС самца и роль иммуноглобулинов плазмы крови в обеспечении толерантности к плоду.

Материалы и методы. Были использованы девственные самки крыс Wistar (n = 19) и самцы линии Wistar-Kyoto (WKY) (n = 9) и самцы Wistar (n = 10). Самки и самцы после объединения содержались парами. Беременность наступала в течение 1 или 2 недель после объединения крыс. Была исследована пролиферативная активность лимфоцитов самок крыс в однонаправленной смешанной культуре с лимфоцитами самца еженедельно после объединения животных в пару, а также непосредственно перед объединением. Лимфоциты культивировали в течение 5 дней в полной питательной среде. Активность лимфоцитов самки оценивали по потреблению глюкозы. Для выяснения роли аутоплазмы и содержащихся в ней иммуноглобулинов в регуляции активности лимфоцитов самки, специфичных к лимфоцитам самца, лимфоциты самок перед культивированием инкубировали в течение 1 часа с аутоплазмой и с аутоплазмой, очищенной от IgG, затем лимфоциты отмывали от несвязавшихся факторов плазмы. Плазма содержала комплемент, поэтому при инкубировании лимфоцитов с аутоплазмой мог быть реализован цитотоксический эффект антител.

Результаты. Обнаружено, что лимфоциты девственных самок отвечают на лимфоциты самцов. Предварительная обработка лимфоцитов самок аутоплазмой в 47% случаях не влияет на активность лимфоцитов самок, вызванную лимфоцитами самца, в 37% – стимулирует, в 16% – подавляет. Таким образом, примерно у половины исследованных девственных самок крыс Wistar в плазме крови присутствуют факторы, осуществляющие регуляцию активности лимфоцитов в отношении МНС антигенов самцов Wistar или самцов линии WKY. В основном факторы плазмы стимулируют активность лимфоцитов в отношении данных антигенов. Удаление IgG из плазмы самок девственных крыс не приводило к отмене эффекта плазмы, оказывающей ингибирующее воздействие на лимфоциты самок, но отменяло эффект плазмы, оказывающей стимулирующий эффект. Следовательно, стимулирующий эффект аутоплазмы на активность лимфоцитов девственных самок, вызванную лимфоцитами самца, ассоциирован с IgG, а ингибирующий – с другими фактора плазмы. У беременных крыс на 1 неделе беременности пролиферация лимфоцитов в ответ на лимфоциты самца в 2 раза ниже ($p < 0,05$, t-test), чем до беременности, на 2 неделе возвращается к уровню до беременности, а на 3 неделе – в 2 раза выше, чем до беременности ($p < 0,05$, t-test). В течение всей беременности в аутоплазме самок присутствуют факторы, стимулирующие пролиферативную активность лимфоцитов самок, вызванную лимфоцитами самца. Аутоплазма, лишенная IgG, сохраняет стимулирующую активность, но в некоторых случаях последняя снижается после удаления IgG. Данный факт позволяет предполагать, что стимулирующий эффект плазмы при беременности обусловлен не IgG, возможно иммуноглобулином класса М. Наоборот, у беременных крыс обнаруживается IgG, который ограничивает стимулирующую активность плазмы. Об этом свидетельствует увеличение стимулирующего эффекта аутоплазмы на пролиферацию лимфоцитов самки, вызванную лимфоцитами самца, после ее истощения от IgG. Возможно, сдерживание экспансии лимфоцитов самки против МНС самца и, следовательно, плода иммуноглобулинами класса G участвует в поддержании толерантности к плоду.

Заключение. Таким образом, факторы плазмы крови постоянно поддерживают активность лимфоцитов специфичных к чужеродным МНС. Во время беременности стимулирующая активность плазмы в отношении лимфоцитов специфичных к чужеродным МНС сдерживается IgG. Возможно, появление IgG, ограничивающего стимулирующую активность плазмы в отношении лимфоцитов специфичных к МНС самца, обеспечивает снижение активности лимфоцитов самки к МНС в первой половине беременности и сохранение плода.

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ У КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Введение. По данным литературы устойчивость к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний, тяжесть их течения и такие показатели как выживаемость и смертность, зависят от пола (Eshima N. et al., 2012). Известно, что при системном воспалительном ответе (СВО) экспрессия ключевого фактора, регулирующего продукцию провоспалительных цитокинов – NF-κB, тесно связана с активацией транскрипционного фактора, регулирующего ответ на гипоксию – HIF-1, уровень экспрессии которого варьирует у особей с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии (Hirota K., 2015). При лечении больных с синдромом СВО и сепсиса, как правило, не учитывается индивидуальная устойчивость к гипоксии, а также половые различия, что снижает эффективность терапевтических мероприятий.

Цель и задачи. Оценка половых различий морфологических и иммунологических изменений при СВО у крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии.

Материалы и методы. Исследования проведены на половозрелых крысах Вистар обоего пола (n = 40), массой тела 220-270 г (питомник «Столбовая»). Для определения устойчивости к гипоксии животных помещали в барокамеру на «высоту» 11 500 м, подъем осуществляли со скоростью 80 м/с. К высокоустойчивым к гипоксии животным относили крыс, время жизни (время до принятия бокового положения) которых «на высоте» составляло более 3 мин, к низкоустойчивым – менее 30 сек. Через 2 недели после определения устойчивости к гипоксии моделировали СВО путем внутрибрюшинного введения липополисахарида *E. coli* O26:B6 (Sigma) в дозе 1,5 мг/кг, вызывающей развитие воспалительного процесса и дистрофических изменений в органах-мишенях – печени и легких. Животных выводили из эксперимента через 24 ч после введения ЛПС передозировкой общего анестетика золетила (Virbac Sante Animale). Оценивали морфологические изменения в легких и печени. Проводили цитофлуориметрическую оценку относительного и абсолютного количества $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, $CD45^+$, $CD314^+$-лимфоцитов в периферической крови. Для оценки статистической значимости полученных результатов использовали методы непараметрической и дисперсионной статистики (Манна–Уитни, Конновера, ANOVA).

Результаты. На 1-е сутки после введения ЛПС у низкоустойчивых к гипоксии самцов и самок воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок была более выражена, чем у высокоустойчивых животных. При анализе половых различий у высокоустойчивых к гипоксии крыс было показано, что воспалительная инфильтрация в легких более выражена у самцов. Однако у низкоустойчивых самцов и самок различий по этому показателю не обнаружено.

В ранние сроки развития СВО по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии самками и самцами в печени низкоустойчивых животных обоего пола чаще выявлялись очаговые некрозы, дистрофические изменения гепатоцитов были более распространенными и выраженными. Половых различий морфологических изменений в печени как у низко-, так и высокоустойчивых крыс не выявлено.

При развитии СВО в периферической крови у низкоустойчивых к гипоксии самцов выявлено снижение абсолютного числа Т-лимфоцитов и повышение В-лимфоцитов, тогда как у высокоустойчивых наблюдалось снижение количества всех исследуемых Т-лимфоцитов: хелперов, цитотоксических и регуляторных, что свидетельствует о более выраженной иммуносупрессии у высокоустойчивых к гипоксии самцов. При введении ЛПС низкоустойчивым к гипоксии самкам через 24 ч в периферической крови было выявлено только повышение числа $CD314^+$NK-клеток, тогда как у высокоустойчивых – увеличение числа NK клеток сопровождалось выраженным снижением количества В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических и регуляторных Т-лимфоцитов, что, так же как и у самцов, отражает более выраженную иммуносупрессию у высокоустойчивых к гипоксии самок с СВО. По сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии самками введение ЛПС высокоустойчивым самцам приводило к более выраженному снижению числа субпопуляций лимфоцитов в периферической крови. Половых различий изменения количества основных субпопуляций в крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс выявлено не было.

Заключение. По сравнению с низкоустойчивыми к гипоксии крысами у высокоустойчивых животных обоего пола воспалительные изменения в легких и альтеративные процессы в печени менее выражены, что сочетается с более выраженным снижением числа Т-лимфоцитов в периферической крови. При анализе половых различий у крыс с высокой устойчивостью к гипоксии показано, что, по сравнению с самками, у самцов воспалительная инфильтрация в легких и ЛПС-индуцированное снижение количества Т-лимфоцитов в крови более выражены. Выявленные половые различия и особенности течения СВО у особей с разной устойчивостью к гипоксии следует учитывать при разработке новых подходов к персонализированной терапии синдрома СВО и сепсиса.

ВЛИЯНИЕ *RHODOCOCCUS*-БИОСУРФАКТАНТА И ЕГО ДОМИНИРУЮЩЕЙ ФРАКЦИИ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА В СИСТЕМЕ *IN VIVO*

Кочина О.А., Куюкина М.С., Ившина И.Б.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Введение. Биосурфактанты являются поверхностно активными веществами, имеющими микробное происхождение. В отличие от синтетических аналогов, они обладают рядом преимуществ, благодаря чему являются перспективными соединениями для использования в различных областях. Доказана возможность их применение и в медико-биологических целях. Биосурфактанты обладают противоопухолевой, антимикробной и противовирусной активностью. Однако патогенность штаммов-продуцентов и токсичность биосурфактантов ограничивают их использование. Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 является не патогенным, а синтезируемый им биосурфактант не токсичен для животных.

Цель. Исследование влияние гликолипидного комплекса *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 и его доминирующей фракции на выраженность антителогенеза в системе *in vivo* при различных способах введения.

Материалы и методы. Эксперименты были проведены на белых беспородных мышах-самцах массой 20-25 г. Контрольной группе вводился 0,9% NaCl, а опытным группам – препарат в виде гликолипидного комплекса (25, 50 и 100 мг/кг) или его доминирующей фракции (100 мг/кг). Введение исследуемого биосурфактанта осуществлялось двумя способами: внутрибрюшинно и внутримышечно (правая задняя лапа). Через час после введения трегалолипида, животных иммунизировали эритроцитами. На 5-ые сутки, на пике иммунного ответа, определялось количество АОК в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы. Мышей выводили из эксперимента путем декапитации с соблюдением требований гуманности, согласно конвенции (Страсбург, 1986). Статистическую обработку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа и непарного LSD-критерия для post-hoc сравнения.

Результаты. Установлено, что при в/б введении гликолипидного комплекса препарат в дозах 50 и 100 мг/кг оказывал статистически значимое угнетающее влияние на количество антителообразующих клеток в селезенке по относительным показателям. При оценке изменений абсолютного числа АОК статистически значимого влияния гликолипидного биосурфактанта обнаружено не было. Число ядросодержащих клеток селезенки под воздействием трегалолипида также статистически значимо не изменялось, но при этом наблюдалась тенденция к повышению динамики клеточности органа при введении препарата в дозах 50 и 100 мг/кг. Установлено, что при в/м введении препарат оказывал статистически значимый эффект на угнетение антителогенеза путем снижения количества АОК во всех трех дозах в расчете как на миллион, так и на весь орган. Как и при в/б введении биосурфактанта, наблюдалась тенденция к увеличению количества ядросодержащих клеток в селезенке.

При в/б и в/м введении доминирующей фракции трегалолипида было установлено, что препарат оказывал угнетающее действие на абсолютное и относительное количество антителообразующих клеток в селезенке. Количество ядросодержащих клеток под действием фракции статистически значимо угнеталось при различных способах введения. Наибольший эффект был зафиксирован при в/м введении препарата.

Заключение. Таким образом, биосурфактант *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 и его доминирующая фракция оказывает угнетающий эффект на относительное и абсолютное количество антителопродуцентов в селезенке при различных способах введения. Наличие иммунорегуляторной активности биосурфактанта свидетельствует о перспективности дальнейшего исследования данного микробного трегалолипида.

СЕМАФОРИН SEMA4D В КОНТРОЛЕ РАННИХ ЭТАПОВ АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Куклина Е.М., Некрасова И.В., Валиева Ю.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Семафорин IV класса Sema4D – многофункциональная молекула, которая широко представлена в организме, в том числе в иммунной системе. Он конститутивно экспрессируется Т- и В-лимфоцитами, а при активации клеток за счет протеолитического отщепления переходит в растворимую форму, не теряя при этом функциональной активности. Показано, что лимфоциты экспрессируют как сам семафорин, так и два типа семафориновых рецепторов, CD72 и плексин B1, что определяет участие Sema4D в контроле активности этих клеток и возможность ауто- или паракринного действия семафорина. В работе исследована роль эндогенного Sema4D в регуляции ранних этапов активации лимфоцитов, в частности, в реализации трех возможных вариантов ответа клеток на стимуляцию – пролиферации, апоптоза или анергии. При этом, наряду с функциональным ответом клеток (пролиферация, апоптоз) и экспрессией диацилглицеринкиназы α (Diacylglycerol kinases α, DGKα), маркера анергии, оценивался синтез клетками продуктов генов раннего ростового ответа 1 и 2 (Early growth response, Egr1 и Egr2), определяющих выбор клеткой пути развития – пролиферации или анергии, соответственно. Источником эндогенного Sema4D в культуре служили сами Т-лимфоциты. Для оценки роли Sema4D в активации лимфоцитов использовали блокаду как семафорина, так и обоих семафориновых рецепторов, CD72 и плексина B1.

Показано непосредственное участие Sema4D в пролиферативном ответе $CD4^+/CD8^+$Т-лимфоцитов на поликлональную активацию (анти-CD3/CD28), а также в стимуляции экспрессии транскрипционного фактора Egr1, ассоциированного с адекватной активацией Т-лимфоцитов: оба показателя снижались на фоне блокады семафорина, Уровень активационно-индуцированного апоптоза, напротив, возрастал в случае блокады Sema4D, указывая на его антиапоптотическую активность. Анализ вклада конкретных рецепторов в реализацию антиапоптотических эффектов Sema4D в $CD4^+/CD8^+$Т-лимфоцитах выявил участие в этом процессе плексина B1. Оценка роли Sema4D в индукции Т-клеточной анергии показала следующие результаты. экспрессия DGKα, ключевого маркера анергии, на фоне блокады семафорина статистически значимо снижалась При этом подавлялась и экспрессия транскрипционного фактора Egr2. Известно, что Egr2 инициирует транскрипцию DGKα, а его экспрессия ассоциирована с Т-клеточной анергией, поэтому однотипнная регуляция этих факторов семафорином вполне закономерна, однако направленность этих изменений неожиданна, поскольку идет вразрез с показанным выше участием Sema4D в активации Т-лимфоцитов за счет про-пролиферативных и антиапоптотических эффектов.

В целом полученные результаты позволяют сделать ряд заключений: 1) Sema4D контролирует не только пролиферацию Т-лимфоцитов, но и альтернативные варианты ответа клеток на стимуляцию – активационно-индуцированный апоптоз и анергию; 2) одним из механизмов Sema4D-зависимого контроля активации лимфоцитов является регуляция экспрессии продуктов генов раннего ростового ответа Egr1/Egr2; 3) в реализации эффектов семафорина в Т-лимфоцитах участвует плексин B1, экспрессия которого ранее приписывалась исключительно неиммунным тканям; 4) эффекты Sema4D в Т-лимфоцитах, как правило, не зависят от растворимого семафорина и требует экспрессии его мембранной формы. Важно также отметить показанную в работе способность Sema4D усиливать экспрессию Т-лимфоцитами маркеров анергии. Известно, что анергичный статус имеет субпопуляция регуляторных Т-клеток, поэтому не исключено, что Sema4D участвует в дифференцировке данных клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-05694.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ АДАПТИВНОГО И ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ИШЕМИИ ПЕЧЕНИ

Литвинова Е.С., Конопля А.И., Быстрова Н.А., Харченко А.В., Конопля Н.А.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Для более широкого внедрения заместительной клеточной терапии в клиническую практику необходимы дальнейшие экспериментальные исследования, направленные на определение иммунометаболических эффектов различных вариантов регенеративной клеточной терапии (использование аллогенных гепатоцитов и их культуральной жидкости), а также сочетанное применение аллогенных гепатоцитов и фармакологических препаратов при патологии печени.

Цель и задачи. Установить эффективность коррекции иммунных нарушений в условиях острой ишемии печени путем использования аллогенных гепатоцитов (АГ) и их культуральной жидкости (КЖАГ).

Материалы и методы. Исследования проведены на 88 здоровых крысах-самцах Вистар массой 150-200 г. Острую ишемию печени (ОИП) вызывалась оперативным методом под внутрибрюшинным гексеналовым наркозом путем пережатия гепатодуоденальной в течение 10 минут. Выделение АГ от животных через 5-6 дней после рождения производилась по методике M.N. Berry, D.S. Friend. Полученный пул суспензии клеток от 3 крыс в концентрации 2×10^6/кг сразу же вводили внутрибрюшинно, десятикратно, через 24 часа, в объеме 0,5 мл в среде 199. С целью получения КЖАГ АГ культивировали в среде 199 (5 × 107 клеток на 3 мл среды), содержащей 5% телячьей эмбриональной сыворотки, в течение 4 ч. После чего клетки осаждали центрифугированием, а КЖАГ десятикратно (с 24-часовым интервалом) внутрибрюшинно вводили реципиентам из расчета 5 мг/кг белка. АГ и КЖАГ готовили ежедневно и вводили сразу же после приготовления. Экспериментальных животных делили на 4 группы по 11-12 особей в каждой: 1-я группа (контрольная) – здоровые крысы; 2-я группа – ОИП; 3-я группа – ОИП и введение АГ; 4-я группа – ОИП и введение КЖАГ. Смертность экспериментальных животных во 2-4 группах в течение 5 дней после моделирования ОИП соответственно составила 34%, 21% и 17%. В циркулирующей крови определяли функционально-метаболическую активность нейтрофилов, в селезенке число иммунных антителообразующих клеток (АОК) на эритроциты барана. О выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на эритроциты барана судили по разнице масс (РМ) регионарного и контрлатерального лимфатических узлов и по разнице количества в них кариоцитов (РК).

Результаты. В условиях ОИП у животных установлена супрессия формирования гуморального иммунного ответа (снижение количества иммунных АОК в селезенке) и ГЗТ (снижение разницы РМ и РК регионарных и контрлатеральных лимфатических узлов), снижение метаболической и фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови (снижение ФИ, ФЧ, НСТ-сп., НСТ-ст.). Введение АГ реципиентам с ОИП нормализует ФЧ нейтрофилов периферической крови и их кислородзависимую активность по НСТ-ст., корригирует, но не до уровня контрольной группы животных, ФИ полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови и повышает более значительно, по сравнению с контролем, формирование ГЗТ. Введение КЖАГ крысам с гипоксией печени нормализует формирование клеточной формы иммунного ответа и ФИ нейтрофилов периферической крови, частично нормализует развитие гуморального звена иммунитета, ФЧ и кислород-зависимую функциональную активность полиморфно-ядерных лейкоцитов.

Заключение. Для бескровных манипуляций на печени в клинической практике нередко используется пережатие печеночно-дуоденальной связки. Однако, возникающая при этом ишемия печени может быть причиной не только резких нарушений функции этого органа, но и оказывает отрицательное влияние на весь организм в целом, в первую очередь через возникающее иммунодефицитное состояние. Применение в этих условиях трансплантации гепатоцитов и их культуральной жидкости корригирует в экспериментальных условиях нарушения иммунитета. По-видимому, трансплантированные изолированные гепатоциты не только изменяют гуморальные и молекулярные механизмы, отвечающие за активацию функции поврежденных гепатоцитов реципиента и регенерацию, но и активируют функцию иммунокомпетентных клеток путем выработки гуморальных соединений.

КРАТКОСРОЧНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ С РЕЛЬЕФНЫМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫМ ПОКРЫТИЕМ НА ТИТАНЕ

Литвинова Л.С.[1], Юрова К.А.[1], Шуплецова В.В.[1], Мелащенко Е.С.[1], Хазиахматова О.Г.[1], Шаркеев Ю.П.[2,4], Хлусов И.А.[1,2,3]

[1] Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия
[2] Томский политехнический университет, Томск, Россия
[3] Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия
[4] Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

Введение. Известно, что стандартная тест-система в двумерной (2D) стационарной культуре клеток на пластиковой поверхности культуральных планшетов не соответствует условиям реального функционирования клеточных систем, отличаясь многими параметрами, в том числе активацией рецепторов и внутриклеточных сигнальных путей, от естественного микроокружения клеток *in vivo*. Использование искусственных трехмерных (3D) матриц, способных биомиметически воспроизводить клеточное и тканевое микроокружение, позволяет формировать условия, приближенные к *in vivo* и проводить эскпериментальные работы на межфазной границе раздела живой и неживой материи.

Цель. Изучение влияния 3D-матриксов, имитирующих минеральное вещество регенерирующей костной ткани, на состояние мононуклеарных лейкоцитов (МНК) в краткосрочной культуре *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом исследования служили МНК, выделенные из лейковзвеси здоровых доноров методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин (1,077 г/см^3) (Pharmacia, Швеция) и культивировали (3×10^6 кл/лунку) в полной питательной среде в течение 48 часов при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Состояние трехмерной (3D) культуры клеток имитировали при помощи добавления в клеточную культуру подложек ($10 \times 10 \times 1$ мм^3) из коммерчески чистого титана, несущих рельефное кальций-

фосфатное (КФ) покрытие. Физиологической модели репарации соответствовал индекс шероховатости (Ra) размером 2-3 мкм. Ra образцов для репаративной модели учитывал больший объем ремоделирования кости при ее травматических повреждениях и был равен 3-5 мкм. Контролем служила 2D-модель *in vitro* культивирования клеток на пластике (контроль). Иммунофенотипирование клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием коктейля моноклональных антител, меченных флюоресцентными метками ViaBlue, FITC, PE, (eBioscience, USA) на проточном цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Количественное определение IL-2 в супернатантах исследуемых культур клеток проводили методом проточной флюориметрии на автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-PlexProHuman cytokine Group I Assays, Bio-Rad, США). Исследование уровня транскрипции мРНК генов (*hTERT, ki-67, IL-2*) проводили методом ПЦР. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, а также протоколы амплификации описаны ранее. Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20.

Результаты и обсуждение. По истечении срока инкубации (48 ч) в физиологической и в репаративной моделях культивирования было выявлено статистически достоверное увеличение содержания $CD4^+CD71^+$ лимфоцитов и продукции IL-2 в сравнении с контрольной 2D-культурой ($p \leq 0,05$), при этом уровень относительной экспрессии мРНК гена IL-2 в обеих моделях культивирования был сопоставим с контрольными значениями. Транскрипция мРНК гена *ki-67,* свидетельствующая о пролиферативной активности клетки, повышалась (в 6 раз) только в репаративной 3D-модели культивирования *in vitro*. Анализ динамики теломеразной активности, обеспечивающей репликативную способность высокопролиферирующих МНК, не выявил статистически значимого изменения относительной экспрессии мРНК гена *hTERT* как в физиологической, так и в репаративной 3D-моделях культивирования по сравнению с контролем.

Заключение. 3D-матрикс, имитирующий регенерацию костной ткани, стимулирует пролиферативную активность МНК, предположительно за счет эпигеномного характера действия рельефа кальций-фосфатной поверхности. Установлено различие в механизмах пролиферации МНК в репаративной и физиологической моделях 3D-матрикса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031).

ДОФАМИН КАК РЕГУЛЯТОР РАЗВИТИЯ ТИМУСА У ПЛОДОВ КРЫС

Лифанцева Н.В., Конеева Ц.О., Воронова С.Н., Мельникова В.И.

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия

Введение. В последнее время существенно изменились представления о моноаминах как исключительно о передатчиках сигнала между клетками нервной системы. Все больше данных подтверждает их способность выступать в качестве гуморальных регуляторов широкого профиля в различных органах и тканях. Иммунная система является одним из примеров проявления такого действия моноаминов. Известно, что дофамин синтезируется лимфоцитами и участвует в модуляции иммунных реакций посредством ауто- и паракринных механизмов у половозрелых млекопитающих. Исследование роли дофамина в раннем развитии имеет особое значение, поскольку вмешательство в формирование различных структур плода приводит к долговременным необратимым изменениям в постнатальном периоде онтогенеза. Ранее нами было показано, что дефицит катехоламинов на определенных стадиях пренатального развития приводит к необратимым морфогенетическим изменениям в функционировании Т-клеточного звена иммунитета как в препубертатном, так и в постпубертатном периодах жизни. Однако оставалось невыясненным, какой конкретно из катехоламинов ответственен за обнаруженные эффекты. У плодов, в отсутствии гемато-энцефалического барьера, дофамин может выделяться из мозга в систему общей циркуляции, и его концентрация в крови плодов значительно выше, чем уровень норадреналина и адреналина. Высокая концентрация дофамина в крови плодов, а также отсутствие нарушений в развитии иммунной системы у мышей с нокаутом гена дофамин-β-гидроксилазы, необходимой для синтеза норадреналина и адреналина, позволили нам предположить, что именно дофамин является регулятором формирования тимуса у плодов крыс.

Цель и задачи. В данной работе исследовали экспрессию рецепторов к дофамину и их функциональную активность в эмбриональном тимусе, а также отдаленные последствия пренатального подавления синтеза катехоламинов в критический период формирования тимуса на дифференцировку субпопуляций Т-лимфоцитов в этом органе у половозрелых животных.

Материалы и методы. Возрастную динамику экспрессии рецепторов к дофамину в тимусе оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией у плодов, начиная с 16-го дня эмбрионального развития (Э16). Функциональную активность дофаминовых рецепторов на клетках тимуса оценивали *in vitro* на Э18 по способности дофамина влиять на пролиферативный ответ, индуцированный митогеном конканавалином А (Кон А, 2,5 мкг/мл). Для подавления синтеза катехоламинов у плодов беременным самкам крыс Вистар внутрибрюшинно вводили α-метил-п-тирозин (α-МПТ, 100 мг/кг массы). У родившегося потомства на 40-й день постнатального развития (П40) в тимусе проводили количественную оценку субпопуляций Т-лимфоцитов, путем окрашивания клеток антителами к поверхностным маркерам CD4, CD8 и CD25 (Cederlain, Канада) с последующим анализом на проточном цитофлуориметре Coulter EPICS XL-MCL (Beckman, США).

Результаты. Согласно полученным данным, в эмбриональном тимусе обнаружена экспрессия мРНК рецепторов к дофамину Д1, Д2, Д3 и Д5 типов. Возрастная динамика экспрессии рецепторов всех изученных типов различна. Тем не менее, следует отметить, что на Э17 уровень экспрессии мРНК относительно высокий для всех типов дофаминовых рецепторов. Добавление дофамина в культуру тимоцитов, выделенных из плодов на Э18, достоверно снижало ответ тимоцитов на митоген КонА для всех использованных концентраций (10^{-8}-10^{-6} М). Полученные данные свидетельствуют о функциональной активности рецепторов к дофамину на тимоцитах и подтверждают возможность прямого влияния дофамина на развивающийся тимус. Анализ клеточного состава субпопуляций тимоцитов у взрослых крыс, которым фармакологически подавляли синтез катехоламинов на стадиях Э16-17 не выявил различий в динамике созревания

Т-клеток CD4-фенотипа и CD8-фенотипа, при этом обнаружил увеличение численности естественных регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+$ фенотипа, основная функция которых заключается в обеспечении толерантности на периферии.

Заключение. Таким образом, подавление синтеза катехоламинов в критический период формирования тимуса (Э16-Э17) приводит к долгосрочным изменениям в Т-системе иммунитета, обусловленным усилением продукции естественных регуляторных Т-лимфоцитов. Присутствие и функциональная активность в тимусе плодов рецепторов к дофамину Д1, Д2, Д3 и Д5 типов свидетельствует в пользу того, что именно дофамин ответственен за описанные эффекты, и подтверждает возможность прямого влияния дофамина на формирование тимуса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00031.

ЭКСПРЕССИЯ КОМПОНЕНТОВ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ ТИМУСЕ

Лифанцева Н.В., Конеева Ц.О., Мельникова В.И.

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия

Введение. Исследование роли моноаминов в пренатальном развитии имеет особое значение, поскольку при формировании различных структур плода реализуются эпигенетические механизмы, обеспечивающие адаптационную пластичность всех систем организма. Ранее было показано, что дефицит серотонина или дофамина в период активного формирования тимуса у плодов крыс приводит к необратимым морфогенетическим изменениям в функционировании Т-клеточного звена иммунитета в постнатальной жизни. Однако механизмы такого действия моноаминов остаются невыясненными. У половозрелых животных все компоненты моноаминергической системы (синтез, захват, рецепторы) тем или иным образом задействованы в модуляции иммунных реакций. Возможность синтеза моноаминов и их захвата в клетках иммунной системы, а также экспрессия рецепторов в пренатальном онтогенезе не изучены.

Цель и задачи. В настоящей работе исследовали возрастную динамику экспрессии рецепторов к серотонину и дофамину, а также возможность синтеза и транспорта моноаминов в клетках тимуса у плодов крыс.

Материалы и методы. Возрастную динамику экспрессии рецепторов к серотонину и дофамину, в тимусе оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией у плодов, начиная с 15-го дня эмбрионального развития (Э15). Экспрессию молекул-транспортеров и ферментов синтеза серотонина и дофамина исследовали методами ПЦР и Вестерн-блоттинга. Способность тимоцитов на 18-й эмбриональный день к захвату внеклеточных моноаминов оценивали с помощью конфокальной микроскопии живых клеток, которые инкубировали с флуоресцирующим субстратом транспортеров моноаминов (ASP^+ 10^{-7} М) в присутствии или без селективных блокаторов захвата серотонина (флюоксетин 10^{-5} М) или дофамина (GBR-12909 10^{-5} М).

Результаты. В тимусе плодов, начиная с Э15-Э16, обнаружена мРНК рецепторов к серотонину (5-HT-1a, 5-HT-1b-, 5-HT-2a, 5-HT-2b и 5-HT-7) и рецепторов к дофамину (D1, D2, D3, D5). Ферменты синтеза серотонина и дофамина – триптофангидроксилаза, тирозингидроксилаза и декарбоксилаза ароматических аминокислот выявлены в тимусе плодов начиная с 16-го дня с помощью методов ПЦР и Вестерн-блоттинга. Инкубация эмбриональных тимусов (Э18) *ex vivo* в присутствии предшественников серотонина и дофамина (триптофана или тирозина) с последующим иммуногистохимическим выявлением серотонина или дофамина, соответственно, позволила подтвердить функциональную активность обнаруженных ферментов. Подавление транспорта ASP^+ в клетки тимуса (Э18) в присутствии селективных ингибиторов транспорта серотонина и дофамина доказывает способность клеток эмбрионального тимуса активно захватывать внеклеточные моноамины.

Заключение. Таким образом, в развивающемся тимусе плодов крыс присутствуют и функционально активны все компоненты серотонинергической и дофаминергической систем (синтез, транспорт, рецепторы), что подтверждает возможность прямого влияния моноаминов на формирование тимуса. Существование локальной моноаминергической системы в эмбриональном тимусе, наряду с высоким уровнем моноаминов в крови плодов, свидетельствует о возможности реализации эффектов моноаминов как через паракринные, так и через эндокринные механизмы, а также позволяет предположить различные функции внутритимического и циркулирующего пулов моноаминов в регуляции развития тимуса.

РОЛЬ ПРОТЕАСОМ И ШАПЕРОНОВ В РЕАКТИВНОСТИ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСАМИ И ПАТОГЕНАМИ

Люпина Ю.В., Становова М.В., Ерохов П.А., Абатурова С.Б., Горностаев Н.Г., Михайлов В.С., Шарова Н.П.

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия

Реактивность при воздействии неблагоприятных факторов у многоклеточных организмов является ключевым звеном в их способности к адаптации. Протеолитическая активность протеасом, их полипептидный состав и физико-химические свойства, регулируются в соответствии с состоянием клеток и действии внеклеточных сигналов. **Целью** настоящей работы было выяснение особенностей функционирования убиквитин-протеасомной системы (УПС) и шаперонов при индукции бактериальной или вирусной инфекции в клетках беспозвоночных и млекопитающих, а именно: у эволюционно удаленных классов беспозвоночных, в целомоцитах кольчатых червей *Arenicola marina* (кл. Polychaeta) и Sf 9 клетках кукурузной листовой совки *Spodoptera frugiperda* (кл. Insecta), и в клетках ЦНС и лимфоидных органов у крыс. Клетки Sf9 были ифицированы бакуловирусом AcMNPV, воспаление у кольчатых червей и крыс вызывалось инъекцией липополисахарида. Реакцию УПС и шаперонов в клетках оценивали через 30 мин, 1 час, 6 часов и 24 часа после инфицирования. Для определения характеристик пулов протеасом и изменения соотношения различных форм при инфицировании у беспозвоночных и млекопитающих изучены нативные формы протеасом методом модифицированного нативного фореза и определено содержание 20S- и 26S форм протеасом, а также их регуляторов с помощью метода Вестерн-блоттинга и специфичных антител в осветленные экстрактах из целомоцитов аннелид, Sf9 клеток

насекомых, а также клеток печени, селезенки и отделов головного мозга крыс. Содержание иммунных протеасом в клетках у крыс выявлялось с использованием антител к иммунным субъединицам LMP7 и LMP2. Определение химотрипсин- и каспазаподобной активностей протеасом в осветленных гомогенатах выявлялось по скорости деградации специфического флуорогенного олигопептида N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin и Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-methylcoumarin, которые утилизируются химотрипсин- и каспазаподобными центрами протеасом, соответственно. Вклад примесных активностей оценен с помощью конкурентного ингибитора протеасом, MG132. Роль протеасомных механизмов в регуляции воспаления изучена при фармакологическом воздействии специфических ингибиторов активности протеасом (бортезомиба). Распределение протеасом по клеткам было исследовано методом иммунофлуоресценции. Уровень регуляторов экспрессии иммунных субъединиц протеасом – белков шаперонов HSP/HSC70 оценен методом Вестерн-блоттинга с применением специфических антител. В клетках Sf9, в целомоцитах аннелид и в клетках изученных органов у крыс при инфицировании возрастало содержание индуцибельных белков теплового шока HSP70. Впервые была изучена нативная структура протеасом в целомоцитах кольчатых червей и Sf9 клетках насекомых с помощью модифицированного метода двумерного электрофореза для грубых фракций протеасом, первое направление которого выполняется в нативных условиях, что позволяет дифференцировать множественные формы протеасом. В ходе работы выделены протеасомы из клеток насекомых и изучен их полипептидный состав методами протеомного анализа (двумерный электрофорез в полиакриламидном геле и масс-спектрометрия). При электрофорезе в полиакриламидном геле в нативных условиях экстрактов клеток *S. frugiperda*, также клеток исследованных органов крыс, протеолитическая активность выявляется во фракциях 26S (комплекс CP и RP) и 20S протеасом (CP), ассоциированных с различными активаторами. В целомоцитах кольчатых червей *A. marina* протеасомы были представлены преимущественно формой 20S. Инфекция бакуловирусом AcMNPV не приводила к значимому изменению субъединичного состав протеасом клеток *S. frugiperda*. В клетках печени и коры головного мозга у крыс наблюдалась диссоциация активаторов в пулах 26S и 20S протеасом через 1 и 6 часов после инфицирования. При воспалении, вызванном введением липополисахарида, форма 26S в целомоцитах аннелид полностью исчезает, а электрофоретическая подвижность фракции 20S протеасом возрастает, что вероятно отражает изменение их субъединичного состава и диссоциацию активаторов протеасом. В клетках исследованных нами организмов при инфицировании наблюдается возрастание химотрипсинподобной активности протеасом, которое ингибируется введением бортезомиба. Таким образом, изменения в тонкой структуре протеасом и активация шаперонов являются молекулярной основой для реактивности при инфицировании вирусами и патогенами у многоклеточных организмов.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 16-04-00454.

КУПИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ПАТТЕРНОВ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ МОДУЛИРОВАННЫХ ПСИХОАКТИВНЫМ ВЕЩЕСТВОМ ИММУННЫХ КЛЕТОК

Маркова Е.В.[1], Княжева М.А[1], Савкин И.В.[1], Тихонова М.А.[2], Амстиславская Т.Г.[2]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия
[2] ФНГБУ «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины», Новосибирск, Россия

Введение. Нарушение нейроиммунного взаимодействия является существенным звеном в патогенезе поведенческих расстройств, оказывая негативное влияние на их течение, утяжеляя клиническую картину, снижая эффективность терапии; в силу чего актуальным является поиск новых подходов к их лечению. Однонаправленное влияние большинства психоактивных препаратов на ЦНС и иммунную систему позволяет рассматривать иммунные клетки в качестве модельных объектов для воздействия на межсистемную функциональную взаимосвязь. Имеется достаточный массив данных о существенной роли иммунокомпетентных клеток и их биологически активных продуктов в патогенезе депрессии, что обуславливает возможность и перспективность иммунотерапии указанного состояния аутологичными иммуноцитами с модулированной экстракорпорально психоактивными веществами функциональной активностью. Ранее нами была показана возможность и механизмы стимуляции пассивного типа поведения у экспериментальных животных трансплантацией спленоцитов, с модулированной *in vitro* кофеином функциональной активностью.

Цель. Исследование влияния трансплантации иммунных клеток, функциональная активность которых была изменена предварительной экстракорпоральной обработкой кофеином, на поведенческие паттерны депрессивно-подобного состояния, индуцированного у экспериментальных животных длительным социальным стрессом.

Материалы и методы. В качестве доноров и реципиентов использовались мыши (CBAxC57BL/6)F1, в возрасте 3-х месяцев, с пассивным типом поведения в «открытом поле», у которых было сформировано депрессивно-подобное состояние методом сенсорного контакта с опытом 10-кратных ежедневных поражений в межсамцовых конфронтациях с доминирующим партнером. Иммунные клетки для трансплантации получали в стерильных условиях из суспензии спленоцитов, обрабатывали *in vitro* кофеином и внутривенно вводили сингенным реципиентам. В контрольной группе животных подготовка и трансплантация иммунных клеток проводилась в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что последние культивировались без присутствия кофеина. У реципиентов через 48 часов после трансплантации оценивались параметры поведения в тесте «открытое поле», в тесте принудительного плавания по Порсолту, выраженность ангедонии, содержание ряда регуляторных цитокинов в патогенетически значимых для депрессивного состояния структурах головного мозга.

Результаты. Трансплантация иммунных клеток с модулированной кофеином функциональной активностью

вызывала у реципиентов в депрессивно-подобном состоянии стимуляцию двигательной и исследовательской активностей в «открытом поле»; существенное увеличение временных периодов мобильности в тесте принудительного плавания и снижение ангедонии, считающейся главным признаком депрессии в экспериментальных моделях, выявляемое по предпочтению потребления раствора сахарозы (в процентном отношении от общего количества потребляемой жидкости) по сравнению с контрольной группой животных (87,8±2,0 и 67,5±4,8 соответственно; $p < 0,05$). Различия по указанным показателям между контрольной и опытной группами реципиентов регистрировались в течение 8-10 дней после клеточной трансплантации и были ассоциированы со стимуляцией нейрогенеза в гиппокампе. У животных в депрессивно-подобном состоянии после внутривенного введения иммунных клеток, обработанных *in vitro* кофеином, наблюдалось также изменение содержания ряда регуляторных цитокинов в патогенетически значимых для депрессивно-подобного состояния структурах головного мозга, преимущественно в сторону снижения провоспалительных цитокинов: в гиппокампе выявлено снижение IL-6, IFNγ и повышение IL-10; в гипоталамусе – снижение IL-1β, IL-6, IFNγ; в префронтальной коре – снижение IFNγ.

Заключение. Представленные результаты демонстрируют позитивный эффект трансплантации модулированных кофеином иммунных клеток, проявляющийся в купировании поведенческих паттернов депрессивно-подобного состояния у экспериментальных животных путем воздействия на патогенетические механизмы депрессии.

КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МАКАК-РЕЗУСОВ В СРАНИТЕЛЬНО ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Матуа А.З., Шевцова З.В., Трапш Х.З., Амаба С.Т.

Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия

Введение. Обезьяны, как известно, являются наиболее адекватным экспериментальным объектом для решения задач экспериментальной биологии и медицины, вследствие биологического сходства с человеком (Лапин Б.А. и соавт., 1987, 2004; Фридман Э.П., 2009). Большинство видов приматов уже внесены в международную и национальные Красные книги (Лапин Б.А., 2004). Однако попрежнему сохраняется необходимость изучения на приматах патогенеза инфекционных заболеваний, а также испытания на них вакцин и терапевтических препаратов при таких инфекциях, для которых нет альтернативных моделей. Учитывая, что цитокины являются одной из наиболее мощных систем регуляции и интеграции врожденных и адаптивных форм иммунного ответа, определение уровня ведущих цитокинов у соматически здоровых обезьян Сухумского питомника имело практическое значение.

Цели и задачи. Исследование уровня цитокинов у макак-резусов, с установлением нормативных значений для обезьян, содержащихся в условиях сухумского питомника. Сравнение полученных концентрации цитокинов у молодых половозрелых обезьян (основная группа сравнения) с особями старшей возрастной группы и человеком.

Материалы и методы. Исследования проведены на базе Сухумского питомника при НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА. Специалистами клинического отдела Сухумского питомника, по соответствующим клинико-лабораторным критериям соматического здоровья животных, были отобраны 60 здоровых макак-резусов (28♀ и 32♂). Группа 1 – 40 молодых половозрелых обезьян (с 4 до 11 лет) и группа 2 – 20 животных старшего возраста (с 20 до 30 лет). Забор крови осуществляли из локтевой вены в один и тот же временной промежуток – с 9 до 10 часов утра натощак. Методом иммуноферментного анализа, с применением тест-систем ЗАО «Вектор-Бест», были определены в сыворотке крови уровни следующих цитокинов: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ.

Результаты. В сыворотке крови молодых половозрелых особей концентрация IL-1β и IL-6 была ниже в 3,6 (IL-1β) и в 1,5 (IL-6) раза по сравнению с животными старшей группы ($p < 0,0001$ и $p < 0,03$ соответственно). При этом содержание IL-2 и IFNγ у особей группы 1 было, наоборот, в 4,5 (IL-2) и 2,3 (IFNγ) раза выше по сравнению с группой 2 ($p < 0,0001$). Разницы в уровне IL-4 выявлено не было. При сравнении полученных данных с человеком, было определено, что концентрации цитокинов в сыворотке соматически здоровых макак-резусов молодого половозрелого возраста входит в диапазон нормативных значений цитокинов здоровых людей соответствующего возраста (Симбирцев А.С., 2009).

Заключение. Определение уровня ряда ведущих цитокинов и установление их норм явилось дополнительным иммунологическим критерием для полной оценки соматического здоровья макак-резусов Сухумского питомника. Кроме того то, что исследуемые цитокины укладываются в те же пределы нормативных колебаний, что и человеческие, является очередным подтверждением порой безальтернативного использования низших обезьян старого света при моделировании ряда иммунопатологических состояний.

ПОВРЕЖДЕНИЕ ОРГАНОВ ИММУНОПОЭЗА ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ И СПОСОБ ЕГО КОРРЕКЦИИ

Медведева С. Ю.[1,2], Пьянкова З.А.[2], Белоусова А.В.[1,2]

[1] ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия
[2] ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Введение. Основной мишенью токсического действия тетрахлорметана (CCl_4) является печень. В последнее время много работ посвящено изучению структурных изменений печени, ее клеточных элементов, принимающих участие в регенерации при токсическом повреждении. Однако исследование иммунотоксикологического воздействия промышленных ядов на иммунные органы остается не до конца изученным и является актуальным, поскольку нарушение иммунологической реактивности может приводить к развитию инфекционных и онколо-

гических процессов, формированию аутоиммунных и аллергических реакций.

Цель. Выявить закономерности структурных изменений в органах иммуногенеза крыс при токсическом воздействии и фармакологической коррекции.

Задачи. Оценить структурные изменения в тимусе и селезенке крыс при токсическом воздействии и фармакологической коррекции; определить вклад Т- и В-лимфоцитов в процессы регенерации в органах иммунопоэза.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 25-ти крысах – самцах линии Wistar массой 180±10 г в соответствии с принципами международных этических комитетов (Директива Совета ЕС 2010/63/EU) и одобрен этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол (No-D-ПМ-2015-28) . Все животные были разделены на экспериментальные группы: 1 группа – интактные животные, 2, 3 группа – внутрибрюшинное введение тетрахлорметана, 4 и 5 группы – на фоне моделирования токсического гепатита вводился иммуномодулятор макрофагов 3-аминофталгидразид (АФГ) по схеме. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 3 и 7 сутки.

Проводилось морфометрическое исследование препаратов тимуса и селезенки. Для иммуногистохимического (ИГХ) исследование тимуса и селезенки применяли моноклональные антитела mouse antirat CD3 clone G 4.18, CD45 RA clone OX-33 Количественную оценку Т- и В-лимфоцитов производили в единице площади в 20 полях зрения при увеличении микроскопа х1000.

Результаты. Введение CCl4 на 3 и 7 сутки приводит к резкому угнетению иммуногенеза в селезенке, о чем свидетельствует достоверное сокращение площади белой пульпы и увеличение площади красной пульпы по сравнению с показателями у интактных животных. У экспериментальных животных наблюдается увеличение количества фолликулов на 3 и 7 сутки эксперимента по сравнению с интактными, однако средняя площадь фолликула снижается.

По данным морфометрии, в центральном органе иммунопоэза – тимусе, введение иммуномодулятора после токсического повреждения приводит к усилению лимфопоэза, что подтверждается достоверным увеличением площади коркового и мозгового вещества на 7 сутки эксперимента.

При ИГХ исследовании Т- и В-лимфоцитов установлено, что на 3 сутки токсического воздействия уменьшается количество Т-лимфоцитов в тимусе и В-лимфоцитов в селезенке. Уменьшение количества лимфоцитов в органах иммуногенеза при действии CCl4 может быть связано с деструкцией лимфоцитов и подавлением метаболических процессов в клетках, резким и длительным подавлением пролиферации. Наряду с этим разрушение лимфоидной ткани при токсическом воздействии можно считать главной причиной уменьшения их количества. Применение АФГ приводило к увеличению количества иммуноцитов белой и красной пульпы селезенки, в тимусе зафиксировано увеличение численности преимущественно В-лимфоцитов, а количество Т-лимфоцитов на фоне введения иммуномодулятора на 7 сутки достигает значения близкого к интактным.

Заключение и выводы. Действие гепатотропного яда вызывает лимфопению, выражающуюся уменьшением Т- и В-лимфоцитов в органах иммунопоэза. Введение иммуномодулятора при токсическом повреждении усиливает лимфопоэз в тимусе и селезенке, что подтверждается увеличением числа Т- и В-лимфоцитов. Полученные результаты дают основание для применения иммуномодулятора АФГ в качестве перспективной стратегии в стимуляции репаративных процессов в органах иммунной системы после токсического воздействия.

Исследование проведено в рамках бюджетной программы «Изучение механизмов регенераторных процессов в органах и тканях с использованием экспериментальных моделей экстремальных факторов и токсического воздействия на организм», № гос. регистрации – 01201352042.

СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАК-РЕЗУС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КАНДИДАТНОЙ ЖИВОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНОЙ (ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ)

Медкова А.Ю.[1], Амичба А.А.[2], Матуа А.З.[2], Синяшина Л.Н.[1], Шевцова З.В.[2], Семин Е.Г.[1], Лядова И.А.[1], Цыганов Е.Н.[1], Конджария И.Г.[2], Баркая В.С.[2], Миквабиа З.Я.[2], Каратаев Г.И.[1]

[1] ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии» им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения России, Москва, Россия
[2] Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия

В последние десятилетия коклюш снова привлек к себе внимание в связи со вспышками заболевания даже в странах с подавляющей долей привитого населения. Это тяжелое инфекционное респираторное заболевание до сих пор остается одной из главных причин смертности младенцев в возрасте до 1 года. Из-за ослабления коллективного иммунитета, связанного с краткосрочной эффективностью применяемых вакцин, наблюдается адаптация возбудителя вследствие геномных изменений бактерий *B. pertussis*. Более того, поствакцинальный амнестический иммунный ответ (бустер-эффект) ослабевает и не поддерживается циркулирующими в настоящее время штаммами коклюшных бактерий. Такое развитие событий ставит вопрос о создании новых, более эффективных вакцин, способных обеспечивать поствакцинальную защиту от коклюша, сравнимую с постинфекционной.

Новая стратегия в достижении необходимого защитного иммунитета против коклюша заключается в создании препарата, максимально имитирующего природную инфекцию, но не проявляющую патогенных свойств вирулентных бактерий *B. pertussis*. В НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи нами сконструированы рекомбинантные бактерии *B. pertussis4MKS*, продуцирующие нетоксичную иммуногенную форму коклюшного токсина – рКТ и не проявляющие активности непротективного антигена – дермонекротического токсина. На основе этих генетически аттенуированных бактерий – *B. pertussis4MKS* – разра-

ботана кандидатная рекомбинантная живая коклюшная вакцина (рЖКВ) для интраназального применения. Ранее нами было показано, что количество и сроки регистрации специфических антител в крови обезьян после иммунизации рЖКВ и экспериментального инфицирования вирулентными бактериями *B. pertussis475* не коррелировали с показателями защитного противококлюшного иммунитета. Вероятно, именно клеточно-опосредованный иммунный ответ необходим для обеспечения длительной защиты от возбудителя коклюша и быстрого бустер-эффекта при контакте с возбудителем. Нами была изучена спонтанная и индуцированная продукция цитокинов клетками крови обезьян, как одна из достоверных характеристик местной защитной реакции и иммуномодулирующего эффекта от инвазии бактерий *B. pertussis.* Поскольку коклюш – это антропонозное заболевание, обезьяны представляются наиболее адекватной моделью. Иммунизация рЖКВ и экспериментальное инфицирование вирулентными бактериями *B. pertussis475* обезьян вида макак-резус сопровождались однотипной цитокин-секреторной пролиферацией клеточного иммунного ответа по типу Th1/Th17 с формированием защитной реакции, препятствующей размножению возбудителя в носоглотке с ускоренными темпами его элиминации. Инфекционная провокация у иммунизированных обезьян рЖКВ сопровождалось выраженным бустерным эффектом. Сравнительная характеристика иммуномодулирующего действия рЖКВ и вирулентных бактерий *B. pertussis475* подтвердила общие механизмы формирования долгосрочного защитного иммунитета.

КОМБИНИРОВАННАЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ, АНТИОКСИДАНТНАЯ И МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ОСТРОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАНКРЕАТИТА

Микаелян П.К., Локтионов А.Л., Караулов А.В., Назаренко П.М., Тарасов О.Н.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Экспериментальное изучение заболеваний и разработка методов лечения являются способом подтверждения существующих и предполагаемых гипотез и механизмов развития болезни, помогает обозначить точки приложения для эффективного воздействия фармакологической коррекции установленных нарушений в системах регуляции. Достаточно сложной в клиническом плане проблемой является острый панкреатит, имеющий несколько форм с большим количеством осложнений.

Цель и задачи. На экспериментальных моделях различных форм острого панкреатита оценить характер и степень иммунных нарушений, выявить корригирующие эффекты сочетания полиоксидоний, эмоксипин и эссенциале Н.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 118 здоровых половозрелых крысах Вистар, массой 150-200 г, с соблюдением всех правил работы с лабораторными животными. Моделирование острой отечной формы панкреатита (ООП) осуществляли путем дозированного криогенного воздействия жидкого азота на одну из долей поджелудочной железы. Острый деструктивный панкреатит (ОДП) воспроизводили перевязкой протоков поджелудочной железы и трехкратной через 60 мин стимуляцией прозерином в дозе 0,2 мг/кг. Животных с ООП и ОДП делили на 2 равные группы: без введения препаратов и с применением комбинации полиоксидония (0,03 мг внутримышечно через 24 часа, № 10), эмоксипина (1 мл 1% раствора разводили в 20 мл 0,9% раствора натрия хлорида; 0,5 мл готового раствора вводили внутримышечно, через 24 часа, № 10) и эссенциале Н (0,03 мл внутрибрюшинно через 24 часа, № 10). В качестве контроля использовали 15 животных без внешних признаков заболеваний. Формирование гуморального иммунного ответа (ГИО) оценивали на пятые сутки после иммунизации эритроцитами барана, подсчитывая в селезенке число иммунных антителообразующих клеток (АОК). Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) определяли по разнице масс регионарного и контрлатерального лимфатических узлов (РМ) и по разнице количества в них кариоцитов (РК) после введения разрешающей дозы антигена – эритроцитов барана. Фагоцитарная активность нейтрофилов циркулирующей крови оценивалась по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному числу (ФЧ) и индексу активности фагоцитоза (ИАФ). Кислородзависимую метаболическую активность полиморфно-ядерных лейкоцитов оценивали по НСТ-тестам спонтанному (НСТ-сп.) и стимулированному опсонизированным и неопсонизированным зимозаном (НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з), коэффициентам активации на опсонизированный и неопсонизированный зимозан и коэффициенту опсонизации (Кан, КАо, КО).

Результаты. В группе животных с ООП установлена супрессия формирования ГИО и ГЗТ (снижение всех исследованных показателей), снижение показателей фагоцитоза с одновременным повышением метаболической активности нейтрофилов периферической крови. У экспериментальных животных с ОДП выявлено более выраженное, по сравнению с отечной формой, снижение количества иммунных АОК в селезенке, РМ и РК регионарного и контралатерального лимфатических узлов, фагоцитирующих кариоцитов и поглощенных ими частиц, повышение показателей, характеризующих кислородзависимую активность нейтрофилов на фоне снижения резервов гранулоцитов (КАн, КАо, КО). Применение при ООП комбинации полиоксидония, эмоксипина и эссенциале Н нормализовало формирование ГИО, ГЗТ и фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови и корригировало, но не до параметров контроля, их метаболическую активность. В условиях ОДП введение комбинации полиоксидония, эмоксипина и эссенциале Н нормализовало развитие ГИО, показатели фагоцитоза (ФП, ФЧ и ИАФ), корригировало, но не до уровня нормы, формирование ГЗТ (РК и РМ) и показатели кислородзависимой активности нейтрофилов циркулирующей крови.

Заключение. Таким образом, при отечной и деструктивной формах острого панкреатита развиваются различные по степени выраженности нарушения адаптивного и врожденного иммунитета, что, вероятно, связано с масштабом поражения тканей железы. Комбинированная иммуномодулирующая, мембранопротекторная и антиоксидантная терапия оказалась эффективной при деструктивной, в большей степени при отечной, форме

острого панкреатита, что обосновывает ее применение в клинике.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ NK-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА

Михайлова В.А., Баженов Д.О., Хохлова Е.В., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. NK–клетки, присутствующие в эндометрии матки, играют важную роль в процессе имплантации и в дальнейшем развитии плаценты. В течение пролиферативной фазы менструального цикла NK-клетки матки представляют собой небольшую популяцию клеток, однако их количество в эндометрии значительно возрастает в секреторную фазу цикла. После имплантации зародыша в ходе децидуализации в эндометрии матки появляется большое количество децидуальных NK-клеток, составляющих до 70% всех лейкоцитов, присутствующих в децидуальной оболочке и примерно 30% всех клеток децидуальной оболочки. Данные литературы указывают на возможность формирования популяции NK-клеток децидуальной оболочки из NK-клеток периферической крови. В настоящее время малоизученным остается вопрос об изменении цитотоксической функции NK-клеток при контакте с клетками трофобласта при беременности. Для определения цитотоксической активности NK-клеток наиболее распространенным является метод, в котором оценивается гибель клеток-мишеней перевиваемой линии K562 после культивирования с NK-клетками. Данная система *in vitro* не учитывает особенностей межклеточных взаимодействий, которые могут происходить в децидуальной оболочке и плаценте, что не позволяет полноценно оценить вклад NK-клеток в развитие беременности. Поэтому **целью** настоящей работы была разработка и апробация нового метода оценки цитотоксической функции NK-клеток.

Материалы и методы. В исследование включено 89 пациентов, среди которых было 54 здоровые небеременные женщины без предшествующих беременностей в анамнезе, 14 здоровых мужчин и 21 здоровая женщина с физиологически протекающей беременностью на сроке 6-7 недель.

NK-клетки периферической крови оценивали в составе мононуклеаров, выделенных из периферической крови пациентов при помощи стандартного метода центрифугирования в градиенте плотности Histopaque®-1077 (Sigma, США). После выделения мононуклеары периферической крови, содержащие NK-клетки, инкубировали в культуральной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глютамина, 10 мМ пирувата натрия в течение 4 суток в присутствии IL-2 («Ронколейкин», ООО «НПК Биотех») и без него. Затем мононуклеары периферической крови в течение 4 часов инкубировали с клетками трофобласта линии Jeg-3, воспроизводящих основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики инвазивного трофобласта первого триместра беременности. Часть клеток трофобласта инкубировали в аналогичной культуральной среде без добавления мононуклеаров для определения базовой гибели клеток трофобласта. После этого оценивали количество нежизнеспособных клеток трофобласта. Полученные данные были статистически обработаны с помощью программы Statistica 10. Для сравнения полученных данных использовался U-критерий Манна–Уитни, являющийся непараметрическим аналогом t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми признавались различия при $p < 0,05$.

Результаты. Установлено, что цитотоксическая активность NK-клеток в отношении клеток трофобласта была повышена в присутствии IL-2 по сравнению с цитотоксической активностью NK-клеток, инкубированных без IL-2, во всех обследованных группах пациентов. Группа здоровых небеременных женщин не отличалась от группы здоровых мужчин по цитотоксическому эффекту NK-клеток в отношении клеток трофобласта как в присутствии IL-2, так и без него. Цитотоксическая активность NK-клеток в отношении клеток трофобласта была снижена в группе женщин с физиологической беременностью на сроке 6-7 недель по сравнению с группой здоровых небеременных женщин как в присутствии IL-2, так и без него.

Заключение. Таким образом, способность NK-клеток периферической крови повышать цитотоксическую активность в присутствии активатора (IL-2) в используемой нами системе свидетельствует о возможности применения данной модели для оценки изменений функционального состояния NK-клеток. Установленные различия цитотоксической активности NK-клеток в отношении трофобласта в группах беременных и небеременных женщин, вероятно, связаны прошедшей успешной имплантацией при физиологической беременности, и возможными контактами NK-клеток данных пациенток с клетками трофобласта *in vivo*, что приводит к снижению цитотоксической активности NK-клеток и преобладанию их регуляторной функции.

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Назаров А.С.[1, 2], Кудрявцев И.В.[1], Филатенкова Т.А.[1], Копейкин П.М.[1], Баландин С.В.[3], Овчинникова Т.В.[3], Артамонов А.Ю.[1], Орлов Д.С.[1, 2], Шамова О.В.[1, 2]

[1] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[3] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Поиск соединений, обеспечивающих доставку лекарственных соединений в опухолевые клетки, является актуальной задачей биомедицинских исследований. Известно, что ряд пептидов, объединенных в группу Cell-Penetrating Peptides (CPP – проникающие в клетки пептиды), обладают способностью к интернализации в эукариотические клетки, а также могут переносить соединения различной природы через клеточные мембраны. Наиболее известные представители CPP – пенетратин,

TAT, пептид VP22 и др. В литературе имеются данные, что некоторые пептиды системы врожденного иммунитета, в частности антимикробные пептиды нейтрофильных гранулоцитов человека и животных, тоже обладают свойствами CPP и могут рассматриваться как перспективные прототипы средств доставки противоопухолевых соединений в неопластические клетки.

Цель. Изучение интернализации пролин-богатых пептидов, несущих флуоресцентную метку, в клетки человека в культуре. Объектом исследования служили синтетические аналоги пептидов семейства бактенецинов и их структурные модификации: минибактенецин miniChBac7.5Na, пептиды, представляющие собой фрагменты молекулы бактенецина ChBac5 – ChBac5 20-43 и ChBac5 7-22, бактенецин ChBac3.4 и его структурная модификация ChBac3.4-m. Для сравнения использовали пептид, относящийся к группе CPP – TAT (фрагмент капсидного белка вируса иммунодефицита человека, производства фирмы Sigma, США).

Материалы и методы. Исследуемые бактенецины получали путем твердофазного пептидного синтеза на приборе Symphony X (Protein Technologies, США). Осуществляли конъюгацию пептидов с флуоресцентным красителем BODIPY FL (Invitrogen, США), как описано (Шамова и соавт., 2007). Меченые пептиды очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проникновение меченых пептидов в клетки K-562 (эритромиелоидная лейкемия человека), THP-1 (моноцитарная лейкемия человека), мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) здоровых доноров *in vitro* количественно оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по увеличению величины сигнала зелёной флуоресценции (BODIPY FL, Ex/Em 503/512) на приборе Navios™ (Beckman Coulter, США).

Результаты. Меченые пептиды в концентрации 0,2 мкМ инкубировали с клетками (100 000 клеток в 100 мкл среды RPMI 1640) в течение 60 мин при 37 °C, затем клетки осаждали центрифугированием и отмывали от избытка несвязавшегося пептида, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и анализировали на проточном цитофлуориметре. Перед измерением в пробы вносили раствор трипанового синего до конечной концентрации 40 мкг/мл, который служил в качестве «гасителя» флуоресценции BODIPY FL, так как, не проникая внутрь живых клеток, элиминировал сигнал от меченых пептидов, находящихся на поверхности клеток-мишеней. Установлено, что все исследуемые пептиды, несущие флуоресцентную метку, детектируются в клетках. Анализ показателей, характеризующих интенсивность флуоресценции, измеренной для трех типов клеток, обработанных пептидами, показал, что более эффективно все пептиды проникают в клетки K-562 и THP-1 по сравнению с МКПК здоровых доноров. Показатели, полученные для бактенецинов, были сравнимы или превышали таковые, полученные для пептида TAT (например, для пептида ChBac5 20-43 (0.2 мкМ) показатели интенсивности флуоресценции, выраженные в относительных единицах (отн. ед-цы), в случае клеток K-562 составили 10,1+2,32, клеток THP-1 – 65,3+13,4, МКПК – 5,76+2,2 отн. ед-ц; в то время как соответствующие показатели для пептида TAT (0,2 мкМ) составили 1,9+0,08, 4,1+1,2 и 1,26+0,07 отн. ед-ц). При этом наиболее выраженную способность проникать в исследуемые опухолевые клетки продемонстрировали пептиды ChBac5 20-43 и ChBac3.4-m.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые пролин-богатые пептиды обладают свойствами проникающих в клетки пептидов (CPP) и могут рассматриваться как прототипы соединений-переносчиков лекарственных средств в опухолевые клетки.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-02177а.

ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИЙ НА ИММУНОТОКСИЧНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Нежинская Г.И.[1], Ермоленко Е.И.[1, 2], Евдокимова Н.Р. [1], Шабанов П.Г.[1], Даниленко В.Н.[3], Суворов А.Н.[1, 2]

[1] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[3] ФГБУ «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова», Москва, Россия

Пробиотики, созданные на основе одного или нескольких штаммов бактерий (чаще всего лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков) оказывают влияние на микробиоту и практические все системы организма. Иммуномодулирующие действие пробиотических препаратов является одним из наиболее значимых для терапии и профилактики различных заболеваний, затрагивающих пищеварительную, нервную эндокринную и сердечно-сосудистую системы. Однако до сих пор остается малоизученной иммунотоксичность рассматриваемых препаратов.

Целью исследования являлось определение летальной дозы и иммунотоксического действия различных доз препарата М, включающего смесь пробиотических штаммов *Enterococcus faecium* L3, *Lactobacillus rhamnosus* K32, *Bifidobacterium longum* GT15 в реакциях гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), антителообразования в селезенке (АОК) и оценки активности перитониальных макрофагов. В работе использовали мышей-самцов линии BALB/c (n = 90) и беспородных белых мышей (n = 120). Исследование разрабатываемой лекарственной формы М на острую токсичность показало, что LD50 составляет 2×10^9 КОЕ/мышь, а терапевтическая доза (1/100 LD50) – 2×10^7 КОЕ/мышь. В связи с данными результатами при исследовании иммунотоксичности были взяты дозы – 2×10^7 и 2×10^8 КОЕ/мышь. Препарат М вводили внутрижелудочно в соответствии с предполагаемым способом его применения в клинике (*per os*). Контрольные животные получали по 0,3 мл плацебо (0,9%-ный раствор NaCl). В качестве препарата сравнения использовали Линекс (Lek®, Словения), содержащий *L. acidophilus, B. infantis, E. faecium* в дозе 5×10^7 КОЕ/мышь. Изучение влияния М на иммунитет было проведено в соответствии с ранее предложенными рекомендациями (Миронов А.Н. и соавт., 2013). Было показано, что пробиотик М в высокой дозе (2×10^8 КОЕ/мышь), но не в терапевтической, увеличивал (через 3, 6 и 24 ч) интенсивность ГЗТ, по сравнению с контролем (введением эритроцитов барана, $p < 0,001$, n = 10). Применение терапевтической дозы М стимулировало образование АОК в селезенке мышей ($p < 0,05$, n = 10), а использование высокой дозы существенно супрессировало его ($p < 0,001$, n = 10). Оценка модуляции ответа АОК при введении М и Линекса с оче-

видностью демонстрировало, что индекс модуляции при применении М в дозе 10^8 КОЕ/ мышь и Линекса 5×10^7 КОЕ/мышь определялся со знаком «–», свидетельствуя о токсическом действии этих препаратов и необходимости ограничения их дозы. В отношении действия на фагоцитоз макрофагов, подтверждалось, что М в дозе 2×10^7 КОЕ/мышь, эффективно увеличивает концентрацию макрофагов в перитонеальном экссудате и их поглотительную активность ($p < 0,001$). Показано, что М в дозе 10^7 М существенно превосходил влияние Линекса на фагоцитарную активность макрофагов ($p < 0,001$). Однако высокая доза (2×10^8 КОЕ/мышь) М приводило к снижению фагоцитарного индекса.

Таким образом, разрабатываемый препарат М, в состав которого входят штаммы *E. faecium* L3, *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15, в дозе 10^7 КОЕ/мышь, не нарушает функционирование иммунной системы, а по стимуляции фагоцитарной активности превосходит Линекс. При включении пробиотиков в схемы таргетной терапии различных заболеваний нужно учитывать, что дозы препаратов могут существенно влиять на реализации важных функции иммунной системы.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА ФОСПРЕНИЛ НА ПОЛЯРИЗАЦИЮ ИММУННОГО ОТВЕТА, ОБУСЛОВЛЕННУЮ CagA$^+$ ФРАГМЕНТОМ ХРОМОСОМЫ *HELICOBACTER PYLORI*

Николаева Т.Н., Козлов В.В., Григорьева Е.А., Белый Ю.Ф., Пронин А.В.

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Иммунные механизмы являются ключевыми в формировании *Helicobacter pylori* (H.p), ассоциированной гастродуоденальной патологии.

Функциональные белки CagA M.M.120-145-kDa, кодируемые островком патогенности cagA(cagPAI) в 40kb, интегрированным в хромосому *H.p.*, воздействуют на множественные сигнальные пути, которые регулируют естественный клеточный иммунитет, в том числе Th-клетки. С CagA ассоциировано смещение поляризации иммунного ответа с Th1 на Th2 с параллельным возрастанием активности регуляторных Т-клеток и прогрессией тяжелых форм поражения желудка вплоть до аденомокарциномы. При инфекции, вызванной CagA$^-$ *H.p.*, такого смещения не наблюдается.

В связи с этим актуален поиск путей иммунокоррекции естественного и адаптивного иммунитета при хеликобактериозе. Фоспренил (ФП) относится к фосфориллированным полиизоприноидам, которые являются интегральными компонентами мембран всех живых клеток, где выполняют функции промежуточных акцепторов сахаров (в частности маннозы) при биосинтезе гликопротеинов. Ранее было показано, что препарат способен подавлять взаимодействие IL-2 с CD25 и, таким образом, препятствовать активации регуляторных Т-клеток. В связи с этим цель настоящего исследования состояла в изучении действие препарата ФП на иммунный ответ экспериментальных животных, инфицированных живыми бактериями генетически родственных штаммов *E. coli* BL21, отличающихся наличием островка cagA *H.pylori*.

Материалы и методы. бактерии генетически родственных штаммов живых бактерий *E. coli* BL21p119(CagA$^+$) и *E. coli* BL21pET-28c (CagA$^-$). Мышам интрагастрально через металлический зонд вводили живые бактерии изученных штаммов в количестве 5×10^9 КОЕ/0,5 мл. Клеточные иммунные реакции оценивали по уровню пролиферации спленоцитов в реакции бласттрансформации (РБТЛ), цитотоксической активности ЕК-клеток селезенки, синтезу цитокинов методом ELISA. Анализ экспрессии поверхностных антигенов на мононуклеарных лимфоцитах селезенки проводили методом проточной цитофлуорометрии с использованием моноклональных антител анти-CD3-FITC, CD4-PE-Cy7, CD8-APC (BD Biosciences, USA). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACS CantoII (BD Biosciences, USA).

Результаты. Введение животным *E. coli* CagA$^+$ уже через сутки сопровождается резким усилением пролиферативной активности спленоцитов, чего не наблюдается после заражения изогенным CagA$^-$ штаммом *E. coli* BL21. Предварительное введение животным ФП за 3 часа до заражения нивелирует различия между штаммами. При этом ФП усиливал активацию естественных киллеров у мышей, зараженных штаммом *E. coli* BL21p119 (CagA$^+$), значительно сильнее, чем у животных зараженных штаммом, не продуцирующим CagA белки ($P < 0,05$).

Методом проточной цитофлуориметрии показано, что ФП сильнее снижает число CD3$^+$CD4$^+$Т клеток у мышей, инфицированных CagA$^+$, по сравнению с мышами, инфицированными CagA$^-$ мутантом и подавляет продукцию IL-2 Т-клетками, оставляя неизменным соотношение IFNγ, IL-4 и IL-10, что свидетельствует об ингибирующем воздействии ФП на регуляторные Т-клетки.

Таким образом, ФП, подавляя активность регуляторных Т-клеток, может препятствовать поляризации иммунного ответа с Th1 на Th2, связанной с активностью CagA.

ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ *IN VITRO*

Пазина Т.Ю.[1], Артамонов А.Ю.[1], Орлов Д.С.[1, 2], Филатенкова Т.А., Шамова О.В.[1, 2]

[1] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Нейтрофилы, циркулирующие в периферической крови и мигрирующие в очаги развития патологических процессов, способны посредством биологических активных молекул модулировать иммунный ответ, а именно влиять на функцию цитотоксических Т- и ЕК-клеток. Роль нейтрофильных гранулоцитов в опухолеобразовании неоднозначна, так как секретируемые этими клетками факторы могут, как стимулировать опухолевый рост, так и способствовать его ограничению. Известно, что катионные пептиды (АМП) нейтрофилов, проявляющие антимикробные свойства, обладают также и противоопухолевой активностью.

Целью исследования явилась оценка влияния пептидов системы врожденного иммунитета альфа-дефенсина человека HNP-1, кателицидина человека LL-37, бета-дефенсина человека hDB-3, а также двух АМП животных: протегрина 1 (PG-1) и бактенецина ChBac.3.4 на цитотоксическое действие ЕК- и Т-клеток фракции мононуклеаров периферической крови здоровых доноров в отношении клеточных линий множественной миеломы (ММ): MM.1R и RPMI8226, *in vitro*.

Цитотоксическую активность ЕК-клеток фракции мононуклеаров здоровых доноров определяли по их способности лизировать клетки-мишени RPMI-8226 и MM.1R *in vitro,* при помощи набора реактивов Delfia EuTDA Cytotoxicity Reagents kit (PerkinElmer, США). Пептиды применяли в концентрации, при которой они, по результатам МТТ-теста, не проявляют токсичности для клеток-мишеней и эффекторов: PG-1 – 2 мкМ, LL-37 –5 мкМ, HNP-1 – 10 мкМ, hDB-3 – 1 мкМ, ChBac.3.4 – 5 мкМ. Лизис клеток-мишеней количественно оценивали, проводя измерения в режиме отсроченной во времени флуоресценции (TRF) на приборе Omega Polar Star (BMG Labtech, Германия). Результаты рассчитывали в процентах по формуле: % лизиса = (экспериментальное значение – контроль (0% лизиса))/(контроль (100% лизиса) – контроль (0% лизиса)).

В большинстве случаях установлено увеличение лизиса таргетных клеток в присутствии мононуклеаров и пептидов по сравнению с контрольными пробами, где клетки инкубировались только в присутствии мононуклеаров или только пептидов. Действие LL-37 – пептида, который содержится преимущественно в нейтрофилах или в клетках барьерных эпителиев человека, наиболее выражено для всех исследованных клеточных линий. Интересно, что данным эффектом обладал, как мембранолитический пептид PG-1, имеющий конформацию бета-шпильки, так и линейный пролин-богатый бактенецин ChBac3.4, для которого описано менее выраженное повреждающее действие в отношении клеточных мембран. Бета-дефенсин человека hBD3, который проявил наиболее высокую собственную цитотоксическую активность в отношении клеток ММ *in vitro*, оказывал наименьший эффект на цитотоксическое действие мононуклеарных клеток в данных экспериментальных условиях.

Полученные е данные свидетельствуют в пользу предположения о возможном участии АМП в противоопухолевой защите, не только вследствие их прямого цитотоксического действия на малигнизированные клетки, но и за счет их взаимодействия с ЕК- и Т-клетками.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-02177а.

ВЛИЯНИЕ ОКСИТОЦИНА НА СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ У ЛАКТИРУЮЩИХ КРЫС

Панова Н.А., Скопичев В.Г.

Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Лактационные процессы в молочной железе тесно связаны с деятельностью иммунной системы. Эта взаимосвязь может проявляться в непосредственной регуляции секретообразования. В результате, отдельные иммунокомпетентные клетки мигрируют в просвет альвеол и включаются в состав секрета молозива и молока. Синтез молока и молозива молочной железой, а также проницаемость гемато-молочного барьера, являются важными составляющими для дальнейшего роста и развития потомства. В первые дни жизни молозиво играет исключительную роль в поддержании иммуной системы новорожденного, так как содержит необходимые для него иммуноглобулины. Помимо антител, с секретом молочных желез, в организм детёныша поступают лейкоциты, которые проникают через гемато-молочный барьер и являются клеточными факторами защиты. В молоке постоянно присутствуют лимфоидные клетки, количество которых значительно изменяется под влиянием окситоцина на рецепторы миоэпителиальных клеток. Раздражение механорецепторов молочной железы стимулирует выделение нейрогипофизом в кровь окситоцина, который непосредственно стимулирует молокоотдачу из альвеол.

В настоящее время влияние клеточного и гуморального иммунитета на молочную железу самок, в период лактации, изучен недостаточно. Вместе с тем проблемы клеточного иммунитета, приобретаемого потомством с молозивом и молоком, являются актуальными и насущными.

Цель и задачи. Изучение количественного состава лейкоцитов в мазках-отпечатках молочной железы лактирующих крыс до влияния окситоцина и через 5 и 10 минут после введения гормона нейрогипофиза.

Материалы и методы. Экспериментальная часть выполнена на безлинейных лактирующих крысах. Сформировали 3 группы крыс по 5 животных в каждой. Продолжительность лактации в контрольной и опытных группах, на момент исследования, составляла 1 неделю. Крысам опытных групп вводили внутрибрюшинно окситоцин в дозе 0,1 мл. У крыс всех групп выделяли молочные железы. В опытных – через 5 и 10 минут. Делали продольный разрез и на предметных стеклах готовили мазки-отпечатки. Готовые, высушенные мазки окрашивали по Паппенгейму и проводили подсчет иммунокомпетентных клеток при помощи иммерсионной оптики.

Результаты. Анализ полученных нами данных показал, что иммунокомпетентные клетки присутствуют во всех мазках-отпечатках. В молочной железе контрольной группы установлено незначительное количество отдельных видов лейкоцитов. В опытных группах, под влиянием окситоцина, существенно изменился количественный и качественный состав лейкоцитов.

Раздражение рецепторов миоэпителиальных клеток молочной железы окситоцином через 5 минут стимулировало значительное повышение количества лимфоцитов, по сравнению с контрольной группой, с 15 до 35 и к 10-й минуте снизилось до 6 клеток. В молочных железах находились большие, малые, средние и делящиеся лимфоциты. В мазках-отпечатках присутствовали палочкоядерные, сегментоядерные нейтрофилов и моноциты. Но их количественный состав менялся незначительно. При микроскопическом исследовании мазков-отпечатков молочной железы встречались жировые и эпителиальные клетки.

Заключение. В непосредственном контакте с секреторными и миоэпителиальными клетками альвеол находятся такие клеточные компоненты соединительной ткани как тучные клетки и лейкоциты, оказывающие влияние на деятельность клеток альвеол. Барьер «кровь-молоко» способны преодолевать только мигрирующие, активированные лейкоциты. Не активированные лейкоциты локализуются в эпителиальных тканях и выполняют функции иммунологичекой защиты.

Повышение содержания лейкоцитов в молочной железе, после стимуляции окситоцином, происходило за счет увеличения числа лимфоцитов. Проникновение их из крови в молочную железу и изменение гемато-молочного барьера связано с действием окситоцина.

Во время лактации механизмы иммунной системы самки максимально направлены на защиту потомства и поддержание его иммунного статуса в первые дни жизни. Происходит этот процесс под непосредственным контролем нейрогуморальной регуляции. С молозивом и молоком новорожденный получает все питательные вещества и иммуноглобулины, необходимые для роста и развития организма. Но данные защитные факторы быстро элиминируют.

На основе наших исследований можно предположить, что клеточные факторы защиты являются составляющими колострального иммунитета, в результате которого у новорожденного обеспечивается стойкий и длительный иммунитет.

ОЦЕНКА ХРОНОСОПРЯЖЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ПЛОТНОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТКАНЕВЫХ БАЗОФИЛОВ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПОСЛЕРОДОВОМ ПЕРИОДЕ

Параскун А.А., Виноградов С.Ю., Штойко М.А., Чериков В.С.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

По данным популяционных исследований, в последние годы увеличивается распространенность заболеваний щитовидной железы у женщин во время беременности и лактации. В поддержании внутриорганного гомеостаза щитовидной железы принимают участие тканевые базофилы, которые накапливают и выделяют широкий спектр биологически активных веществ, тем самым регулируя пролиферацию клеток, их дифференцировку, функциональную активность и межклеточные взаимодействия. **Цель** исследований – оценка хроносопряженности динамики плотности пространственного распределения тканевых базофилов (ТБ) и морфофункциональных параметров щитовидной железы (ЩЖ) в послеродовом периоде. Работа выполнена на 40 беспородных крысах-самках. Сроки эксперимента составили – 0, 1, 3, 5, 7, сутки после родов и лактации. Исследования с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». После забоя у крыс отделяли обе доли ЩЖ. Одна доля подвергалась криостатному микротомированию, а другая – парафиновой проводке. Для оценки плотности пространственного распределения ТБ срезы окрашивали альциановым синим-сафранином в прописи J. Desaga и изучали с помощью микроскопа Биолам (об. 90, ок.10). Подсчитывали количество тканевых базофилов в поле зрения (10 полей зрения – 1 варианта статистического массива). При анализе результатов тучные клетки были разделены на основе сродства гранул к красителям на 3 группы: альцианофильные, миксные, сафранинофильные. Морфометрические исследования препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином, проводили с помощью анализатора изображений, используя программу ВИДЕО ТЕСТ МАСТЕР. Содержание тироксина (Т4), трийодтиронина (Т3), тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови животных определяли методом ИФА. Статистическая обработка материала проводилась с использованием программ Microsoft Excel 2010, Statistica 6.0. Для выявления и анализа внутри- и межрегиональных сопряжений изменения оценочных параметров применялся непараметрический метод рангового корреляционного анализа Спирмена. В результате исследований изучена 361 ранговая корреляционная зависимость, из них 152 отражают колебания показателей с ТБ (28% достоверных). Динамику хроносопряжений ТБ между собой оценивают 37%, а с морфофункциональными параметрами ЩЖ 63%. Блок наиболее тесных зависимостей выявлен между общим количеством ТБ и показателями ЩЖ (32%): отрицательные («-») – с высотой тироцитов, площадью фолликулов; положительные («+») – с индексом накопления коллоида, содержанием ТТГ в сыворотке крови. В центральных зонах ЩЖ большим количеством значимых связей обладает изменение сафранинофильных ТБ («-» с высотой тироцитов, площадью фолликулов; «+» с уровнем Т3), в периферических участках железы – миксных ТБ («+» с индексом накопления коллоида и его оптической плотностью, содержанием Т4). Таким образом, корреляционный анализ демонстрирует хроносопряженность динамики плотности распределения ТБ и показателей функциональной активности ЩЖ.

ВЛИЯНИЕ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НА МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЬЮИС У МЫШЕЙ

Попова Н.А.[1, 2], Каледин В.И.[2], Николин В.П.[2], Амикишиева А.В.[2], Ильницкая С.И.[2]

[1] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[2] ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия

Исследование условий и особенностей метастазирования злокачественных опухолей представляется весьма актуальным, поскольку именно метастазы опухолей являются непосредственной причиной смертельных исходов онкологических заболеваний.

Не вызывает сомнений, что хронический стресс и сопровождающая его общая напряженность, которая перерастает в чувство повышенной тревожности и далее в депрессию, оказывает влияние на рост и метастазирование злокачественных опухолей. Механизм этого феномена может реализоваться путем индукции психоэмоционального иммунодефицита. Ранее нами показано, что хронический стресс в виде 20-дневных ежедневных социальных конфронтаций в одинаковой степени усиливает рост аденокарциномы Льюис как у победителей в межсамцовых столкновениях, так и у побежденных. Однако число метастазов в легких при этом увеличивается только у побежденных. В использованной нами модели социальных конфликтов побежденные самцы имеют последствия ежедневных драк в виде повреждений кожи, что очевидно вызывает воспаление, которое в свою очередь может стать причиной иммунодефицита. Чтобы исключить эту возможность, мы изучали зависимость метастазирования от психоэмоционального статуса на поведенческой модели, в которой формирование соответствующего статуса про-

исходит без физических повреждений. Использовали непредсказуемый мягкий стресс (НМС) включающий наклон клетки, лишение пищи или воды до 12 часов, ограничение подвижности на 1 час, тряска в вибрирующей установке 1 час, изъятие подстилки или мокрая подстилка. Ранее показано, что такой стресс провоцирует развитие депресивноподобного статуса у мышей и крыс. В результате было показано, что у мышей подвергшихся НМС, число метастазов опухоли Льюис в легких увеличено в 2 раза, по сравнению с контролем. Таким образом, сдвиг психоэмоционального состояния в негативную сторону оказывает влияние на процесс метастазирования. Это надо учитывать при ведении онкологических больных в клинике.

РОЛЬ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β-ГЛИКОПРОТЕИНА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОК ИММУННОЙ ПАМЯТИ

Раев М.Б.[1,3], Литвинова Л.С.[2], Юрова К.А.[2], Дунец Н.А.[2], Хазиахматова О.Г.[2], Тимганова В.П.[1], Бочкова М.С.[1], Храмцов П.В.[1,3], Заморина С.А.[1,3]

[1] ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, Пермь, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия
[3] ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Трофобластический β1-гликопротеин (ТБГ) является одним из наиболее информативных маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы. Невзирая на очевидный иммунорегуляторный потенциал ТБГ, его роль в регуляции Т-клеток иммунной памяти остается неизвестной. В то же время, присутствие фетоплацентарных антигенов в период беременности, модулирует Т-клеточную память, что имеет значение для формирования иммунной толерантности, а также для последующей беременности (Keiffer T.E. et al., 2016). Можно предположить, что ТБГ регулирует функциональную активность циркулирующего пула Т-клеток памяти, потенциально способных к осуществлению антиген-специфических цитотоксических реакций в отношении антигенов эмбрионального происхождения.

Цель. Оценка роли ТБГ в регуляции экспрессии маркеров активации (CD25, CD28, CD71) и продукции IL-2 изолированной субпопуляцией Т-клеток памяти в системе *in vitro*.

Материалы и методы. Аутентичный нативный ТБГ человека получали авторским методом (Патент РФ № 2367449, Раев М.Б.). Монокультуры Т-клеток памяти ($CD45RO^+$) получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® (“Miltenyi Biotec”, Германия) из суспензии МПК здоровых доноров (n = 8). Выделенные клетки с фенотипом $CD45RO^+$ (1×10^6кл/мл) культивировали в 48-луночных планшетах в полной питательной среде в течение 48 ч при 37 °С, 5% CO_2. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали T-Cell Activation/Expansion Kit human (анти-CD2/CD3/CD28 комплекс) (Miltenyi Biotec, Германия). Определение поверхностных молекул костимуляции и активации (CD71 FITC, CD8 PE, CD25 PE-Cy 5.5, CD28PE Cy7, CD4 APC, Miltenyi Biotec, Германия) на $CD45RO^+$Т-клетках проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Содержание IL-2 в культуральных супернатантах оценивали иммуноферментным методом при помощи тест-систем «Вектор-Бест» (Россия). Статистическая обработка данных проводилась с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Первым этапом анализа данных стала оценка дифференцировки Т-клеток памяти ($CD45RO^+$) по субпопуляциям $CD4^+$ и $CD8^+$. Установлено, что изолированные CD45RA-клетки в контрольных пробах имели следующее соотношение: $CD4^+$ 68,12±4,11; $CD8^+$ 25,95±5,32; $CD4^+CD8^+$ 0,549±0,161. Установлено, что ТБГ (10, 100 мкг/мл) снижал экспрессию CD25 в гейте $CD45RO^+CD4^+$ лимфоцитов, активированных анти-CD2/CD3/CD28 комплексом, но не влиял на экспрессию CD28 и CD71 этими клетками. Как известно, CD25 (α-цепь рецептора для IL-2) представляет собой маркер активации и тесно связан с продукцией IL-2. Одновременно ТБГ стимулировал аутокринную продукцию IL-2 $CD45RO^+$ клетками, но это не приводило к усилению экспрессии CD25. IL-2 необходим для развития Т-регуляторных лимфоцитов, увеличение количества которых ассоциировано с успешной беременностью (Shumacher A et.al., 2009) и, возможно, именно они являются «мишенью» для IL-2, продуцируемого CD45RO-клетками под воздействием ТБГ. Важно отметить, что депрессивные эффекты ТБГ реализовались только на уровне $CD4^+$ лимфоцитов, не затрагивая субпопуляцию $CD8^+$, что согласуется с данными Keiffer T.E. (2016).

Таким образом, впервые установлена роль ТБГ в регуляции активности Т-клеток иммунной памяти, ассоциированная с подавлением экспрессии активационного маркера CD25 и стимуляцией продукции этими клетками IL-2. Полученные данные расширяют представления о роли ТБГ в формировании иммунной толерантности в период беременности.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-44-0049 и программой повышения конкурентноспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ им. И. Канта.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЛИКАН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ПАТТЕРНА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

Рапопорт Е.М., Моисеева Е.В., Хайдуков С.В., Аронов Д.А., Пазынина Г.В., Цыганкова С.В., Бовин Н.В.

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Введение. В последнее время все большее значение приобретают исследования по созданию универсальных вакцин, направленных на активацию дендритных клеток (ДК). Особенно привлекательно использовать ДК в качестве мишени в вакцинах для терапии инфекционных заболеваний, вызванных бактериями и вирусами, которые характеризуются высокой генетической изменчивостью. У вирусов и бактерий ДК распознают патоген-ассоциированные молекулярные структуры (ПАМС). Дополнительная нагрузка вакцин лигандами лектинов, связывание последних с соответствующими ПАМС может при-

вести к активации эндоцитоза ДК чужеродного антигена (Lepenies et al., 2013; van Kooyk et al., 2013).

Недавно мы провели картирование клеток крови человека с помощью библиотеки флуоресцеин-меченых полиакриламидных гликоконъюгатов (гликопроб), синтезированных в Лаборатории углеводов ИБХ РАН. Из 230 исследованных гликопроб было выбрано восемь, с которыми связывалось более 15% популяции лейкоцитов крови человека, содержащей циркулирующие дендритные клетки (цДК) и «неклассические» моноциты (нМо). Дальнейшее исследование показало, что нМо связываются с 4-O-Su-GalNAcb1-4GlcNAcb (4'-O-Su-LacdiNAc), цДК – с Man-содержащими гликанами: Mana1-3(Mana1-6)Manb $(Man)_3$, $(Galb1\text{-}4GlcNAcb1\text{-}2Mana)_2$3,6-Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb и Mana1-3(Mana1-6)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb, а также с трисиалозидом $(Neu5Aca\text{-}8)_3$ и дисахаридом GalNAca1-3Galb (A_{di}) (Rapoport et al., 2017). Анализ данных о локализации и специфичности лектинов позволил нам предположить, что мишенями выбранных гликанов в составе вакцин могут быть макрофагальный галактозосвязывающий лектин, MGL (A_{di}), сиглек-7 ($(Neu5Aca2\text{-}8)_3$) и дектин-2 (Man-содержащие гликаны). Мы полагаем, что эти гликаны могут быть использованы в качестве дополнительных векторов для улучшения доставки вакцины к ДК.

В экспериментах *in vivo* терапевтическое действие вакцин часто исследуется на мышиных моделях. В связи с этим **целью** данной работы было провести сравнительный анализ гликан-связывающего профиля популяции, содержащей цДК и нМо, в крови человека и мыши.

Методы. Сначала, используя боковое светорассеяние (SSC) и экспрессию CD45 на лейкоцитах, в периферической крови мыши были гейтированы моноциты, затем была локализована популяция клеток, экспрессирующая $CD14^{low\text{-}to\text{-}neg}CD80^+CD16^+$, содержащая цДК и нМо. Далее исследовалось связывание этих клеток с гликопробами, которые были выбраны нами при скрининге этой же популяции в крови человека (van Kooyk et al., 2013).

Результаты. 1) Из восьми гликопроб, с которыми связывалось более 15% популяции цДК+нМо человека, для четырех уровни связывания цДК+нМо мыши были тоже высокие, а именно для $A_{di,}$

Mana1-3(Mana1-6)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb, $(Neu5Aca\text{-}8)_3$ и 4'-O-Su-LacdiNAc, с последним связываются нМо, а не цДК (Rapoport et al., 2017). 2) Наиболее высокий уровень связывания (более 50%) популяции цДК+нМо человека выявлен с гликопробой A_{di}, цДК+нМо мыши связывались с этой гликопробой слабее. По-видимому, это объясняется различной углеводной специфичностью MGL человека и его мышиных гомологов MGL1 и MGL2.

Заключение. Гликан-связывающий профиль мыши и человека не идентичен, что должно учитываться при исследовании механизмов терапевтического действия вакцины, содержащей гликановый вектор, на мышах *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований – № 16-04-01084 и гранта UniVaxA "Universal influenza vaccine through synthetic dendritic cell-targeted self-replicating RNA vaccines" (№ 601738).

РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ В КОНТРОЛЕ ИММУННОГО ОТВЕТА И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ЛЕГКИХ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Рубакова Э.И., Капина М.А., Логунова Н.Н., Майоров К.Б., Апт А.С.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Считается, что Т-лимфоциты $CD4^+$, вырабатывающие IFNγ, и интерстициальные легочные макрофаги, активированные этим цитокином, играют главную роль в защите от хронической туберкулезной инфекции (ТБ), которая развивается в тех случаях, когда факторы естественной резистентности не справились с инфекцией в самой ранней фазе. В этих случаях инфекционный процесс в легких чаще всего сопровождается избыточным воспалением и разрушением легочной ткани. Контроль за этими угрожающими жизни процессами осуществляется разными типами клеток, среди которых следует отметить регуляторные клетки: дендритные клетки (DCreg) и Т-клетки (Treg). В многочисленных работах нашей группы было показано, что особой склонностью к воспалению легочной ткани и ее избыточной инфильтрации различными лимфоидными клетками отличаются генетически чувствительные к ТБ мыши линии I/St. Ранее мы охарактеризовали влияние DCreg на иммунный ответ резистентных и чувствительных к ТБ мышей в клеточных культурах *in vitro*, где DCreg получали из высоко очищенных клеток костного мозга Lin^- после 6-дневного культивирования с клетками стромы легкого (Kapina et al., 2013). Нами было показано, что DCreg резистентных к туберкулезу мышей C57BL/6 подавляют пролиферативный ответ Т-клеток значительно сильнее, чем такие же клетки мышей линии I/St.

Получив результаты, указывающие на возможную связь между избыточным, плохо регулируемым воспалением у чувствительных к инфекции животных с количественным и функциональным недостатком регуляторных клеток, мы попытались ограничить избыточный ответ в легких зараженных мышей I/St линии внутривенным введением регуляторных дендритных клеток (DCreg). Мышей I/St заражали аэрогенным введением микобактерий (*M. tuberculosis* H37Rv, 102/мышь), через 2-3 недели после заражения вводили выращенные *in vitro* клетки DCreg (1×10^6/мышь). Через 2 недели определяли в легких количество эффекторных Т-клеток $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ и регуляторных Т-клеток (Treg) с фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, продукцию цитокинов, гистологические изменения и количество микобактерий. Контрольными группами служили мыши, которым вводили выделенные из костного мозга и очищенные миелоидные клетки фенотипа $CD11b^+$, и зараженные животные без введения клеток.

Введение DCreg мышам улучшало морфологическую картину в легких по сравнению с контрольными животными, на порядок снижало количество микобактерий в легких, в 2 раза увеличивало количество регуляторных Т-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ и уменьшало количество нейтрофилов в легких. При введении регуляторных дендритных клеток (DCreg) в легких этих мышей уменьшалась продукция IFNγ и IL-10, в то время как продукция TGF-β и IL-6 не изменялась. Продолжительность жизни животных при введении DCreg достоверно не увеличивалась.

Таким образом, было установлено, что регуляторные клетки действительно принимают участие в сдерживании патологического процесса при инфекции, но модуляция инфекционного процесса с помощью клеточной терапии является очень сложной задачей, решение которой требует, как минимум, детальных знаний о динамике воспалительного процесса, и кратности введения клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда 15-15-30020.

ВЛИЯНИЕ СЕМАФОРИНА 3А НА ФУНКЦИИ ТИМОЦИТОВ МЫШИ

Рутто К.В., Кудрявцев И.В., Людыно В.И., Киселева Е.П.

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

Семафорин 3А (Sema 3A) известен как фактор, направляющий рост аксонов. Однако действие этого фактора гораздо шире и затрагивает клетки иммунной системы. В тимусе он синтезируется эпителиальными клетками и регулирует процесс адгезии тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса человека (Lepelletier Y., 2007).

Цель. Изучение влияния Sema 3A на пролиферацию, миграцию и адгезию тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса мыши.

Адгезию тимоцитов проводили на двух линиях эпителия тимуса мыши – кортикального cTEC1-2 и медуллярного mTEC3-10 (Kasai M. et al., 1996). Пролиферацию тимоцитов изучали в присутствии конканавалина А (Con A) и без него с помощью МТТ-теста и визуального подсчета клеток. Миграцию тимоцитов мыши изучали с использованием поликарбонатных вставок с диаметром пор 5 мкм 24-луночного формата (Kim C. et al., 1998).

На первоначальном этапе исследований с использованием реакции обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) было выявлено, что тимоциты экспрессируют мРНК следующих рецепторов Sema 3A: PlexA1, PlexA2, PlexA3 и Nrp-1. При исследовании поверхностной экспрессии рецепторов с помощью проточной цитометрии среди тимоцитов было выявлено 37,5% PlexA1$^+$ клеток и 89,8% Nrp-1$^+$ клеток. Полученные данные указывают на то, что тимоциты могут служить мишенями для действия Sema 3A.

С помощью МТТ-теста было показано, что Sema 3A снижает митоген-индуцированную пролиферацию тимоцитов в концентрациях 100 нг/мл ($ОП_{570}$ в контроле – 0,285±0,014, n = 6; с Sema 3A – 0,236±0,013, n = 5, p < 0,05) и 200 нг/мл ($ОП_{570}$ в контроле – 0,317±0,021, n = 6; с Sema 3A – 0,243±0,011, n = 6, p < 0,05). Полученные данные подтвердились при визуальном подсчёте клеток (в контроле – 4,82±0,09 млн/мл, n = 3; с Sema 3A 100 нг/мл – 4,28±0,06 млн/мл, n = 3, p < 0,05; с Sema 3A 200 нг/мл –3,48±0,11 млн/мл, n = 3, p < 0,05).

Далее было показано, что Sema 3A в концентрациях 10-200 нг/мл дозозависимо ингибировал адгезию тимоцитов к обеим клеточным линиям (при 30 и 120 мин инкубации) с максимальны эффектом в концентрации 200 нг/мл. Чтобы выяснить, какие клетки являются мишенью действия Sema 3A, тимоциты и эпителиальные клетки прединкубировали раздельно с Sema 3A (200 нг/мл) в течение 2 ч, после чего клетки отмывали 3 раза и проводили адгезию в течение 30 мин. Ингибирующий эффект Sema 3A сохранялся только при предварительной обработке тимоцитов, как на cTEC1-2 (индекс адгезии в контроле 33,12±0,57 n = 10; с Sema 3A 28,4±1,6 n = 10, p < 0,05), так и на mTEC3-10 (в контроле 39,66±0,82 n = 8; с Sema 3A 32,53±0,76 n = 10, p < 0,001). При этом предобработка Sema 3A клеток эпителия эффекта не давала. Обработка тимоцитов блокирующими антителами к Nrp-1 полностью отменяла ингибирующий эффект 200 нг/мл Sema 3A на адгезию тимоцитов к кортикальным (индекс адгезии в контроле 43,96±1,85 n = 6; с Sema 3A 21,58±9,96 n = 6; с Sema 3A и антителами к Nrp-1 – 42,67±1,33 n = 6, p < 0,001) и медуллярным клеткам (в контроле: 28,85±1,10 n = 6; с Sema 3A 24,40±1,59 n = 6; с Sema 3A и антителами к Nrp-1: 32,54±1,95 n = 6, p < 0,05). Таким образом, ингибирующий эффект Sema 3A был связан с его действием на тимоциты, а не на клетки эпителия, и опосредован через рецептор Nrp-1 на тимоцитах.

Кроме того, Sema 3A в концентрации 100 нг/мл оказывал хеморепеллентный эффект в отношении тимоцитов, а предобработка тимоцитов антителами к Nrp-1 отменяла эффект Sema 3A (индекс миграции в контроле 1,49±0,01 n = 5; с Sema 3A 0,65±0,08 n = 5, p < 0,001; с Sema 3A и антителами к Nrp-1 – 1,21±0,08 n = 5, p < 0,01).

Таким образом, были получены новые данные о влиянии Sema3A на пролиферацию, миграцию тимоцитов мыши и их адгезию к эпителиальным клеткам тимуса, имеющие значение для лучшего понимания процесса созревания Т-лимфоцитов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-06150.

ЛПС-СТИМУЛИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ МИГРИРУЮТ В ТИМУС И ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ

Семенова М.А., Сергеев В.Г.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет» Ижевск, Россия
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия

Введение. Представление о роли тимуса в иммунологических механизмах инфекционных заболеваний ограничивается представлением о закономерной акцидентальной инволюции этого органа в ходе формирования адаптационного синдрома в ответ на действие стрессорных инфекционных агентов. Наряду с данными о прямом атрофическом действии на тимус гормонов надпочечников, появляется информация о том, что и сами бактериальные агенты через клеточное опосредование влияют на интенсивность гибели тимоцитов. Важную роль в механизмах такого взаимодействия могут играть макрофаги, которые, как показали последние исследования, способны проникать в тимус после нагрузки антигеном на периферии и вызывать селективную клональную делецию тимоцитов, имеющих рецепторы к данному антигену.

Однако из этих экспериментов остается неясным ограничено ли их действие только делецией относительно зрелых антигенспецифических Т-клеток мозгового вещества, или мигрирующие в тимус макрофаги способны к индукции апоптоза малодифференцированных тимоцитов корковой зоны, т.е. участвовать в процессе атрофии тимуса. Для ответа на этот вопрос мы провели эксперимент, целью которого явилась оценка интенсивности

апоптоза Т-клеток различных областей тимуса крыс, вызываемого интраперитонеальным переносом аутологичных макрофагов, предварительно активированных *in vitro* бактериальным полисахаридом и окрашенных прижизненных красителем для выяснения их топографической локализации в тимусе.

Материалы и методы. Исследование проведено на 28 крысах линии Вистар. У животных забирали клеточную взвесь интраперитонеального смыва и инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в течение суток в пластиковых чашках Петри. Концентрировали содержание макрофагов посредством многократного отбора надосадка с неприкреплёнными клетками. В культуральную среду опытной группы добавляли липополисахарид (ЛПС) *E. coli* (0,1 мкг/мл) и раствор прижизненного красителя 5-карбофлуоресцеин диацетата (0,5 мкг/мл); к контрольной группе добавляли только краситель. Через 24 часа инкубации, прикрепленные к пластику макрофаги, отделяли 0,02% раствором Версена и вводили интраперитонеально животному-хозяину. Через 24 часа после введения клеток, проводили декапитацию и тимэктомию животных. Отобранные тимусы делили на две части: из одной получали клеточную взвесь для анализа на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, USA), вторую подвергали иммуногистохимическому анализу на криостатных крезах. Для выявления тимоцитов в стадии апоптоза окрашивали их антителами к аннексину. Подсчет мигрировавших в тимус клеток проводили в программе Image-Pro Insight 6.0.

Результаты. Адаптивный перенос крысам аутологичных макрофагов, предварительно активированных бактериальным липополисахаридом *in vitro*, усиливал миграцию этих клеток с периферии в тимус на 74,8±12,2% ($P < 0,01$) относительно животных, которым вводили аутологичные макрофаги без активации эндотоксином. Гистологическое исследование показало, что меченые макрофаги, мигрировавшие в тимус, локализовались преимущественно в кортико-медулярной и субкапсулярной зонах, хотя часть клеток обнаруживалась и в корковой области. Иммуногистохимическое исследование продемонстрировало, что во всех этих зонах достоверно увеличивалось количество тимоцитов в состоянии раннего апоптоза ($P < 0,01$). Проточная цитофлуориметрия лейкоцитарной взвеси, полученной из тимусов животных контрольной и экспериментальной групп, также продемонстрировала достоверное увеличение количества тимоцитов на стадии раннего апоптоза после трансфера животным аутологичных ЛПС-стимулированных макрофагов на 84,4±21,3% ($P < 0,001$).

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что неспецифическая стимуляция макрофагов бактериальным липополисахаридом усиливает их миграцию в те области тимуса, где идут процессы антигеннезависимой дифференцировки Т-клеток. Усиленная миграция активированных макрофагов сопровождается интенсификацией апоптоза тимоцитов в этих областях тимуса. Описанные факты расширяют наши представления о механизмах акцидентальной атрофии тимуса, добавляя к основным исполнителям макрофагов, мигрирующих в тимус с периферии после их активации бактериальным эндотоксином.

ОРГАНИЗАЦИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ, РАСПОЗНАВАЕМЫХ РЕГУЛЯТОРНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ ФАКТОРОМ НА Fc-ФРАГМЕНТАХ IgG ЧЕЛОВЕКА

Сидоров А.Ю., Бедулева Л.В., Меньшиков И.В., Терентьев А.С., Ирина М.П.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Введение. В недавно проведенных нами исследованиях было показано, что устойчивость к развитию экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний, а также их ремиссия ассоциированы с продукцией популяции ревматоидного фактора, выявляемого методом агглютинации танизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов (Beduleva, 2015). Полученные факты обозначают данную популяцию ревматоидного фактора как фактор регуляции аутореактивности и потенциальную биомишень, усиливая продукцию которой, можно подавлять аутоиммунные реакции. Чтобы отличать популяцию ревматоидного фактора ассоциированного с устойчивостью к развитию экспериментальных аутоиммунных заболеваний от известных ранее популяций, продукция которых предсказывает и усиливает аутоиммунные заболевания, мы назвали ее регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) (Sidorov, 2017). Мы также показали, что антигенные детерминанты для регРФ можно индуцировать на Fc фрагментах гомологичного IgG. Иммунизация крыс такими фрагментами вызывает повышение уровня регРФ и редукцию симптомов коллаген-индуцированного артрита (Sidorov, 2017). Было выяснено, что данные антигенные детерминанты формируются в шарнирной области Fc-фрагментов IgG, были найдены условия их индукции. Однако организация антигенных детерминант распознаваемых регРФ не ясна.

Цель и задачи. Целью исследования было выяснить организацию антигенных детерминант для регуляторного ревматоидного фактора на Fc-фрагментах IgG человека.

Материалы и методы. Fc-фрагменты IgG человека получали методом папаинового протеолиза. Выделение и очистку Fc фрагментов проводили методами эксклюзионной хроматографии на колонке Sephacryl S 100 26/400, аффинной хроматографии на protein A- и protein G-сефарозе. О наличии антигенных детерминант на Fc-фрагментах IgG для регуляторного РФ судили по способности последних вызывать дозозависимое торможение агглютинации нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, вызванной регуляторным РФ. Количество свободных сульфгидрильных групп на Fc-фрагментах IgG человека определяли методом Эллмана. Алкилирование сульфгидрильных групп проводили избытком йодацетамида с последующей очисткой от примеси йодацетамида методом эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 200 10/300.

Результаты. Были исследованы Fc-фрагменты IgG человека несущие и не имеющие антигенных детерминант узнаваемых регРФ человека. Обнаружено, что коэффициент поглощения Fc-фрагментов IgG, несущих антигенные детерминанты для регРФ, при 280 нм в 2 раза выше, чем Fc-фрагментов IgG, не имеющих таких детерминант. Данный факт указывает на то, что формирование антигенных детерминант для регРФ сопровождается изменением конформации Fc-фрагментов IgG. Все дисульфидные связи в шарнире Fc-фрагментов IgG человека,

несущих антигенные детерминанты для регРФ, восстановлены, обнаруживается 4 свободные сульфгидрильные группы/молекулу. Fc-фрагменты IgG человека, не имеющие детерминант для регРФ, содержат шарнир, однако тиольные группы в нем образуют дисульфидные связи. Алкилирование свободных сульфгидрильных групп Fc-фрагментов IgG ведет к потере свойства Fc-фрагментов IgG подавлять агглютинацию нагруженных IgG эритроцитов, вызванную регРФ. Данный факт не исключает, что SH группы шарнирной области непосредственно входят в состав антигенных детерминант, узнаваемых регРФ.

Заключение. Таким образом, формирование антигенных детерминант для регуляторного ревматоидного фактора на Fc-фрагментах IgG человека происходит в результате восстановления межцепочечных дисульфидных связей шарнира, сопровождающегося изменением конформации Fc-фрагментов IgG.

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ РАСТВОРИМОГО ЭНДОГЛИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЕГО КОМПЛЕКСОВ

Смирнов И.В., Грязева И.В., Самойлович М.П., Шашкова О.А., Крутецкая И.Ю., Столбовая А.Ю., Крылова А.А.[1], Берлина М.А., Пиневич А.А., Вартанян Н.Л., Климович В.Б.

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

Введение. Эндоглин (CD105) представляет собой гомодимерный мембранный антиген клеток сосудистого эндотелия с молекулярным весом 90 кДа. Он является компонентом рецепторных комплексов TGF-β, BMP и активина. Растворимая форма антигена образуется в результате протеолитического расщепления экстраклеточной части рецептора посредством MMP-14 и имеет молекулярный вес 80 кДа. Избыточное образование этого антигена может вызывать системную дисфункцию сосудистого эндотелия. Определение содержания этого эндоглина в плазме крови используют для оценки вероятности развития преэклампсии у беременных женщин и прогнозирования течения ряда онкологических заболеваний.

При создании двухцентровых иммуноферментных систем, направленных на выявление растворимого эндоглина, было обнаружено, что разные пары моноклональных антител выявляют различное (до двух порядков) содержание этого антигена в одних и тех же образцах плазмы крови человека. Эти результаты могут быть объяснены отсутствием или маскированием другими белками части эпитопов растворимого эндоглина.

Цель. Исследование аффинно выделенных из плазмы крови молекул растворимого эндоглина и копрецепитирующих с ними белков.

Материалы и методы. Молекулы растворимого эндоглина и копрецепитирующие с ними белки были выделены из пулового образца плазмы крови здоровых доноров посредством иммуноаффинной хроматографии. Их анализ вели с помощью методов электрофореза, иммуноблота и двухцентрового ИФА. Также был применен подход последовательного сепарирования молекулярных комплексов на мембранах с уменьшающимися диаметрами пор. Моноклональные антитела к эндоглину человека, использованные в исследовании, были получены и охарактеризованы в лаборатории гибридомной технологии (Смирнов И.В., 2015).

Результаты. С помощью элеткрофореза в нативных условиях и иммуноблота показано, что молекулы растворимого эндоглина входят в состав надмолекулярных белковых комплексов с молекулярным весом более 200 кДа. Их размеры позволяют проходить через сепарирующие мембраны, имеющие пороги отсечения 1000 и 300 кДа. Комплексы эндоглина задерживаются мембраной с порогом отсечения 100 кДа.

Использование буферов с детергентными и хаотропными агентами при подготовке проб для электрофоретического разделения приводит к частичной дезинтеграции молекулярных комплексов эндоглина и появлению фракции свободных димерных и мономерных молекул антигена (160 и 80 кДа). Тем не менее, существенная часть молекул эндоглина остается связанной с другими белками. Добавление восстанавливающего реагента приводит к полной диссоциации комплексов растворимого эндоглина и формированию трех фракций антигена (80 кДа, 70 кДа и 60 кДа).

Заключение. С помощью иммунохимических методов продемонстрирована молекулярная гетерогенность растворимого эндоглина плазмы крови и вхождение этого антигена в состав молекулярных комплексов.

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОГЛИКАН-РАСПОЗНАЮЩЕГО БЕЛКА TAG-7/PGLYRP-1 НА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ВЫЖИВАНИЕ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Слонова Д.А.[1, 2], Посвятенко А.В.[2, 3], Сысолятина Е.В.[4], Еромолаева С.А.[4], Кибардин А.В.[2, 3], Лысюк Е.Ю.[2, 3], Гапонов А.М.[2], Гнучев Н.В.[3], Георгиев Г.П.[3], Ларин С.С.[1, 2, 3]

[1] Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия
[2] ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[3] ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, Москва, Россия
[4] ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

В настоящее время в медицине описано несколько заболеваний, вызываемых внутриклеточными патогенами (туберкулез, менингококковая инфекция, бруцеллез и другие). Одним из таких заболеваний является листериоз. Его возбудитель *Listeria monocytogenes* – широко распространенная грамположительная бактерия, обладающая способностью к внутриклеточному паразитизму. Лечение листериоза чаще всего проводится антибиотиками, однако в последнее время стали применять и комплексную терапию, направленную на усиление внутренней защиты организма. Одним из компонентов системы врожденного иммунитет является пептидогликан распознающий белок Tag-7/PGLYRP-1.

Цель. Исследовать влияние белка Tag-7/PGLYRP-1 на свойства бактерий и их взаимодействие с компонентами врожденного иммунитета.

Материалы и методы. В работе использовали человеческий пептидогликан-распознающий рекомбинантный белок Tag-7/PGLYRP-1, полученный с помощью эукариотической экспрессионной системы. Для оценки эф-

фективности антибиотиков использовались диски антибиотиков (Oxoid Ltd., England). Исследование фагоцитоза меченых Cy3 (GE Healthcare, Sweden) *L. monocytogenes* (EGD *серовар* 1/2a) проводилось на проточном цитометре (Cytomics FC 500 MPL, Beckman Coulter, Inc.). Анализировалось не менее 10000 событий. Эукариотические клетки культивировались в питательной среде в CO_2 инкубаторе при 37 °C. Количество IL-6 определялось с помощью ИФА (R&D Systems).

Результаты. Полученный рекомбинантный человеческий белок Tag-7/PGLYRP-1 связывается с клеточными стенками бактерий, но не демонстрирует бактерицидной и бактериостатической активности при использованных концентрациях. Однако с помощью диско-диффузионного метода было выявлено, что в некоторых случаях присутствие Tag7/PGLYRP-1 может усиливать чувствительность бактерий к наличию антибактериальных препаратов.

С использованием макрофагоподобной клеточной линии ANA-1 продемонстрировано, что присутствие Tag-7/PGLYRP-1 стимулирует фагоцитоз внутриклеточных патогенных бактерий *L. monocytogenes*. С помощью инфекционной *in vitro* модели показано, что присутствие Tag-7/PGLYRP-1 ингибирует внутриклеточное выживание *L. monocytogenes*, предохраняя эукариотические клетки от заражения.

Белок Tag-7/PGLYRP-1 способствует выработке клетками ANA-1 активных форм кислорода, а так же провоспалительного цитокина IL-6.

Заключение. Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что пептидогликан-распознающий белок Tag-7/PGLYRP-1 активирует защитные механизмы врожденного иммунитета, препятствует заражению эукариотических клеток *L. monocytogenes*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-07649.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-9069.2016.4.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРА, ИНГИБИРУЮЩЕГО МИГРАЦИЮ МАКРОФАГОВ, И ЕГО РЕЦЕПТОРА CD74 УСИЛИВАЕТСЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ С ЛАБИЛЬНО СВЯЗАННОЙ МЕДЬЮ

Соколов А.В., Костевич В.А., Горбунов Н.П., Грудинина Н.А., Васильев В.Б.

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

Введение. Ранее нами было установлено, что медьсодержащий белок острой фазы воспаления церулоплазмин (ЦП), благодаря наличию лабильно связанных ионов меди, образует белок-белковый комплекс с фактором, ингибирующим миграцию макрофагов (МИФ) – ключевым цитокином воспаления. Введение насыщенного медью ЦП усиливало провоспалительную активность МИФ при моделировании септического шока у мышей *in vivo*, приводя к 100% смертности мышей, а аффинные антитела против МИФ препятствовали этому. Поскольку для активации провоспалительной активности МИФ необходимо его взаимодействие с инвариантной цепью главного комплекса гистосовместимости (CD74), были основания высказать гипотезу, что ЦП с лабильно связанной медью может влиять на взаимодействие МИФ и CD74. **Целью** работы явилось исследование взаимодействия МИФ, ЦП и CD74. В задачи входило получение высокоочищенных белков и характеристика их взаимодействия.

Материалы и методы. Взаимодействие ЦП, МИФ и sCD74 изучали с помощью аффинной хроматографии, гель-фильтрации, электрофореза в полиакриламидном геле без детергентов и метода поверхностного плазмонного резонанса. Был клонирован внеклеточный домен рецептора CD74 (sCD74), получена плазмида, кодирующая N-концевую полигистидиновую последовательностью, сайт для гидролиза тромбином перед аминокислотной последовательностью sCD74. Отработан протокол, позволивший выделить высокоочищенный sCD74 из телец включения *E. coli* с помощью металл-хелатной хроматографии, гидролиза тромбином и аффинной хроматографии на МИФ-агарозе.

Результаты. Соответствие аминокислотной последовательности электрофоретически гомогенного sCD74 было доказано с помощью масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза (найдено 90% предсказанной последовательности). С помощью оптических сенсоров с иммобилизованным МИФ (BiaCore X-100) мы показали, что на взаимодействие МИФ и sCD74 практически не влияли ионы меди: константы диссоциации 19,1(+/-1,2) и 17,7(+/-0,9) нМ. ЦП лишенный ионов лабильной меди не влиял на взаимодействие МИФ и sCD74, напротив, присутствие ионов лабильной меди в ЦП увеличило сродство МИФ и sCD74 в 1,5 раза: константа диссоциации 12,2(+/-0,7) нМ. Аналогичные результаты были получены с помощью метода аффинной хроматографии: ЦП с лабильно связанными ионами меди способствовал взаимодействию sCD74 с иммобилизованным на агарозе МИФ. При гель-фильтрации ЦП, МИФ и sCD74 элюировались совместно в буфере, содержащем 5 мкМ сульфата меди.

Заключение. Таким образом, мы показали, что ЦП может усиливать взаимодействие МИФ с внеклеточным доменом CD74.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-01182.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОРАКОВЫХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСА ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА С ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Соколов А.В., Власенко А.Ю., Костевич В.А., Старикова Э.А., Киселева Е.П., Васильев В.Б.

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

Введение. Белок грудного молока и секреторных гранул нейтрофилов, лактоферрин (ЛФ), обладает противораковой активностью, однако механизм его действия изучен не до конца. Недавно было показано, что ЛФ молока коров подобно альфа-лактальбумину образует комплекс с олеиновой кислотой, вызывающий апоптоз раковых клеток в культуре. **Целью** работы явилось исследование взаимодействия ЛФ человека с олеиновой кислотой и его противораковых свойств *in vitro* и *in vivo*. В задачи входило исследование липолитического эффекта ЛФ, изучение взаимодействия ЛФ и олеиновой кислоты, влияния комплекса на апоптоз культивируемых клеток, а также наблюдение за ростом гепатомы 22А после подкожной инокуляции мышам.

Материалы и методы. Липолиз после введения ЛФ мышам оценивали по концентрации неэстерифицированных жирных кислот в сыворотке крови. Взаимодействие ЛФ и олеиновой кислоты оценивали по связыванию кислоты с белком после диализа их смеси. Апоптоз клеток линий HL-60, THP-1, Jurkat оценивали с помощью проточной цитометрии. Гепатому 22А (20 000 клеток) инокулировали мышам линии С3НА и ежедневно оценивали рост опухолей у контрольной группы животных и животных, получавших ежедневно внутрибрюшинного по 4 мг комплекса ЛФ-олеиновая кислота.

Результаты. В течение 1-5 часов после внутрибрюшинной инъекции мышам ЛФ человека (100 мг/кг) мы обнаружили увеличение концентрации неэстерифицированных жирных кислот в 1,8-3,8 раза. При добавлении раствора олеиновой кислоты в этаноле к ЛФ мы не наблюдали образования мицелл, характерного для смешивания олеиновой кислоты с водой и физиологическим раствором. Титрование ЛФ олеиновой кислотой показало, что один моль ЛФ может связать до 8 моль олеиновой кислоты. Комплекс ЛФ с олеиновой кислотой индуцировал апоптоз раковых клеток (HL-60, THP-1, Jurkat). При изучении динамики роста опухолей после инокуляции гепатомы 22А у мышей линии С3НА в течение двух недель у пяти из девяти мышей, получавших комплекс ЛФ-олеиновая кислота, не наблюдалось заметного роста опухолей, в отличие от контрольной группы животных с практически равномерным и выраженным ростом опухолей. Однако на третью неделю наблюдений рост опухолей был заметен в обеих группах: средний диаметр опухолей в группе мышей, получавших комплекс лактоферрин-олеиновая кислота, составил 7(+/-4) мм, а у контрольных мышей средний диаметр опухолей составил 17(+/-)5 мм.

Заключение. Таким образом, мы показали, что комплекс ЛФ с олеиновой кислотой обладает противораковым эффектом *in vitro* и *in vivo*. В дальнейшем планируется оптимизировать дозу комплекса и схему его введения при исследовании противоракового эффекта *in vivo*. Исследование поддержано грантом Президента РФ МК-5074.2016.4.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА КЛЮЧЕВЫЕ ЭФФЕКТОРЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Солдатенкова А.В., Калошин А.А., Борисова О.В., Калиниченко Е.О., Ахматова Н.К., Михайлова Н.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Патологии, ассоциированные с *P. aeruginosa,* являются серьезной проблемой для иммунокомпрометированных пациентов. В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова проводятся исследования по разработке вакцинного препарата против *P. aeruginosa* на основе рекомбинантных белков патогена.

Цель и задачи. Исследование влияния комплекса рекомбинантных антигенов *Pseudomonas aeruginosa* на систему адаптивного и врожденного иммунитета. Изучение протективного эффекта, синтеза специфических антител, уровня цитокинов и субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенок мышей.

Объектом настоящего исследования явился комплекс рекомбинантных белков *P. aeruginosa* (белка F наружной мембраны и рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А [анатоксин]).

Ранее подобраны оптимальные дозы рекомбинантных белков OprF и анатоксина для индукции защитного эффекта, которые составили 25 мкг и 50 мкг на мышь (при двукратном введении) соответственно. В настоящей работе исследовали иммунный ответ на введение с двухнедельным интервалом комплекса рекомбинантных белков, сорбированных на гидроксиде алюминия в тех же дозах.

Протективный эффект оценивали по выживаемости мышей линии Balb/C после заражения живой вирулентной культурой *P. aeruginosa*, расчитывая $ЛД_{50}$ и индекс эффективности. В результате проведенных экспериментов показано, что комплекс белков защищал животных с индексом эффективности 2,5.

Уровень синтеза специфических антител исследовали в ИФА с сорбированными на планшете рекомбинантными белками. Выявлено существенное увеличение концентрации специфических IgG-антител в ответ на иммунизацию исследуемым комплексом по сравнению с интактными животными.

Уровень цитокинов определяли на проточном цитометре FC-500 (Beckman Culter, США) при помощи тест-системы FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex. Через 4 ч, 8 ч, 24 ч и 14 дней после первой иммунизации осуществляли тотальный забор крови у групп мышей. Максимальные значения Th1-цитокинов наблюдали: к 24 ч для TNFα (увеличение в 8,5 раз), к 8 часам для IL-1β (в 13,4 раза), к 4 часам для IL-1α (в 5,1 раз), к 8 ч для IL-2 (увеличение в 2,7 раз), к 24 часам для IFNγ и IL-12p70 (в 10,9 и 5,3 раз соответственно). Максимальные значения Th2-цитокинов в сыворотках наблюдали через 8 часов для IL-4 (увеличение в 1,4 раза), к 4 часам для IL-5 (в 2,9 раз) и к 24 часам в случае IL-6, IL-10, IL-13 (увеличение в 5,4; 3,7 и 1,5 раза соответственно). Динамика Th17-/Th21-/Th22-цитокинов в сыворотках мышей под воздействием комплекса рекомбинантных белков была следующей: IL-17A максимально повышался через 8 часов (в 248,4 раза), IL-21 – через 8 ч (увеличение с 0 до 17,33 пкг/мл), IL-22 – через 8 часов (в 3,2 раза).

Для изучения субпопуляционной структуры лимфоцитов через две недели после курса иммунизаций у животных извлекали селезенки, выделяли спленоциты и окрашивали моноклональными антителами, меченными флюорохромом, к поверхностным клеточным маркерам (Caltag Laboratories, США). Исследование показало, что в опытной группе (иммунизированные мыши) повышалось содержание NK-клеток ($CD16^+/CD32^+$, в 1,64 раз), Т-хелперов ($CD4^+$, в 1,25 раз), В1-лимфоцитов ($CD5^+$, в 1,13 раз), В2-лимфоцитов ($CD19^+$, в 2,3 раз) при снижении численности цитотоксических лимфоцитов ($CD8^+$, в 1,47 раз) по сравнению с контролем (неиммунизированные мыши). В общей популяции клеток повышалось содержание типов, экспрессирующих маркеры ранней ($CD25^+$) и поздней ($MHCII^+$) активации клеток.

Таким образом в результате проведённых исследований установлена активация клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы в ответ на введение исследуемого комплекса рекомбинантных белков, что открывает перспективы для создания вакцины на его основе.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2016 год.

РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА АРГИНИНА В РЕГУЛЯЦИИ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА

Старикова Э.А.

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

Аргинин – условно заменимая протеиногенная аминокислота, которая играет важную роль в эмбриогенезе, раннем развитии и регуляции функций клеток иммунной системы (Carroll B. et al., 2016; Bronte V. et al., 2005). Большинство клеток млекопитающих, включая гранулоциты, эритроциты, гепатоциты, миелоидные супрессорные клетки, тучные клетки, эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки в разной степени экспрессируют ферменты, метаболизирующие аргинин-аргиназу и NO-синтазу. Аргинин является единственным физиологически значимым субстратом для синтеза NO – важного внутри- и межклеточного медиатора, который обеспечивает цитотоксичность клеток врожденного иммунитета, направленную на борьбу с патогенными микроорганизмами (Bogdan C., 2015). С дефицитом аргинина и его метаболитов связывают механизм действия миелоидных супрессорных клеток, которые вызывают длительное подавление пролиферации Т-лимфоцитов и снижение экспрессии CD3ζ (Bronte V. et al., 2005). Дефицит аргинина приводит к инволюции тимуса и снижению количества Т-лимфоцитов у мышей после массивного хирургического вмешательства (Morris S.M.Jr. et al., 2012). В отсутствие аргинина полностью блокируются экзоцитоз гранул и цитотоксичность NK-клеток, значительно подавляются их пролиферация и секреция цитокинов (Oberlies J. et al., 2009). Снижение доступности аргинина в микроокружении клеток костного мозга приводит к изменению экспрессии генов, регулирующих дифференцировку В-лимфоцитов на стадии про-В/пре-В клеток (Le Bien T.W. et al., 2002). Несмотря на многочисленные данные, свидетельствующие о важной роли этой аминокислоты в регуляции функций клеток иммунной системы, молекулярные механизмы, последствий деплеции аргинина остаются мало изученными. В последнее время в литературе появились данные о том, что аргинин является одним из ключевых активаторов сигнального пути mTOR (mechanistic target of rapamycin). В нативном состоянии, независимо от своих метаболических путей аргинин способствует максимальной активации серин-треонин протеинкиназы mTORC1 – центрального комплекса сигнального пути mTOR (Carroll B. et al., 2016).

Сигнальный путь mTOR интегрирует сигналы доступности питательных веществ, сигналы от ростовых факторов, цитокинов, иммунорецепторов и как следствие, направляет дифференцировку и реализацию эффекторных функций клеток лимфоидного и миелоидного ряда (Keating R. et al., 2016; O'Neill L. A.J. et al., 2016; Weichhart T. et al., 2015). Благодаря mTOR-опосредованной модуляции процессов автофагии, биогенеза лизосом и экспрессии MHCII осуществляется регуляция презентации антигенов клетками системы врожденного иммунитета. Контроль процесса синтеза белков со стороны mTOR является одним из важнейших механизмов регулирующих продукцию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (Nyamdelger S. et al., 2016). mTOR выступает как важнейший регулятор баланса дифференцировки между регуляторными и эффекторными субпопуляциями Т-лимфоцитов. Активация PI3K/mTOR сигнального пути способствует дифференцировке эффекторных популяций Т-лимфоцитов. Напротив, специфическая ингибиция mTOR коррелирует со снижением генерации Th1-, Th2- и Th17-клеток и усилением генерации Treg (Coquillard C. et al., 2015).

В ходе развития бактериальной инфекции аргинин становится субстратом для бактериальных ферментов аргиназы и/или аргининдеиминазы, кроме того некоторые бактерии могут катаболизировать аргинин опосредованно, индуцируя экспрессию аргиназы организма-хозяина (Das P. et al., 2010). Такая стратегия патогенов может приводить к нарушению дифференцировки и функциональной активности клеток иммунной системы, дизрегуляции процесса воспаления и иммунного ответа. Эта проблема заслуживает большего внимания иммунологов.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА, СДЕРЖИВАЮЩЕГО РАЗВИТИЕ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Столярова Е.Ю.[1], Бедулева Л.В.[1], Снигирев А.Я.[2], Литвинюк А.А.[1], Падерина Л.А.[1]

[1] ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия
[2] БУЗ УР «Удмуртский Республиканский Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями», Ижевск, Россия

Введение. Недавно нами был выявлен ревматоидный фактор, получивший название регуляторный (регРФ),

ТАБЛИЦА. КОЛИЧЕСТВО $CD4^+$, $CD4^+CD95^+$ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ОБМ (К ТЕЗИСАМ СТОЛЯРОВОЙ Е.Ю. И ДР.)

		Кровь	Лимфоузлы	Титр регРФ в крови
$CD4^+$,%	РегРФ+крысы	22±5,8	55±4,0*	32±17,5
	РегРФ-крысы	20±4,4	63±5,6	0±0,0
	Интактные крысы	32±10,3	76±9,9	0,8±1,8
$CD4^+CD95^+$,%	РегРФ+крысы	28±8,6	17±1,4	32±17,5
	РегРФ-крысы	32±7,4	14±2,6	0±0,0
	Интактные крысы	35±11,0	17±2,0	0,8±1,8

Примечание. * – статистически значимое различие между РегРФ+ крысами и РегРФ- крысами, $p < 0,05$, критерий Манна–Уитни.

продукция которого обеспечивает устойчивость к развитию экспериментальных аутоиммунных заболеваний, а также ассоциирована с ремиссией последних и завершением нормального иммунного ответа (Beduleva, 2015; Sidorov, 2017). Однако механизм действия регуляторного ревматоидного фактора остается не ясен. Мы предполагаем, что регРФ предотвращает развитие экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний и вызывает их ремиссию посредством сдерживания экспансии Т-хелперов специфичных к антигенам-индукторам аутоиммунных заболеваний и аутореактивных Т-хелперов, активирующихся в ответ на иммунизацию.

Цель и задачи. Проверить гипотезу о том, что регРФ сдерживает экспансию активированных Т-хелперов, специфичных к антигенам-индукторам аутоиммунных заболеваний, вызывая их гибель по механизму апоптоза.

Материалы и методы. Крыс Wistar иммунизировали основным белком миелина морской свинки (ОБМ) (Sigma). На 7 день после иммунизации забирали регионарные лимфатические узлы (л/у) и кровь. Измеряли цитофлуориметрически количество $CD4^+$ и $CD4^+CD95^+$ лимфоцитов в периферической крови и л/у. В крови измеряли регРФ методом агглютинации танизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов. Клетки л/у иммунизированных крыс культивировали в течение 5 дней в присутствии ОБМ, затем клетки обрабатывали регРФ-содержащей сывороткой и определяли количество погибших клеток в том числе несущих маркеры апоптоза с помощью Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC.

Результаты. Было показано, что у иммунизированных ОБМ крыс с относительно высоким уровнем регРФ в крови (регРФ$^+$ крысы)относительное количество $CD4^+$ лимфоцитов в л/у достоверно ниже ($p < 0,05$, критерий Манна–Уитни), чем у иммунизированных ОБМ крыс с низким уровнем регРФ (регРФ$^-$ крысы) (табл.). В крови исследуемых групп крыс уровень $CD4^+$ лимфоцитов не отличается. Мы предполагали, что мишенью регРФ являются активированные $CD4^+$ лимфоциты, несущие маркер CD95, опосредующий апоптоз, через взаимодействие с которым регРФ реализует свое цитотоксическое действие, и ожидали обнаружить у крыс с относительно высоким уровнем регРФ достоверное снижение количества $CD4^+CD95^+$ лимфоцитов по сравнению с крысами с относительно низким уровнем регРФ. Однако количество $CD4^+CD95^+$ лимфоцитов в л/у и крови у крыс с относительно высоким и относительно низким уровнем регРФ не отличается. Полученные факты свидетельствуют о том, что регРФ сдерживает экспансию активированных $CD4^+$ лимфоцитов, но CD95 молекула не является мишенью для регРФ.

Обработка лимфоцитов л/у, культивированных 5 дней в присутствии ОБМ, сывороткой содержащей регРФ, полученной от крыс иммунизированных ОБМ, вызвала гибель лимфоцитов, но доля клеток, связывающих аннексин V, была незначительной. Сыворотка, содержащая регРФ, не вызывала гибель не активированных лимфоцитов.

Заключение.Таким образом, регуляторный ревматоидный фактор вызывает некроз активированных $CD4^+$ лимфоцитов. CD95 не является мишенью для регуляторного ревматоидного фактора.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-01154 мол_а.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИЙ И КЛОНОВ NK-КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ СТИМУЛЯЦИИ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ 2 И ГЕНЕТИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ФИДЕРНЫМИ КЛЕТКАМИ К562, ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЙ ИНТЕРЛЕЙКИН 21

Стрельцова М.А., Ерохина С.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И.

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Стимуляция NK-клеток фидерными клетками К562, экспрессирующими на своей поверхности IL-21 (К562-mbIL21) в сочетании с IL-2 индуцирует интенсивную пролиферацию натуральных киллеров, что может быть использовано для накопления NK-клеток в иммунотерапевтических целях. Однако величина экспансии NK-клеток, полученных от разных индивидов, значительно варьирует. Одна из причин таких вариаций может быть связана с тем, что данная комбинация стимулов по-разному действует на клетки различной степени дифференцировки и активации. Чтобы ответить на этот вопрос, в настоящей работе указанный метод стимуляции был применен к индивидуальным NK-клеткам, предварительно охарактеристизованным по уровню экспрессии молекул CD56, CD57 и HLA-DR, с целью получения клонов NK-клеток из субпопуляций, различающихся по степени дифференцировки и активации. С помощью цитометрического анализа были дискриминированы субпопуляции наименее дифференцированных NK-клеток $CD56^{bright}$, промежуточных $CD56^{dim}CD57^-$ и наиболее дифференцированных $CD56^{dim}CD57^{bright}$. В кластерах $CD56^{bright}$ и $CD56^{dim}CD57^-$ были дополнительно выделены субпопуляции клеток с фенотипом $HLA\text{-}DR^-$ и $HLA\text{-}DR^+$. Единичные NK-клетки из пяти указанных субпопуляций были отсортированы в лунки 96-луночного планшета, содержащего IL-2 и облученные клетки К562-mbIL-21. Частота образования клонов NK-клеток, которую определяли через 3 недели культивирования, оказалась выше в субпопуляциях $CD56^{bright}$, по сравнению с субпопуляциями $CD56^{dim}$, а наименьшая частота оказалась в субпопуляции NK-клеток, высоко экспрессирующих маркер терминальной дифференцировки CD57. Существеной связи экспрессии маркера «поздней» активации HLA-DR с эффективностью генерации клонов из данной субпопуляции не было выявлено. Фенотипический анализ полученных клонов показал, что, как правило, описанная стимуляция приводит к экспансии менее зрелых клеток, экспрессирующих рецептор NKG2A с низким уровнем экспрессии CD57. Часть клеток клонов из субпопуляции $CD57^+$ при культивировании утрачивало экспрессию этого маркера. Доля клонов, экспрессирующих ингибирующие рецепторы KIR2DL2/DL3, оказалась наиболее низкой в субпопуляции $HLA\text{-}DR^+$, при этом экспрессия этих рецепторов значительно не менялась при культивировании клонов.

Таким образом, на клональном уровне охарактеризованы NK-клеточные культуры, полученные путем стимуляции с помощью IL-2 и К562-mbIL-21 NK-клеток с разным уровнем зрелости и активации. Показано, что в ответ на такую стимуляцию лучше пролиферируют менее дифференцированные клетки, а хуже – более дифференцированные. Полученные результаты могут помочь

в селекции NK-клеток, наиболее подходящих для потенциальной адоптивной иммунотерапии.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 16-15-00309).

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНОЙ ТЕРАПИИ НА АКТИВНОСТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ЛЕГКИХ (НА МОДЕЛИ ХОБЛ У КРЫС)

Суркова Е.А., Лебедева Е.С., Кузубова Н.А.

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Согласно современным представлениям, эпителиоциты бронхов являются ключевыми эффекторными клетками в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), инициируя иммунную и воспалительную реакции, гиперсекрецию слизи и продукцию активных форм кислорода. Стимулирование эндогенных регенеративных возможностей для восстановления поврежденного эпителия при ХОБЛ может обеспечить длительный терапевтический эффект по сравнению с использованием традиционных кортикостероидов.

Цель. Оценить противовоспалительный и регенеративный эффект низкомолекулярной пептидной терапии на модели ХОБЛ у крыс.

Материалы и методы. Модель формирования ХОБЛ выполнена на крысах-самцах линии Вистар с помощью ингаляционного воздействия диоксида азота. Пептидную терапию проводили в течение месяца, используя препарат Бронхоген (ООО ХБО при РАН «Фирма Вита») – синтезированный тетрапетид, соответствующий полипептиду из слизистой бронхов животных. В пробах бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) определяли содержание TNFα, IL-8, нейтрофильной эластазы, матриксной металлопротеиназы-12 (MMP-12), химазы тучных клеток, секреторного иммуноглобулина А (sIgA), сурфактантного протеина В (SP-B) методом ELISA.

Результаты. В БАЛЖ животных, не получавших пептидную терапию (контрольная группа), содержание нейтрофилов в 5 раз превышало интактное значение (25,9±4,1 и 5,2±0,5% соответственно, $p < 0,05$), а число лимфоцитов было в 2 раза больше, чем у интактных крыс (18,5±2,4 и 9,1±1,9% соответственно, $p < 0,05$). В лаважной жидкости контрольных крыс определялись повышенные концентрации провоспалительных цитокинов (TNFα и IL-8) нейтрофильной эластазы, MMP-12 и химазы тучных клеток, действие которой значительно усиливает деструктивный эффект на легочные структуры. Под влиянием применения Бронхогена происходило восстановление цитологического профиля БАЛ, который незначительно отличался от интактной группы: процентное содержание нейтрофилов снижалось по сравнению с контролем и составляло 9,0±1,2% ($p < 0,05$), возрастала доля макрофагов (76,5±2,02%, $p < 0.05$). Концентрации TNFα, IL-8, а также нейтрофильной эластазы и MMP-12 практически не отличались от показателей интактной группы, а уровень химазы тучных клеток оказался в 2 раза ниже интактного. Нормализовалось содержание SP-B, что могло быть отражением восстановления секреторной функции альвеолоцитов 2-го типа. Значительно возрастала интенсивность синтеза sIgA, превышая аналогичный показатель и в контрольной, и в интактной группе.

Заключение. Под влиянием пептидной терапии наблюдалось снижение активности нейтрофильного воспаления, которое сопровождалось восстановлением функциональной активности бронхиального эпителия, предупреждением аномального ремоделирования легочной ткани и связанных с ним тяжелых осложнений ХОБЛ.

АЛЬВЕОЛЯРНЫЕ МАКРОФАГИ И СУРФАКТАНТ ЛЕГКИХ ПРИ ДИСБАЛАНСЕ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОТРАНСМИССИИ

Тимофеева М.Р., Лукина С.А.

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия

Введение. Дисфункция дофаминергической системы является основой патогенеза нейродегенеративных и нервно-психических заболеваний, висцеропатий, сопровождающихся изменениями иммунного статуса организма (Крыжановский Г.Н. и соавт., 2010) и метаболических функций легких (Тимофеева М.Р. и соавт., 2015). Установлено, что альвеолярные макрофаги участвуют в реализации механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, в катаболизме сурфактанта легких (Черешнев В.А. и соавт., 2002). Вместе с тем, фосфолипиды сурфактанта стимулируют фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов (Грачева Л., 1996; Ипатова О.М., 2005), а сурфактант-ассоциированные протеины модулируют их участие в иммунном ответе и секреции провоспалительных цитокинов (Sano H. et al., 2005).

Цель. Изучение фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов и фосфолипидов сурфактанта при дисбалансе дофаминергической нейротрансмиссии, моделируемой введением допамина в боковой желудочек мозга и активацией стриатума без и при введении амантадина.

Материалы и методы. Опыты выполнены на наркотизированных крысах-самцах в соответствии с этическим кодексом (n = 77), в том числе ложнооперированных, с церебровентрикулярным введением допамина (в дозе 1,6 мкМ, через день, три недели) посредством канюль: P = 0,8; L = 1,5; V = 3,6, с имплантацией нанокобальта в стриатум: A = 1,7; L = 2,5; V = 5,5 и в сочетании с введением амантадина (ПК-Мерц, Германия; 1 мг/кг, через день, 2 недели, в/брюшинно). После окончания экспериментов определяли содержание фосфолипидов (Комаров Ф.И. и соавт., 1981) в бронхоальвеолярных смывах (БАС) и их поверхностную активность (метод Вильгельми), клеточный состав смывов и фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов (АМ) по поглощению частиц монодисперсного латекса (∅1,5 мкм) с расчетом фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа. Фракционирование фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии. Статистический анализ выполнен в программе SPSS 17 с использованием критерия Шапиро–Уилка и U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. Дисбаланс допаминергической системы, индуцированный введением допамина в боковой желудочек мозга, сопровождался повышением продукции фосфолипидов ($p = 0,03$) за счет фракции лизофосфатидилхолина ($p = 0,001$), и фосфатидилэтаноламина ($p = 0,02$), фосфатидной кислоты ($p = 0,001$), что привело к снижению поверхностной активности сурфактанта ($p = 0,001$), но стимулировало фагоцитарную активность

АМ (p = 0,01). При моделировании очага патологической активности в стриатуме, характеризующегося высокой плотностью дофаминовых рецепторов, увеличился оборот фосфолипидов (p = 0,001) и активность механизмов врожденного иммунитета, о чем свидетельствовало повышение фагоцитарного индекса (p = 0,006) и фагоцитарного числа (p = 0,001). При введении ПК-Мерц, стимулирующего высвобождение дофамина и блокирующего NMDA-рецепторы глутамата, увеличилась продукция фосфолипидов (p = 0,001) с низкими поверхностно-активными свойствами (p = 0,001), как и при активации стриатума, но способность АМ к фагоцитозу снизилась (p = 0,001) по сравнению с воздействием на стриатум, а фагоцитарное число соответствовало контролю.

Заключение. При дисбалансе дофаминергической нейротрансмиссии сопряженность изменения состава фосфолипидов сурфактанта и фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов определяет эффективность механизмов врожденного иммунитета легких и органной резистентности.

ВЛИЯНИЕ АНГИОТЕНЗИНА-II НА ЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МНОЖЕСТВЕННО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Толпыго С.М.[1], Шойбонов Б.Б.[1, 2], Лагутина Л.В.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», Москва, Россия

[2] ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Общепризнано, что эндогенные множественно модифицированные липопротеины низкой плотности (ммЛНП) и ангиотензин-II (А-II) – основной эффекторный пептид ренин-ангиотензиновой системы – играют ведущую роль в развитии сосудистой эндотелиальной дисфункции и запуске иммунных процессов при атеросклерозе. Показано также, что ммЛНП оказывают цитотоксическое действие на эндотелий сосудов, вызывая воспаление и фиброз. Ранее нами разработан способ определения литической активности ммЛНП и иммунных комплексов, содержащих ммЛНП (ИК-ммЛНП), позволяющий определить патогенность, т.е. атерогенность, данных соединений. Определение литической активности основано на наличии лизофосфатидилхолина и фосфолипазы А2 в составе ммЛНП, которые вызывают лизис собственных эритроцитов.

Эксперименты проведены на 40 крысах-самцах популяции Wistar (по 10 особей в группе) с массой тела 320-350 г. Животным однократно вводили: 1 группа – конъюгат А-II с ммЛНП (в дозе 300 мкг/кг по А-II и 200 мкг/кг по носителю в 0,5 мл физиологического раствора); 2 группа – белок-носитель – ммЛНП (в дозе 200 мкг/кг в 0,5 мл физиологического раствора); 3 группа – смесь А-II, ммЛНП и физиологического раствора; 4 группа – 0,5 мл физиологического раствора. Конъюгирование А-II и ммЛНП осуществляли карбодиимидным методом, при этом 1 молекула ммЛНП связывалась с 10-12 молекулами А-II. Использовали естественно модифицированные окислением ЛНП, выделенные из сыворотки крови больных атеросклерозом с применением разработанного нами метода. Через 5-6 месяцев после однократного введения веществ у животных 1-4 групп в сыворотке крови определяли содержание эндогенных ммЛНП, ИК-ммЛНП, а также оценивали их литическую активность. Тест литической активности проводили в 96-луночных плоскодонных иммунологических планшетах по 3 повтора. Сыворотки крови крыс обрабатывали 20% раствором поливинилпирролидона с молекулярной массой 35000 (ПВП-35000) при объемном соотношении сыворотка: ПВП (1:0,84), инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре. Агрегаты ммЛНП осаждали центрифугированием, тщательно декантировали и осадок ммЛНП растворяли в буфере без ПВП. Вначале по 10 мкл (× 3) ммЛНП или ИК-ммЛНП вносили в лунки, потом добавляли 60 мкл (× 3) буфера VBS2+ и 30 мкл (× 3) суспензии стандартизованных в этом же буфере эритроцитов барана. Параллельно ставили контроли: 3 контроля на полный лизис (30 мкл суспензии аутологичных эритроцитов + 70 мкл H_2O); 3 контроля на спонтанный лизис эритроцитов (30 мкл аутологичных эритроцитов + 70 мкл буфера VBS^{2+}). Тщательно перемешивали и сразу измеряли оптическую плотность на фотометре для иммуноферментного анализа при длине волны 620 нм (бланк устанавливали против воздуха). После измерения планшеты герметично заклеивали пленкой и оставляли на 48 часов при комнатной температуре, затем планшету тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность при тех же условиях, по калибровочному графику определяли степень лизиса и при лизисе более 10% констатировали повышенную литическую активность ммЛНП или ИК-ммЛНП.

Получены следующие данные об атерогенности ммЛНП. В 1-ой группе (комплекс ммЛНП с А-II) и 3-ей группе (смесь ммЛНП с А-II) литическая активность повышена у 70% крыс (у 7 из 10 животных в группе). Во 2 группе (ммЛНП) также наблюдается повышение литической активности в 50% случаев. В 4-ой группе (введение физиологического раствора) литическая активность повышается только у 20% животных. Таким образом, даже после однократного введения комплекса А-II с ммЛНП, ммЛНП, смеси А-II и ммЛНП через 5-6 месяцев их эндогенные ммЛНП в сыворотке крови характеризуются повышенной патогенностью (атерогенностью).

При оценке литической активности ИК-ммЛНП обнаружено, что в 1-ой группе (комплекс ммЛНП с А-II) у 40% крыс ИК-ммЛНП утрачивают литическую активность, в 10% – даже увеличивают ее (с 21% для ммЛНП до 30% в составе ИК-ммЛНП). Показано, что у всех животных 2-ой (ммЛНП) и 3-ей (смесь ммЛНП с А-II) групп патогенность ИК-ммЛНП полностью отсутствует. У части (20%) крыс 4-ой группы (физиологический раствор) литическая активность ИК-ммЛНП снижается (с 30% для ммЛНП до 13% в составе ИК-ммЛНП), у остальных контрольных животных не изменяется. Полученные данные свидетельствуют о протективной роли ИК-ммЛНП при развитии аутоиммунного ответа на ммЛНП в организме и функциональной гетерогенности образующихся при этом аутоантител. А-II, по-видимому, за счет своей выраженной прооксидантной и провоспалительной активности обуславливает дополнительную модификацию ммЛНП, увеличивая тем самым их патогенность и прогрессирование атеросклеротического процесса.

ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В КИШЕЧНО-АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА

Топол И.А.

Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина

Введение. Ситуация, сложившаяся в последние годы в современном обществе, характеризуется высоким уровнем социального напряжения, при котором стрессы приобретают затяжной характер. Хронический социальный стресс (ХСС) способен вызывать нарушения не только в нейроэндокринной системе, провоцируя развитие депрессии и тревоги, но и приводить к изменениям функционирования врожденного и адаптивного иммунитета.

Цель. Изучение влияние ХСС на распределение $TLR2^+/4^+$, NF-κB$^+$, T-bet$^+$, GATA3$^+$, RORγt$^+$, FoxP3$^+$, LMP2$^+$, XBP1$^+$ лимфоцитов в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани.

Материалы и методы. Исследование проводили на 70 самках крыс линии Вистар, которые были разделены на три экспериментальные группы: контрольные крысы (группа 1); крысы, которым моделировали ХСС1 путем трехнедельной социальной изоляции и длительного психоэмоционального воздействия (группа 2); крысы, которым моделировали ХСС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках с ежедневной сменой состава (группа 3). Уровень эмоционально-поведенческой и исследовательской активности изучали в тестах «открытое поле» и «перегородка»; в тесте Порсолта («принудительное плавание») определяли уровень депрессивности животных.

Структуру популяции $TLR2^+/4^+$, NF-κB$^+$, T-bet$^+$, GATA3$^+$, RORγt$^+$, FoxP3$^+$ LMP2$^+$, XBP1$^+$ клеток изучали на основании анализа серийных гистологических срезов, окрашенных моно- и поликлональными антителами к TLR2/ 4, NF-κB, T-bet, GATA3, RORγt, FoxP3, LMP2, XBP1 крыс, с использованием методов прямой и непрямой иммунофлюоресценции.

Результаты. Было установлено, что развитие ХСС приводит к значительной активации врожденной иммунной системы и сопровождается дисбалансом субпопуляций Т-хелперов в КАЛТ, приводит к увеличению отношения Tbet$^+$/Gata3$^+$ и уменьшению FoxP3$^+$/Roryt$^+$ клеток, это свидетельствует о доминировании Th1- и Th17-дифференцировки в условиях ХСС и повышении уровня про-воспалительной сигнализации в кишечнике.

Кроме того, было показано, что на фоне хронического социального стресса развивается иммунопротеасомный дефект и стресс эндоплазматического ретикулума, который сопровождается однонаправленной тенденцией к увеличению общего количества LMP2$^+$ лимфоцитов и уменьшению общего числа XBP1$^+$ клеток, а также изменение концентрации LMP2 и XBP1 в иммунных клетках зависело от типа стресса.

Заключение. Проведенные исследования показывают, что хронический социальный стресс, вопреки классической парадигме стресса, существенно повышает уровень провоспалительной сигнализации в кишечнике и может быть триггером развития воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ КАК РЕГУЛЯТОРЫ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Умнякова Е.С.[1], Берлов М.Н.[1, 2], Овчинникова Т.В.[3], Кокряков В.Н.[1, 2]

[1] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[3] ФГБУН «Институт биоорганической химии», Москва, Россия

Введение. Антимикробные пептиды (АМП) и система комплемента являются наиболее важными гуморальными факторами системы врожденного иммунитета. Колокализация и коэволюция этих факторов позволяют предположить существование тесного взаимодействия между различными АМП и белками комплемента. Такого рода взаимодействия могут играть роль в процессе регуляции иммунного ответа со стороны системы комплемента, однако в свою очередь не исключается и влияние белков системы комплемента на биологические свойства антимикробных пептидов.

До сих пор особенности взаимодействия АМП с системой комплемента остаются малоизученными. В литературе имеются разрозненные и противоречивые сведения о влиянии отдельных АМП на активацию комплемента, которые были получены с использованием принципиально различных подходов и разных моделей. Отдельный интерес представляют использование гетерологичных АМП с определенными структурными особенностями. Ранее нашей группой было показано взаимодействие рецепторной молекулы классического пути комплемента – C1q с ареницином-1 (Ar-1), АМП из целомоцитов пескожила *Arenicola marina*, а также с протегрином-1 (PG-1), кателицидином свиньи. Третичная структура этих пептидов представляет собой антипараллельную бета-шпильку, стабилизированную дисульфидными связями. Возможно, подобная структура важна для взаимодействия этих пептидов с белком C1q. Потому представляет интерес изучение в этом аспекте и других АМП, имеющих сходную третичную структуру.

Цель и задачи. Изучить взаимодействие тахиплезина-1 (Tach 1), антимикробного пептида мечехвоста *Tachypleus tridentatus*, сходного по третичной структуре с Ar-1 и PG-1, с белком комплемента C1q и оценить влияние данного АМП на работу комплемента.

Материалы и методы. Белок-пептидные комплексы выявляли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Влияние Tach 1 на активацию комплемента оценивали с помощью антителозависимого гемолиза эритроцитов барана.

Результаты. Нам удалось выявить стабильные комплексы Tach 1 с белком комплемента C1q методом ППР.

По результатам оценки влияния Tach 1 на активность комплемента было показано, что данный пептид выступал в роли синергиста комплемента, и при добавлении пептида в концентрации 5 мкг/мл гемолиз эритроцитов усиливался. Важно отметить, что мы использовали пептиды в тех концентрациях, при которых они сами по себе не проявляют гемолитической активности. Ранее нами были получены данные о том, что структурно сходный с Tach 1 пептид Ar-1, напротив оказывал ингибирующее действие: в концентрации 20 мкг/мл полностью подавлял

активацию комплемента, а в концентрации 7 мкг/мл – частично.

Заключение. Согласно нашим данным, даже сходные по третичной структуре пептиды могут иметь разнонаправленный эффект на активацию комплемента. Это необходимо учитывать при использовании данных соединений для разработки на их основе регуляторов комплемента. Существует множество патологических состояний, связанных либо с гипо-, либо с гипер-активацией каскада комплемента, и потому важно продолжать изучение этих феноменов с перспективой создания препарата для лечения последствий дисрегуляции системы комплемента.

Работа поддержана грантом РФФИ для молодых ученых №16-34-00136 мол_а.

ВЛИЯНИЕ ФИНГОЛИМОДА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Уракова М.А., Брындина И.Г.

ФГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, Ижевск, Россия

Внимание ученых при изучении черепно-мозговой травмы (ЧМТ) традиционно привлекают процессы нарушения и восстановления мозговых функций. Вместе с тем, обнаружены структурно-морфологические изменения в легких и частое развитие пневмонии после травматического воздействия на головной мозг (Lopez-Aguilar J., Blanch L., 2015). Наряду с этим, в исследованиях последних лет обнаружено протекторное влияние финголимода, являющегося структурным аналогом сфингозин-1-фосфата, на ряд клеточных функций (усиление пролиферативных процессов, угнетение апоптоза), доказаны его иммуномодулирующие эффекты.

Цель. Изучение влияния финголимода на функциональную активность альвеолярных макрофагов при ЧМТ у крыс.

Экспериментальное исследование проведено на 45 крысах-самцах массой 180-200 г, в том числе 15 контрольных. ЧМТ воспроизводили (n = 15, 1-ая группа) под наркозом путем модели «свободного падающего груза» (Beaumont A. et al., 1999). На голове наркотизированных крыс, для равномерного распределения удара по черепной коробке, фиксировали металлическую пластинку диаметром 10 мм и толщиной 3 мм. Далее осуществляли механическую травму посредством опускания на теменно-затылочную область груза массой 50 г с высоты 50 см с площадью ударной части, равной 3,5 см^2. Остальным животным (n = 15, 2-ая группа) после моделирования ЧМТ однократно внутрибрюшинно вводили финголимод по 0,1 мг/кг массы тела.

Спустя 14 суток у крыс получали бронхо-альвеолярные смывы (БАС). Из клеточной взвеси, полученной после центрифугирования БАС, готовили мазки, в которых определяли эндопульмональную цитограмму. Для оценки поглотительной активности альвеолярных макрофагов подсчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) – процент фагоцитирующих клеток, и фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число объектов фагоцитоза (дрожжей), поглощенное одной клеткой спустя 30 и 120 минут инкубации. При сопоставлении ФЧ после 30-минутной и 120-минутной инкубации подчитывали индекс завершенности фагоцитоза.

В ходе экспериментальных исследований было выявлено, что ЧМТ сопровождалась увеличением количества макрофагов и снижением доли лимфоцитов в БАС ($P < 0,05$). ЧМТ в условиях введения финголимода вызывала еще более выраженное уменьшение лимфоцитов ($P < 0,05$), при этом не оказывая существенного влияния на содержание альвеолярных макрофагов ($P > 0,05$). По-видимому, наблюдаемое уменьшение лимфоцитов в БАС вызвано блокадой выхода лимфоцитов из лимфоидных тканей путем действия финголимода на сфингозин-фосфатные рецепторы 1 типа.

Фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов при ЧМТ характеризовалась снижением ФИ на 30-ой и 120-ой минуте инкубации ($P < 0,05$). Одновременно наблюдалось уменьшение среднего количества объектов фагоцитоза, поглощенное клеткой как через 30, так и через 120 минут ($P < 0,05$). Введение финголимода не вызывало изменений ФИ и ФЧ, выявленных при ЧМТ без дополнительного воздействия ($P > 0,05$). Индекс завершенности фагоцитоза был снижен в условиях травматического повреждения головного мозга ($P < 0,05$), но не отличался от контрольных значений при сочетании ЧМТ с введением финголимода ($P > 0,05$).

Таким образом, введение финголимода на фоне ЧМТ изменяет клеточный состав БАС в сторону уменьшения лимфоцитов. При этом сохраняется вызванное травмой мозга уменьшение фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов, однако частично восстанавливается их обезвреживающая активность в отношении поглощенных объектов. Полученные результаты доказывают местное иммуномодулирующее действие финголимода, наряду с его вовлечением в регуляцию системных иммунных механизмов.

УЧАСТИЕ ЛИМФОЦИТАРНОГО ФОСФАТАЗА-АССОЦИИРОВАННОГО ФОСФОПРОТЕИНА В АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ

Филатов А.В., Круглова Н.А., Мешкова Т.Д., Мазуров Д.В.

ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В лимфоцитах фосфатаза CD45 контролирует уровень фосфорилирования ряда рецепторов и сигнальных молекул и таким образом является важным регулятором активации иммунокомпетентных клеток. Однако какие молекулы управляют активностью самой CD45, остается невыясненным. На роль регулятора претендует лимфоцитарный фосфатаза-ассоциированный фосфопротеин (LPAP). Этот небольшой трансмембранный белок образует надмолекулярный комплекс с CD45, а также с корецептором CD4 и киназой Lck. В самых последних работах было показано, что белок LPAP может влиять на пролиферацию и выживаемость В-лимфоцитов (Kleiman et al., 2015). Также было обнаружено, что белок LPAP кооперирует с продуктом гена c-myc в процессе злокачественной трансформации пре-В-клеток (Wolf et al., 2016). Все это указывает на важную роль белка LPAP в регуляции кле-

точных процессов. Мы предполагаем, что функция белка LPAP может быть раскрыта путем изучения фосфорилирования этой молекулы.

Используя направленный мутагенез и масс-спектрометрический анализ, нами были идентифицированы сайты фосфорилирования LPAP. Информация о фосфо-мотивах белка LPAP была использована для синтеза соответствующих фосфопептидов и получения на их основе антител против обнаруженных фосфосайтов. Полученные фосфо-специфические антитела подтвердили идентифицированные нами сайты фосфорилирования и позволили изучить кинетику фосфорилирования/дефосфорилировании LPAP в ответ на физиологические стимулы. Нами было обнаружено, что при активации лимфоцитов под действием антитела OKT3, направленного против антиген-специфического рецептора TCR, происходит быстрое дефосфорилирование Ser-99 и Ser-172, вслед за которым наблюдалось более медленное фосфорилирование Ser-163. Фосфорилирование Ser-153 оставалось неизменным и не зависело от внешних стимулов. Воздействие форболмиристата, который является активатором протеин киназы С, приводило к аналогичной цепочке событий. Нокаут киназы Lck отменял действие антитела OKT3, но не форболфиристата. Было проведено сравнение изменений статуса фосфорилирования LPAP с кинетикой активации различных киназ. Эти эксперименты вместе с ингибиторным анализом указали на возможные киназы, которые находятся в сигнальных путях upstream и downstream от белка LPAP. Анализ мотивов белка LPAP показал, что казеин киназы типа I и II, а также MAP киназы могут принимать участие в фосфорилировании белка LPAP. Полученные данные позволяют перейти к изучению роли белка LPAP при конкретных аутоиммунных и онкологических заболеваниях.

ИЗУЧЕНИЕ ХЕМОТАКСИСА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ПРИМЕРЕ ЛИНИИ K562 И КЛЕТОК МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

Филина А.Б.[1], Свитич О.А.[1], Аммур Ю.И.[1], Голенков А.К.[2], Клинушкина Е.Ф.[2], Зверев В.В.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
[2] ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Введение. Смертность от онкологических заболеваний стоит на втором месте после летальности от заболеваний сердечно-сосудистой системы. Одной из проблем в развитии злокачественных новообразований является метастазирование опухолевых клеток. Последние десятилетия изучается роль хемотаксиса в метастазировании опухолевых клеток, а также участие TLRs в опухолеобразовании. Однако, несмотря на большое количество работ, направленных на изучение вышеописанных факторов, до сих пор не изучалось влияние активации TLRs на хемотаксис. Таким образом, **целью** данной работы – изучить спонтанный и индуцированный лигандами TLRs и CXCL12 хемотаксис K562 и клеток миеломонобластного лейкоза.

Цель и задачи. Изучить спонтанный хемотаксис МНК, выделенных от здоровых доноров и выделенных от пациентов с миеломонобластным лейкозом, а также клеток опухолевой линии K562; изучить индуцированный хемотаксис лигандами TLRs и CXCL12 вышеописанных клеток; сравнить показатели спонтанного и индуцированного хемотаксиса клеток.

Материалы и методы. В качестве исследуемого материала использовалась культура клеток хронической миелогенной лейкемией линии K562 (предоставлена лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ НИИВС им.И.И. Мечникова), а также МНК, выделенные от здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом (пациенты отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского).В качестве хемоаттрактантов использовались следующие синтетические лиганды DNA_ lig (ccg-gtc-cac-aag-ggg-ggc-ca) и RNA_lig (ccg-agg-aug-cga-ggc-uug-uu), последовательности которых были ранее получены Лабжиновым П.А. в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Использовался человеческий рекомбинантый хемоаттрактант CXCL12 (ThermoFisher, США). Для изучения хемотаксиса клеток использовали камере Бойдена 96 – Well Filtration Plate Multiscreen TM – MIC с размером пор 8 мкм (фирма Millipore). Исследование хемотаксиса проводили в динамике через 10, 60 мин и через сутки с использованием вышеперечисленных лигандов. В качестве контроля использовали среду RPMI-1640 без глутамина (ПанЭко, РФ). Статистический анализ проводили с использованием компьютерной статистической программы BioStat 2009 5.8.3.0, а также программы Microsoft Excel 97-2003.

Результаты. Динамика хемотаксиса МНК пациентов с миеломонобластным лейкозом и клеток K562 по направлению к CXCL12 статистически значимо не отличалась. Показано, что CXCL12-опосредованный хемотаксис МНК пациентов через 60 минут и через 24 часа достоверно увеличивалась относительно контроля (в 2,4 раза). Миграция МНК здоровых доноров по направлению к CXCL12 была достоверно выше контроля через 60 минут и 24 часа в 1,3 и 1,6 раз, соответственно. Миграция МНК здоровых доноров по направлению к CXCL12 была в 1,7 и 1,5 раз выше миграции к DNA_lig и RNA_lig через 60 минут и 24 часа соответственно. Миграция МНК здоровых доноров относительно DNA_lig и RNA_lig не отличалась достоверно друг от друга, но была ниже, чем в контроле в 2 и 1, 7 раза через 10 минут и 24 часа соответственно.

Заключение. По результатам проведенного исследования можно сказать, что хемотаксис по направлению к DNA_lig и RNA_lig значительно ниже, чем в контроле, что может говорить о супрессорной функции этих лигандов на миграцию. Миграция опухолевых клеток (линии K562 и клетки миеломонобластного лейкоза) по направлению к CXCL12 была в несколько раз ниже, чем индуцированная миграция здоровых клеток. Таким образом, миграция опухолевых клеток к CXCL12 значительно снижена относительно миграции МНК здоровых доноров: причины по которым миграция опухолевых клеток снижена планируется изучать в дальнейшем путем исследования экспрессии факторов врожденного иммунитета, в том числе хемокинов и их рецепторов.

РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР ПРЕДОТВРАЩАЕТ РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА, ВЫЗВАННОГО ИММУНИЗАЦИЕЙ НАТИВНЫМИ ЛИПОПРОТЕИНАМИ

Фомина К.В., Конорюкова А.А., Кузина М.А., Касимова Г.С., Богданова К.В.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

В настоящее время механизм, приводящий к развитию атеросклероза, до конца не ясен. В исследованиях, проведенных нами ранее, было показано, что однократная иммунизация крыс Wistar нативными липопротеинами низкой плотности (нЛПНП) человека или нативными липопротеинами высокой плотности (нЛПВП) человека вызывает висцеральное ожирение и изменения в стенке аорты типичные для ранних стадий атерогенеза. Однако в ответ на иммунизацию нЛПНП или нЛПВП изменения в стенке аорты и висцеральное ожирение развиваются не у всех исследованных крыс. Также нами был выявлен новый фактор регуляции аутореактивности, предотвращающий развитие экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний, таких как коллаген-индуцированный артрит, аутоиммунный энцефаломиелит. Исследование специфичности данного фактора регуляции показало, что он представляет собой популяцию антиидиотипических антител специфичных к антигенсвязывающим участкам антигенраспознающих рецепторов аутореактивных лимфоцитов. От других антиидиотипических антител фактор регуляции отличается наличием общего паратопа специфичного к неоантигенным детерминантам шарнирной области IgG и его Fc-фрагментов. Учитывая данные о специфичности и принцип метода выявления нового фактора регуляции аутореактивности, последний был отнесен к антителам подобным ревматоидному фактору. Чтобы отличать от классического ревматоидного фактора, ассоциированного с артритом, ревматоидный фактор, сдерживающий развитие аутоиммунных заболеваний, получил название регуляторный ревматоидный фактор (регРФ). Мы предполагаем, что регРФ является универсальным фактором негативной регуляции аутореактивности и участвует в регуляции атерогенных и адипогенных иммунных реакций, предотвращая развитие атеросклероза и висцерального ожирения. Если гипотеза верна, то крысы, продуцирующие регРФ в ответ на иммунизацию нЛПНП и нЛПВП, окажутся устойчивы к атеросклерозу.

Тринадцать крыс Wistar было иммунизировано нЛПНП (Sigma), семнадцать – нЛПВП человека (Kalen Biomedical) в составе неполного адъюванта Фрейнда (НАФ) (Sigma), однократно, в дозе 200 мкг. Контрольные крысы (n = 16) получили инъекцию НАФ. Титр антител против нЛПНП и нЛПВП человека определяли методом ИФА. Для выявления эпикардиального жира сердце окрашивали суданом III. Оценивали содержание внутриабдоминального жира. Титр регРФ определяли методом агглютинации танизированных эритроцитов, нагруженных гомологичным иммуноглобулином G. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия между популяцией регРФ и антителами к нативным липопротеинам определяли методом конкурентного ИФА.

В ответ на иммунизацию нЛПНП атеросклероз развился у 60% крыс, в ответ на иммунизацию нЛПВП – у 80% крыс. В качестве критерия наличия или отсутствия у крыс атеросклероза было использовано висцеральное ожирение (появление эпикардиального жира и увеличение объема внутриабдоминального жира), так как висцеральное ожирение является надежным маркером атеросклероза у человека и легко визуализируется. Наличие висцерального ожирения было ассоциировано с ранними атеросклеротическими изменениями стенки аорты. Обнаружено, что у крыс, иммунизированных нЛПНП либо нЛПВП и оказавшихся устойчивыми к развитию висцерального ожирения и атеросклероза, продукции антител к липопротеинам предшествует продукция регРФ. У животных, у которых развилось висцеральное ожирение и выявлены изменения в стенке аорты, повышения уровня регРФ в период индукции иммунного ответа (т.е. в течение 14 дней после иммунизации) не обнаружено. Сравнительный анализ уровня регРФ у устойчивых и чувствительных к атеросклерозу крыс выявил достоверно высокий его уровень на 7 день после иммунизации нЛПНП и на 14 день после иммунизации нЛПВП у устойчивых крыс по сравнению с чувствительными (Манна–Уитни тест, $p < 0,05$). Также обнаружено, что регРФ, полученный от устойчивых к атеросклерозу крыс, иммунизированных нЛПНП, является антиидиотипическими антителами по отношению к антителам против нЛПНП, а регРФ, полученный от крыс, иммунизированных нЛПВП, – антиидиотипическими антителами к антителам против нЛПВП. Таким образом, продукция регРФ в ответ на иммунизацию крыс нативными липопротеинами ассоциирована с устойчивостью крыс к развитию экспериментального атеросклероза и висцерального ожирения. Отсутствие повышения уровня регРФ в ответ на иммунизацию крыс нативными липопротеинами может служить предиктором экспериментального атерогенеза и развития висцерального ожирения у крыс, иммунизированных нативными липопротеинами.

ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПЛАЗМИДОЙ, КОДИРУЮЩЕЙ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ЦИТОКИН IL-10

Хантакова Ю.Н., Курилин В.В., Максютов А.З., Сенников С.В.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Вслед за успехами в клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний стали разрабатываться клеточные подходы коррекции посттрансплантационных нарушений, требующих пожизненного применения иммуносупрессивной терапии. Среди них особое место занимает использование толерогенных дендритных клеток (ДК). Однако при введении в организм в условия трансплантации такие ДК теряют толерогенные свойства и дифференцируются в зрелые клетки, способствующие развитию эффекторного иммунного ответа. Для поддержания толерантности необходимо получение стабильной популяции толерогенных ДК. Одним из подходов является использование иммунорегуляторных цитокинов, таких как IL-10, однако при введении в организм, в условиях дефицита IL-10, может происходит их созревание. В отличие от использования белков, электропорация (ЭП) ДК ДНК-конструкциями, кодирующими цитокины, будет обеспечивать стабильное толерогенное состояние ДК. **Целью** данной работы является оптимизация протокола ЭП ДК плазмидой, кодирующей рмIL-10, а также опре-

деление зависимости эффективности ЭП от различных показателей.

Материалы и методы. В работе использовали мышей линии C57Bl/6, в возрасте от 2 до 6 месяцев, которые были предоставлены ИЦИГ (г. Новосибирск). Костный мозг (КМ) для исследования получали из бедренных костей животного. Для получения культуры ДК клетки КМ культивировали в концентрации 1 млн/мл полной среды RPMI-1640, при добавлении 20 нг/мл GM-CSF и 20 нг/мл IL-4. Через 48 часов проводилась смена полной среды с повторным добавлением цитокинов без предварительного осаждения клеток. Для проведения электропорации ДК дважды отмывали раствором PBS и разводили до концентрации 20 млн/мл в холодном растворе OptiMem. Для проведения процедуры ЭП к 100 мкл ДК, добавляли необходимое количество плазмидной ДНК-конструкции, И проводили ЭП при различных вольтажах и длительности импульса. Сразу после ЭП клетки культивировали в полной среде в 48-луночном планшете в концентрации 1-2 млн/мл. Оценка эффективности электропорации проводилась по определению GFP-позитивных клеток. Жизнеспособность клеток оценивалась по включению пропидия йодида. Определение эффективности электропорации ДК целевой плазмидой pMax-IL-10 проводилось по оценке внутриклеточного содержания IL-10 в ДК спустя 3 часа после ЭП при добавлении монензина и брефелдина А, а также по продукции цитокина методом ИФА. Статистическая обработка результатов производилась при помощи программы GraphPadPrism 6.0.

Результаты. Показано, что использование 60 мкг/мл ДНК-плазмиды при силе импульса в 250 V и длине импульса в 5 мс являются оптимальными условиями, обеспечивающими повышение количества GFP-позитивных клеток при минимальной общей клеточной гибели. Определение условий культивирования после ЭП показало оптимальное распределение и количество пролиферирующих клеток наблюдается при культивировании клеток в концентрации 2 млн/мл в смеси полной и кондиционной среды, в соотношении 1:1, при добавлении 20 нг/мл GM-CSF и 20 нг/мл IL-4. Использование данного протокола приводит к увеличению количества GFP-позитивных клеток до 50% при количестве жизнеспособных клеток 95%. Увеличение времени (10 ms и 15 ms) приводит к достоверному снижению количества GFP-позитивных клеток. Для оценки эффективности трансфекции проводили определение внутриклеточной продукции IL-10 после трансфекции плазмидой pMaxIL-10. Было показано достоверное увеличение количества $CD11c^{+}IL\text{-}10^{+}$ ДК по сравнению с контрольными группами, что указывает на эффективность разработанного протокола. Также методом ИФА показана дозозависимая продукция IL-10 при электропорации ДК разными количествами плазмиды, кодирующей рмIL-10. По сравнению с ДК без электропорации, которые продуцируют IL-10 в очень низких концентрациях (4 пг/мл), даже минимальное количество плазмидной ДНК (1 мкг/мл) способствует увеличению продукции IL-10 в 224 раза (до 896 пг/мл), а использование больших концентраций плазмиды приводит к гиперпродукции IL-10 до 45 нг/мл. В течение 3 дней не наблюдается увеличение продукции IL-10, что говорит о пике продукции цитокина уже спустя 24 часа после электропорации.

Выводы. Разработанный протокол электропорации позволяет эффективно проводить трансфекцию дендритных клеток, обеспечивающую высокий уровень продукции целевого цитокина рмIL-10 при высокой жизнеспособности клеток. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для индукции толерогенных ДК со стабильным фенотипом, которые станут основой для разработки подходов к индукции трансплантационной толерантности в условиях *ex vivo*.

Работа поддержана РНФ. Соглашение. № 16-15-00086 от 11.01.2016.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CD184 ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ

Хохлова Е.В.[1], Михайлова В.А.[1, 2], Соколов Д.И.[1, 2], Сельков С.А.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Трансэндотелиальная миграция NK-клеток периферической крови является основным механизмом их пополнения в децидуальной ткани, где они играют важную роль с самых ранних этапов беременности. В миграции NK-клеток в децидуальную оболочку важную роль играет CXCL12 (SDF-1, stromal cell-derived factor-1). SDF-1 – хемоатрактант, который продуцируется клетками трофобласта и способствует привлечению NK-клеток в зону маточно-плацентарного контакта за счет связывания с рецептором CXCR4 (CD184), экспрессированным на NK-клетках. **Целью** исследования являлся анализ экспрессии рецептора CD184 клетками линии NK-92MI в присутствии цитокинов (TNFα, TGF-β).

Материалы и методы. Клетки линии NK-92MI культивировали с цитокинами TNFα, TGF-β в течение 24 часов при 37 °C в атмосфере 100% влажности, 5% CO_2, после чего окрашивали антителами против рецептора CD184 (BD, США). Экспрессию рецептора оценивали при помощи проточного цитофлюориметра FacsCantoII (BD, США). Статистический анализ проводили в компьютерной программе Statistica 10, используя параметрический критерий Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты. Установлено, что при обработке клеток противовоспалительным цитокином TGF-β интенсивность экспрессии рецептора CD184 снижалась во всех исследуемых концентрациях по сравнению со спонтанным уровнем. Обработка провоспалительным цитокином TNFα увеличивала интенсивность экспрессии рецептора CD184 по сравнению со спонтанным уровнем.

Выводы. Провоспалительный цитокин TNFα и противовоспалительный цитокин TGF-β изменяют чувствительность NK-клетки к воздействию SDF-1 за счет изменения интенсивности экспрессии рецептора CD184, тем самым регулируя миграцию NK-клеток в ткани.

РОЛЬ АУТОАНТИТЕЛ К CD4 И РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА В ГИБЕЛИ $CD4^+$ ЛИМФОЦИТОВ У КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ gp120 ВИЧ-1

Храмова Т.В., Снигирёв А.Я., Ворожцова В.С., Вайтина А.М.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия
БУЗ УР «Удмуртский республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями», Ижевск, Россия

Введение. Сегодня одним из центральных вопросов патогенеза ВИЧ-инфекции, сдерживающим разработку эффективных способов лечения и предотвращения заболевания, является выяснение механизма гибели неинфицированных ВИЧ $CD4^+$ лимфоцитов, которые составляют основную массу гибнущих клеток при ВИЧ-инфекции. Предложенные в разное время гипотезы, объясняющие механизм истощения незараженных $CD4^+$ лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, либо не получили экспериментального подтверждения, либо не считаются полностью доказанными. Наиболее непротиворечивой и обоснованной является аутоиммунная гипотеза. Согласно аутоиммунной гипотезе СПИДа, основной причиной гибели незараженных ВИЧ $CD4^+$-лимфоцитов, является аутоиммунная реакция против CD4.

Цель. Исследование роли аутоантител к CD4, продукцию которых индуцирует gp120 ВИЧ, в гибели $CD4^+$ лимфоцитов.

Материалы и методы. Крыс Wistar (n = 12) иммунизировали рекомбинантным gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (ACROBiosystems) однократно в/к в составе неполного адъюванта Фрейнда (НАФ) в дозе 20 мкг. Уровень антител к gp120 ВИЧ-1 в плазме крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа. Определяли уровень антител к рекомбинантному CD4 человека и уровень аутоантител к рекомбинантному CD4 крыс методом иммуноферментного анализа. Кроме того, определяли аутоантитела к $CD4^+$ лимфоцитам крыс с помощью разработанного нами метода конкурентного иммуноцитохимического анализа. Количество $CD4^+$ лимфоцитов в периферической крови крыс измеряли методом проточной цитофлуориметрии, используя меченые FITC антитела к CD4 крыс. Также определяли титр регуляторного ревматоидного фактора методом агглютинации танизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов.

Результаты. Обнаружено, что иммунизация gp120 ВИЧ-1 вызывает продукцию аутоантител к CD4 у всех иммунизированных крыс, в то время как у контрольных крыс, получивших инъекцию НАФ, аутоантител к CD4 не обнаружено. Показано, что аутоантитела к CD4 связываются как с рекомбинантным CD4 крыс, так и с мембраносвязанным CD4 крыс. Индуцированные иммунизацией gp120 аутоантитела к CD4 крысы способны связывать также рекомбинантный CD4 человека. Полученные факты служат подтверждением того, что gp120 ВИЧ-1 способен не только индуцировать продукцию антител к gp120, но и вызывать активацию аутореактивных лимфоцитов, продуцирующих аутоантитела, перекрестно реагирующие с CD4 крысы и человека.

У иммунизированных крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4, наблюдалось транзиторное снижение количества $CD4^+$ лимфоцитов. Непосредственной связи между уровнем антител к $CD4^+$ лимфоцитам и количеством $CD4^+$ клеток обнаружено не было. Однако снижение числа $CD4^+$ лимфоцитов совпадало со спонтанным повышением уровня регуляторного ревматоидного фактора в крови. Обнаружена обратная корреляция между уровнем регуляторного ревматоидного фактора и количеством $CD4^+$ лимфоцитов в крови крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4, в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1 ($r = -0{,}73$, $p < 0{,}05$). Регуляторный ревматоидный фактор был исследован у крыс с целью выяснения его роли в регуляции иммунного ответа к gp120, так как ранее на нескольких экспериментальных моделях было показано его участие в предотвращении развития аутоиммунных заболеваний (Beduleva, 2015). В регуляции иммунного ответа против gp120 ВИЧ регуляторный ревматоидный фактор участия не принимает.

Заключение. Таким образом, гибель $CD4^+$ лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, является результатом совместного действия аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора. Мы предполагаем, что аутоантитела к CD4 вызывают активацию $CD4^+$ лимфоцитов, что приводит к экспрессии на их поверхности активационных молекул, к которым специфичен регуляторный ревматоидный фактор. Связывание последнего ведет к гибели $CD4^+$ лимфоцитов. Данное предположение не противоречит ранее обнаруженному факту, что регуляторный ревматоидный фактор убивает активированные $CD4^+$ лимфоциты. Вопрос о том, какие именно молекулы активации на $CD4^+$ лимфоцитах являются лигандом для регуляторного ревматоидного фактора, является предметом дальнейших исследований.

РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В СЕМЕННИКАХ НА РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ ИХ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Храмцова Ю.С., Тюменцева Н.В., Юшков Б.Г., Бухарина А.Ю.

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

Тучные клетки являются неотъемлемым компонентом иммунного микроокружения семенников, а именно важными посредниками в управлении Т-клеточной толерантностью. Они также выделяют ряд цитокинов, участвующих в физиологическом апоптозе зародышевых клеток, происходящем в нормальном яичке. Вместе с тем, выявляется отчетливая отрицательная корреляция между такими показателями, как число мастоцитов и состояние сперматогенеза. Вырабатывая провоспалительные медиаторы, они могут усугублять воспалительные процессы, происходящие в яичке после повреждения. Причины, которые могут привести к повреждению семенников, самые разнообразные. Однако остается невыясненным вопрос о типе реакции тучных клеток в ответ на разные виды повреждения яичек. В связи с этим **целью** работы является изучение реакции тучных клеток в семенниках на различные виды его повреждения.

Материалы и методы. Исследование проведено на 35 половозрелых крысах-самцах линии Wistar, которые были разделены на 4 группы: 1) интактные; 2) животные с проколом левого семенника иглой диаметром 3 мм; 3) животные с тупой травмой левого семенника путем его сдавления; 4) животные с экспериментальной моделью варикоцеле. Семенники исследовали на 7 и 30 сутки после воздействия. Для подсчёта тучных клеток в тканях срезы

окрашивали толуидиновым синим. Подсчет проводили на единицу площади с пересчетом на 1 мм^2. Для определения синтетической активности вычисляли средний гистохимический коэффициент. Для оценки функциональной активности рассчитывали индекс дегрануляции. Значимость различий при статистической обработке экспериментального материала оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни.

Результаты. На 7 сутки после прокола не наблюдается каких-либо достоверных изменений в количестве тучных клеток в поврежденном семеннике, но к 30-м суткам происходит снижение этого показателя по сравнению с интактной группой. При этом синтетическая активность тучных клеток на все сроки эксперимента остается высокой. Индекс дегрануляции на 7 сутки растет, а на 30 возвращается к показателю интактных животных. После тупой травмы на 7 сутки возрастает количество тучных клеток, а на 30 сутки происходит снижение количества мастоцитов до уровня интактных животных. Вместе с количеством тучных клеток достоверно возрастает и их синтетическая активность на 7 сутки. На 30 сутки после воздействия уровень синтетической активности тучных клеток возвращается к показателям интактных животных. Индекс дегрануляции увеличивается на 7 сутки и остается таким же и на 30 сутки после тупой травмы. На 7 сутки после формирования экспериментальной модели варикоцеле не отмечается достоверных изменений в количестве тучных клеток семенников, но уже на 30 сутки данный показатель резко уменьшается. Оценивая функциональные показатели тучных клеток, отмечаем повышение их синтетической активности на 7 сутки. К 30-м суткам картина становится противоположной, и синтетическая активность резко снижается и становится достоверно меньше интактных показателей. Индекс дегрануляции тучных клеток, в свою очередь, также значительно повышается к 7-м суткам и резко падает ниже интактного показателя к 30-м.

Заключение. Таким образом, гетерогенная тучноклеточная популяция совершенно по-разному реагирует на различные повреждения семенника как количественными, так и функциональными изменениями. Можно предположить, что тучные клетки обладают разнонаправленным действием в зависимости от срока воздействия. Так, на ранние сроки мастоциты способствуют развитию воспаления и косвенно вызывают деструкцию органа, а на поздние сроки играют иммунорегуляторную роль в репаративных процессах в семеннике. Следовательно, повышение количества мастоцитов на ранние сроки может свидетельствовать об ухудшении картины восстановления, а на поздние сроки, наоборот, их повышенное количество указывает на положительный прогноз восстановления.

АКТИВАЦИЯ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ВАКЦИНАМИ ПРОТИВ ГРИППА (*IN VITRO*)

Хромова Е.А., Сходова С.А, Столпникова В.Н., Кукина О.М., Ахматова Н.К., Костинов М.П.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. Грипп остается актуальной проблемой здравоохранения на протяжении последних десятилетий. Единственным способом эффективного ограничения распространения гриппа и уменьшения тяжести его последствий является широкий охват вакцинацией групп риска населения. Наибольшее применение, в силу своей высокой эффективности и малой реактогенности, получили инактивированные иммуноадъювантные вакцины против гриппа. В механизме формирования поствакцинального иммунитета в настоящее время отсутствует информация о сравнительной активности адъювантных и безадъювантных вакцин и их влиянии на врожденные эффекторы иммунной системы на молекулярно-клеточном уровне.

Известно, что к факторам врожденного иммунитета относятся предсуществующие в организме до контакта с патогеном механизмы защиты, предназначенные для предупреждения проникновения возбудителя и для запуска раннего воспалительного ответа Toll-подобные рецепторы (TLRs), которые распознают широкий спектр патоген-ассоциированных молекулярных структур (PRRs).

Цель и задачи. Изучение влияния вакцин против гриппа на содержание клеток с экспрессией TLRs *in vitro*.

Материалы и методы. Экспрессию TLRs на МЛПК определяли методом проточной цитометрии с применением мАТ к TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-8, TLR-9 (eBioscience, США) с использованием проточного цитометра FC-500 (Beckman Culter, США).

Исследуемые вакцины: Инфлювак – субъединичная вакцина, Ваксигрип – сплит-вакцина. Данные вакцины содержат 2 штамма вируса гриппа А по 15 мкг, один штамм вируса гриппа В – 15 мкг. Гриппол плюс – полимер-субъединичная иммуноадъювантная вакцина. Содержит 2 штамма вируса гриппа А по 5 мкг, один штамм вируса гриппа В – 5 мкг и иммуноадъювант Полиоксидоний – 500 мкг.

Результаты. Изучение влияния данных вакцин на содержание гранулоцитов с экспрессией TLRs выявило существенное повышение экспрессии со стороны TLR-5, TLR-9. Более активным стимулирующим действием на TLR-3$^+$ клетки обладала субъединичная вакцина (увеличение содержания в 7,2 раза), несколько ниже была активность иммуноадъювантной вакцины (увеличение в 5,1 раз), сплит-вакцина повышала экспрессию в 3,7 раз. Известно, что TLR-8 распознает одноцепочечные РНК вирусов и является специфическим рецептором для распознавания вируса гриппа. Максимально активирующим влиянием обладала субъединичная вакцина (увеличение в 5,7 раз), при этом активность сплит-вакцины была несколько ниже (в 4,1 раза). Это, вероятно, связано с костимулирующим влиянием на экспрессию TLR-8 Полиоксидония в составе иммуноадъювантной вакцины и воздействием поверхностных и внутренних вирусных белков в составе сплит-вакцины. В отношении активации лимфоцитов, экспрессирующих TLRs, было выявлено максимально активирующее влияние на эндосомальные рецепторы сплит-вакцины. Под ее воздействием увеличивалась экспрессия TLR-9 в 4 раза, безадъювантная и адъювантная субъединичные вакцины оказывали меньшее стимулирующее влияние (увеличение в 2,8 и 3,3 раза соответственно). При инкубации МЛПК со сплит-вакциной происходило увеличение численности клеток с экспрессией TLR-8 в 10 раз. Иммуноадъювантная вакцина проявляла большую активность по сравнению с другими вакцинами только в отношении количества лимфоцитов с экспрессией TLR-4, что можно объяснить опосредованным лиганд-рецепторным взаимодействием. Также отмечено увеличение TLR-5–экспрессирующих моноцитов в 4,7 раз при стимуляции субъединичной вакциной. Выявлено, что иммуноадъювантная вакцина яв-

ляется единственной активирующей вакциной в отношении TLR-3$^+$ моноцитов. Все вакцины являлись мощными стимуляторами TLR-9, увеличивая экспрессию в среднем в 5 раз. Примечательным явился факт, что иммуноадъювантная (в 2 раза) и сплит-вакцина (в 4 раза) статически значимо повышали содержание клеток с экспрессией эндосомального рецептора TLR-8.

Вывод. Все исследуемые вакцины обладали иммуностимулирующим действием в отношении эффекторов врожденного иммунитета, так как в культуре МЛПК индуцировали нарастание численности TLRs-экспресирующих клеток. Более сильным потенциалом обладала иммуноадъювантная вакцина, повышающая численность клеток с рецепторами распознавания в 1,3-6,8 раз.

СУЩЕСТВУЮТ ЛИ В-ЛИМФОЦИТЫ, ТОРМОЗЯЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ?

Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Комарова Л.В., Снегирева Н.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. Гуморальный иммунный ответ у животных и человека развивается по известным правилам. При первичном иммунном ответе максимальное число антитело-продуцентов (АОК) в селезенке мышей выявляется на 4-5-е сутки после введения антигена (АГ); на 6-7-е сутки происходит их снижение почти до исходного уровня. Помимо образования АОК, введение АГ приводит также к поликлональной активации В-лимфоцитов, причем оба процесса развиваются параллельно. Известно, что при ответе на Т-зависимые АГ важную роль в регуляции гуморального ответа играют Т-лимфоциты. В то же время о клетках, участвующих в регуляции синтеза/секреции специфичных и поликлональных иммуноглобулинов (ИГ) при ответе на Т-независимые АГ 2-го типа (ТН-2 АГ), известно сравнительно немного. В последние годы появились данные о В-клетках, обладающих регуляторными, в частности супрессорными, свойствами. Эти клетки получили название Breg. Свойства и функциональная активность Breg изучались, главным образом, на модели воспалительных и аутоиммунных процессов. Регуляторная (супрессорная) активность таких клеток обусловлена секрецией IL-10. Для Breg характерна экспрессия CD1d и CD5, а также IgM и CD24. При этом CD23 на них отсутствует. Роль этих клеток в гуморальном иммунном ответе практически не изучалась. Часть Breg принадлежит к популяции В-1 лимфоцитов. Поскольку В-1 клетки отвечают, в основном, на ТН-2 АГ, изучение роли Breg в регуляции ответа на ТН-2 АГ представляется весьма актуальным.

Цель и задачи. Проверка предположения об участии IL-10-продуцирующих В-клеток в регуляции (угнетении) образования АТ и поликлональных ИГ при ответе на ТН-2 АГ. Определение динамики образования IL-10-секретирующих В-клеток и сопоставление ее с динамикой образования АОК и иммуноглобулин-продуцентов (ИГОК) при иммунизации мышей ТН-2 АГ.

Материалы и методы. Опыты проводили на мышах линии СВА. Мышей иммунизировали ТН-2 АГ – альфа (1→3) декстраном в дозе 5 мкг/мышь. Клетки селезенки получали на 1, 4-7-е сутки после введения АГ. Затем методом иммуномагнитной сепарации выделяли CD19$^+$В-клетки (чистота 95-97%) и в них определяли число АОК, ИГОК и IL-10-секретирующих клеток (IL-10$^+$В) методом ELISPOT. В этих же клетках оценивали содержание Breg клеток с фенотипом CD5$^+$CD1d^{hi}CD19$^+$ и IL-10$^+$ В-клеток с использованием набора Regulatory B cell isolation kit методом проточной цитометрии на Beckman Coulter EPICS XL.

Результаты. Установлено, что наибольшее число АОК (2458/млн В-клеток против 188/млн в норме) наблюдалось на 4-е сутки; к 6 суткам отмечалось снижение их содержания примерно в 2 раза, к 7 суткам – в 3 раза по сравнению с пиковым значением. Сходным образом изменялось содержание ИГОК в селезенке иммунизированных мышей.

Динамика образования IL-10$^+$В-клеток в селезенке отличалась от таковой для АОК и ИГОК. Методом ELISPOT наибольшее увеличение IL-10-секретирующих В-клеток (примерно на 30% по сравнению с нормой) выявлено на 5-е сутки, на 7-й день их содержание возвращалось к исходному уровню. Методом проточной цитометрии установлена сходная динамика: на 6-й день после иммунизации содержание IL-10$^+$В-клеток возрастало примерно в 2,5 раза и в последующие дни снижалось. Нужно отметить, что содержание IL-10$^+$В-клеток в селезенке было незначительным и составляло 0,4-0,5%.

Выявление Breg клеток с фенотипом CD5$^+$CD1d^{hi}CD19$^+$ (основные продуценты IL-10) показало, что количество таких клеток в селезенке мышей в норме составляло 0,3-0,8%. После иммунизации декстраном содержание CD5$^+$CD1d^{hi}CD19$^+$ клеток на 4-й день возрастало примерно в 1,5 раза и сохранялось на таком уровне до 6 дня, после чего происходило снижение их числа. Возрастание уровня CD5$^+$CD1d^{hi}CD19$^+$ клеток на 4-е сутки, можно объяснить тем, что В1-клетки, имеющие такой фенотип, являются основной популяцией, отвечающей на ТН-2 АГ, и также достигают максимума на 4-5-е сутки, как указано выше.

Заключение. Выявлены различия в динамике образования АОК, ИГОК и IL-10$^+$В-клеток в селезенке мышей при иммунизации мышей ТН-2 АГ декстраном: снижение числа АОК и ИГОК коррелировало с увеличением содержания IL-10$^+$В-клеток и Breg с фенотипом CD5$^+$CD1d^{hi}CD19$^+$. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии Breg клеток, продуцирующих IL-10, в регуляции (угнетении) иммунного ответа на ТН-2 АГ.

ПРОТЕАСОМЫ ПЕЧЕНИ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ И РАЗВИТИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ТРАНСПЛАНТАТУ

Шарова Н.П.[1], Карпова Я.Д.[1], Божок Г.А.[2], Астахова Т.М.[1], Ерохов П.А.[1], Алабедалькарим Н.М.[2], Устиченко В.Д.[2], Легач Е.И.[2], Люпина Ю.В.[1]

[1] ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия
[2] Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

Введение. Протеасомы, мультисубъединичные протеазы, регулируют многочисленные клеточные процессы, расщепляя или подвергая процессингу компоненты сигнальных путей, транскрипционные факторы и другие белки. Особые формы протеасом млекопитающих, иммунные протеасомы, содержащие протеолитические субъединицы LMP2, LMP10 и/или LMP7, обеспечивают

образование биологически активных пептидов, важных для межклеточных взаимодействий и инициации иммунных реакций. Полноразмерные белки и полипептиды средней длины проникают в протеолитическую камеру протеасом с помощью активаторов PA700 и PA28 соответственно. Разнообразие функций протеасом обусловлено уникальным сочетанием протеолитических субъединиц и активаторов в их структуре. В этой связи большой интерес представляет изучение множественных форм протеасом печени, играющей роль первичного лимфоидного органа в эмбриональный период, обладающей клетками врожденного иммунитета и в то же время обеспечивающей развитие толерантности к пищевым и другим чужеродным антигенам.

Цель и задачи. Изучение изменений в пуле протеасом печени крыс в раннем онтогенезе и развитии толерантности к трансплантату. Исследование экспрессии иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 и активаторов PA700 и PA28 протеасом печени крыс в раннем развитии, а также у половозрелых животных с прижившимся и отторгнутым трансплантатом ткани эндокринных желез соответственно после индукции донор-специфической толерантности (ДСТ) и в ее отсутствие.

Материалы и методы. Протеасомы печени в раннем онтогенезе изучались на крысах Вистар. ДСТ индуцировали у крыс Август введением в портальную вену печени спленоцитов донора – крыс Вистар. Аллотрансплантацию ткани яичников или щитовидной железы проводили под капсулу почки. Экспрессию иммунных субъединиц и активаторов протеасом в экстрактах печени оценивали методом Вестерн-блоттинга. Экспрессию иммунных субъединиц протеасом в клетках печени исследовали методами иммуногистохимии и проточной цитометрии.

Результаты. Обнаружен волнообразный характер экспрессии иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 в раннем развитии печени. Иммунные субъединицы выявляются в печени крысы, начиная с 16-х эмбриональных суток (Э16). На Э18 их число удваивается и существенно снижается через несколько дней после рождения, что связано с присутствием Т- и В-лимфоцитов, обогащенных иммунными протеасомами, в печени в этот период и последующей миграцией их во вторичные лимфоидные органы. К 21-м постнатальным суткам уровень иммунных протеасом в печени снова возрастает за счет повышения их экспрессии в гепатоцитах, что сопровождается увеличением количества молекул MHC класса I. Очевидно, в этот период гепатоциты приобретают способность образовывать антигенные эпитопы для молекул MHC класса I с помощью иммунных протеасом и «показывать» свою дефектность клеткам иммунной системы в случае инфицирования или синтеза мутантных белков. Кроме того, в раннем онтогенезе крыс и у взрослых животных в печени выявляются обогащенные иммунными протеасомами АПК – клетки Купфера и эндотелиальные клетки синусоидов, которые обеспечивают развитие толерантности. В экспериментах по трансплантации ткани эндокринных желез показано, что у животных с индукцией ДСТ и прижившимися трансплантатами значительно увеличивается число мононуклеарных клеток печени, экспрессирующих субъединицу LMP2, но не LMP7, по сравнению с контрольными группами животных. Обнаружено уменьшение уровня активатора PA700 и увеличение уровня активатора PA28 в печени крыс с прижившимся трансплантатом после индукции ДСТ по сравнению с таковыми у контрольных крыс и у животных с отторгнутым трансплантатом.

Заключение. Полученные результаты указывают на то, что иммунные функции печени в раннем онтогенезе и у взрослых животных связаны с иммунными протеасомами, содержащими субъединицы LMP2 и LMP7. Развитие толерантности к трансплантату, очевидно, обеспечивается АПК печени, экспрессирующими иммунные протеасомы с субъединицей LMP2 и активатором PA28. Этот тип иммунных протеасом может служить новым маркером приживления трансплантатов.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 15-04-03494-а и № 16-34-60083-мол_а_дк).

ВЛИЯНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1β НЕЙТРОФИЛАМИ *IN VITRO*

Швыдченко И.Н.[1], Гурьянова С.В.[1, 2], Тамбовцева А.А.[1], Сергеев С.В.[1], Гронская А.С.[1]

[1] Кубанский государственный университет физической культуры, спорта и туризма, Краснодар, Россия
[2] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Нейтрофилы играют важную роль в реакциях острой фазы воспаления и обеспечивают противоинфекционную защиту организма. Кроме того, благодаря своей способности секретировать широкий спектр хемокинов и цитокинов при активации, нейтрофилы вовлечены в регуляцию врожденного и адаптивного иммунного ответа. В настоящее время существуют данные о способности нейтрофилов секретировать цитокины при различных условиях, не связанных с патологией, в частности под воздействием физического стресса, однако механизмы этой секреции недостаточно исследованы, несмотря на то, что физические нагрузки являются повседневным фактором в жизни каждого человека. Катехоламины адреналин и норадреналин, высвобождаясь при физическом стрессе, могут регулировать иммунный и воспалительный ответ, модулировать цитокиновую сеть (Bergmann and Sauther, 2002). Эти эффекты во многом зависят от типа стимулируемого адренорецептора и их локализации. Адренорецепторы были обнаружены на всех иммунных клетках, в том числе и на нейтрофилах (Scanzano and Cosentino, 2015).

Целью настоящей работы было исследование иммуномодулирующего влияния катехоламинов адреналина и норадреналина, а также селективного агониста β-адренорецепторов изопротеренола на продукцию нейтрофилами интерлейкина 1β (IL-1β) *in vitro*. В исследовании приняли участие 20 здоровых добровольцев обоего пола (средний возраст 19,4±0,26 лет). Все участники были полностью информированы о целях исследования и подписали добровольное информированное согласие на участие в нем. Нейтрофилы выделяли на градиенте плотности (1,077) с последующим осаждением эритроцитов декстраном и осмотическим лизисом. Проводили автоматический подсчет выделенных клеток с одновременной оценкой их жизнеспособности (не менее 90-98%) методом эксклюзии трипанового синего. Нейтрофилы ресуспендировали в среде RPMI 1640 с L-глутамином и 25 мМ HEPES с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% пенициллина-стрептомицина; инкубировали при 37 °С в 5% CO_2 20 часов в концентрации 1×10^6 клеток/мл/лунку

в стерильных культуральных 12-луночных планшетах с добавлением 100 мкл Дюльбекко фосфатно-солевого раствора (DPBS) – спонтанная секреция, или 100 мкл различных индукторов: адреналина ((-) –Epinephrine) в конечной концентрации 0,01, 0,1 и 1 мкМ; норадреналина ((-) –Norepinephrine) в конечной концентрации 0,001, 0,1 и 1мкМ; изопротеренола ((plus-minus) – Isoproterenol Hydrochloride) – 0,1 мкМ; селективного антагониста β-адренорецепторов пропранолола (DL-Propranolol) – 1 мкМ, формил пептида (fMLP) – 10 мкМ. Все вещества получены из SIGMA-ALDRICH (Германия). При использовании нескольких веществ их вносили через 30 мин инкубации в следующей последовательности: fMLP-антагонист-агонист. Через 20 ч инкубации клетки осаждали центрифугированием, супернатант отбирали и замораживали (-20 °С) до проведения исследования. Концентрацию IL-1β в супернатанте определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест-наборов, согласно инструкции производителя (ООО «Цитокин», Россия). Чувствительность метода составляла для IL-1β – 6,25 пг/мл. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 7 (StatSoftInc., США). Центральные тенденции и дисперсии количественных признаков описывали медианой и интерквартильным интервалом (Q_1-Q_3). Сравнение групп по количественным признакам проводили с использованием непараметрического W-критерия Вилкоксона для выборок парных измерений. Наблюдаемые различия считались не случайными при $P < 0,05$. Установлено, что адреналин в дозе 0,1 мкМ в 2 раза стимулирует секрецию IL-1β нейтрофилами здоровых доноров (34,10; 19,75-61,60 пг/мл/10^6кл. в сравнении с 15,1; 6,3-24,65 пг/мл/10^6кл. при спонтанной секреции, $P = 0,012$). Норадреналин и изопротеренол не оказывают статистически значимого влияния. Выявлены тенденции к усилению продукции IL-1β нейтрофилами при совместном действии адреналина в дозе 1 мкМ и хемотаксического пептида fMLP ($P = 0,0679$). Этот эффект лишь частично отменяется селективным антагонистом β-адренорецепторов пропранололом, что, наряду с отсутствием влияния изопротеренола, может свидетельствовать о β-адренонезависимом стимулирующем действии адреналина на секрецию IL-1β нейтрофилами.

Работа поддержана РФФИ и Министерством образования и науки Краснодарского края, проект № 16-44-230391р_а.

ПОЛИМОРФИЗМ МОЛЕКУЛЫ H2-A КЛАССА II ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ОПРЕДЕЛЯЕТ ПРОТЕКТИВНЫЙ ОТВЕТ ХОЗЯИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Шепелькова Г.С., Майоров К.Б., Логунова Н.Н., Апт А.С.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Туберкулез (ТБ) – одна из самых распространенных и опасных инфекционных болезней в мире. Показано, что чувствительность к ТБ контролируется многими полиморфными генами. Как профессиональные антиген презентирующие клетки макрофаги экспрессируют на своей мембране молекулы класса II MHC. Ассоциация чувствительности к ТБ с полиморфизмом MHC показана как у мыши, так и у человека. Ранее в нашей лаборатории был идентифицирован один из генов, контролирующий восприимчивость к ТБ – ген H2-Ab1, кодирующий бета-цепь классической молекулы MHC Класса II. Рекомбинантные линии мышей, выведенные в нашей лаборатории и различающиеся только по аллелям этого гена, проявляют различную чувствительность к инфекции. У мышей, несущих аллель от чувствительной родительской линии I/St (H2-Aj), развивается тяжелая патология легких с выраженным воспалением и продукцией большого количества воспалительных цитокинов, в отличие от резистентных к ТБ мышей несущих аллель H2-Ab. Однако роль полиморфизма H2-A молекулы в развитии чувствительности/резистентности к ТБ до сих пор неясна. Неизвестно, зависит ли взаимодействие эффекторных Т лимфоцитов CD4 с инфицированными макрофагами от вариантов аллеля H2-A.

Цель. Определение роли полиморфизма H2-A в формировании протективного ответа хозяина при экспериментальной ТБ инфекции.

Материалы и методы. Макрофаги перитонеального экссудата полученные от линий мышей отличающихся по аллелям гена H2-A: C57BL/6 (B6), несущие аллель H2-Ab, B6.I-9.3.19.8, несущие аллель H2-Aj и гибридов первого поколения F1(B6xB6.I-9.3.19.8) (F1), экспрессирующие оба аллеля гена H2-A. Т-лимфоциты CD4 выделяли из суспензии спленоцитов мышей F1, инфицированных вирулентным штаммом *M. tuberculosis*, методом селекции в магнитном поле. Жизнеспособность микобактерий в смешенных культурах оценивали по избирательному включению последними 5,6-[^{3}H]-урацила. Поверхностный фенотип лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуорометрии. Предрасположенность клеток к апоптозу смотрели по активности каспазы-3 и каспазы-7.

Результаты. Ранее в нашей лаборатории было показано, что активация бактериостатической функции макрофагов Т-лимфоцитами CD4 зависит от молекулы MHC класса II. Для выявления роли H2-A полиморфизма была использована модель активации инфицированных макрофагов с разными аллельными вариантами молекулы H2-A иммунными Т-лимфоцитами CD4. Макрофаги перитонеального экссудата мышей линий B6, B6.I-9.3.19.8 и F1 культивировали в присутствии вирулентного штамма микобактерий с Т-лимфоцитами CD4 мышей F1. Через 72 часа культивирования клеток оценивали активацию макрофагов под действием Т-лимфоцитов по степени подавления роста микобактерий в культурах, содержащих Т-лимфоциты, по сравнению с культурами не содержащими Т-лимфоциты. Т-лимфоциты CD4 усиливали способность B6 (H2-Ab) и F1(H2-AbAj) макрофагов ингибировать рост микобактерий и не влияли на бактериостатическую функцию макрофагов B6.I-9.3.19.8 (H2-Aj), то есть существует доминирование H2-Ab молекулы над молекулой H2-Aj при активации инфицированных макрофагов Т-клетками CD4.

Известно, что молекулы MHC класса II определяют не только презентацию антигенов при развитии адаптивного иммунного ответа, но и важны в селекции Т-клеток $CD4^+$. Определение количества Т-лимфоцитов в лимфоидной ткани показало, что молекула H2-Aj плохо селектирует Т-клетки $CD4^+$. Наличие единственной селектирующей молекулы класса II H2-Aj (линия 9.3.19.8) при-

водит к резкому дефициту клеток $CD4^+$ в лимфоидной ткани, хотя экспрессия единственной молекулы другого аллеля, (H2-Ab у мышей B6) достаточна для поддержания стандартного соотношения CD4:CD8. Также установлено, что CD4 клетки мышей несущих аллель H2-Aj сильнее подвержены апоптозу.

Заключение. Показано преимущество аллеля H2-Ab при активации бактериостатической функции макрофагов иммунными Т-лимфоцитами CD4, а также влияние данного аллеля на селекцию Т-лимфоцитов CD4 и предрасположенность последних к апоптозу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-02002).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИЦИДНОГО ЭФФЕКТА СЕКРЕТОРНЫХ ПРОДУКТОВ НЕЙТРОФИЛОВ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ПОДВЕРГШИХСЯ МОДЕЛИРОВАННОМУ НИЗКОИНТЕНСИВНОМУ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМУ ИЗЛУЧЕНИЮ, В ОТНОШЕНИИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM, BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM, STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI*

Шишкова Ю.С., Даровских С.Н., Вильданова О.Р.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия
ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (Национальный исследовательский университет)», Челябинск, Россия

Введение. Нейтрофильные гранулоциты являются быстрореагирующими клетками на изменение условий внешней среды. В последнее время все чаще обсуждается проблема электромагнитного загрязнения окружающей среды, его негативное влияние на организм человека, и прежде всего на иммунную систему, а также рассматривается позитивная роль космического ЭМИ в сохранении здоровья человечества. До настоящего момента окончательно не ясно, каким образом влияет техногенное ЭМИ (излучение от линий электропередачи, сотовых телефонов, компьютерной техники и т. д.) и космическое (природное) электромагнитное излучение (ЭМИ) на микробицидный потенциал секреторных продуктов.

Цель. Оценить микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному природному и техногенному, в отношении представителей резидентной и факультативной микрофлоры слизистых оболочек тела человека.

Задачи. 1. Оценить микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному электромагнитному излучению, аналогичному техногенному, в отношении *L. plantarum, B. bifidum, S. aureus, E. coli*. 2. Определить микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному природному, в отношении *L. plantarum, B. bifidum, S. aureus, E. coli*.

Материалы и методы. Для получения секреторных продуктов использовали чистую фракцию нейтрофилов, выделенных на двойном градиенте фиколла-урографина из периферической венозной крови условно здоровых доноров (n = 28), предварительно облученных моделированным низкоинтенсивным электромагнитным излучением, генерируемым аппаратом АИМТ-1. Микробицидный эффект секреторных продуктов изучали фотометрическим методом, учет результатов проводили с помощью фотометра Anthos 2020. Результаты были статистически обработаны с помощью компьютерной программы Past_2.17c.

Результаты. В результате проведенных исследований определили, что секреторные продукты интактных нейтрофилов обладали микробицидным эффектом по отношению ко всем тестируемым культурам. Микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному ЭМИ, аналогичному природному и техногенному, оставался стабильным по отношению к грампозитивным микроорганизмам *L. plantarum, B. bifidum, S. aureus.* По отношению к *E. coli* микробоцидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному природному и техногенному, значительно возрастал (табл.).

Заключение. Таким образом, низкоинтенсивное ЭМИ, аналогичное природному и техногенному, повышает бактерицидность секреторных продуктов нейтрофилов по отношению к грамотрицательной микрофлоре и не влияет на антибактериальную способность по отношению к грампозитивной флоре.

ТАБЛИЦА. ПОКАЗАТЕЛИ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ТЕСТИРУЕМОГО ОБРАЗЦА (К ТЕЗИСАМ ШИШКОВОЙ Ю.С. И ДР.)

	Супернатант неактивированных нейтрофилов	Супернатант нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному техногенному	Супернатант нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному природному
1	2	3	4
Lactobacillus plantarum	0,295 (0,259-0,332)	0,282 (0,243-0,322)	0,299 (0,262-0,328)
Bifidobacterium bifidum	0,237 (0,198-0,266)	0,316 (0,253-0,345)	0,259 (0,235-0,285)
Staphylococcus aureus	0,532 (0,408-0,630)	0,591 (0,467-0,653)	0,476 (0,263-0,700)
Escherichia coli	0,334 (0,308-0,373)	0,235 (0,200-0,264) p_{2-3} = 0,00001	0,269 (0,235-0,334) p_{2-4} = 0,0007

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТА ОБЩЕЙ β-РЕЦЕПТОРНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ (βcR) РЕЦЕПТОРА ЭРИТРОПОЭТИНА НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ МЫШЕЙ C57BL/6

Щелчкова Н.А.[1,2], Ермин К.В.[1,2], Логинов П.А.[1], Глявина М.М.[1,2], Жученко М.[3], Мухина И.В.[1,2]

[1] Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, Нижний Новгород, Россия
[2] Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
[3] ООО «Фармапарк», Москва, Россия

Благодаря ряду исследований в области тканепротекции, собрана сумма доказательств, позволяющих рассматривать общую β-рецепторную субъединицу (βcR) рецептора грануляцитарно-макрофагального фактора роста, рецептора интерлейкина-3 и рецептора интерлейкина-5 и мономерную форму рецептора эритропоэтина (EPOR) как части гетеромерного рецепторного комплекса, запускающего каскад молекулярных событий, приводящий к цитопротективным эффектам в ряде тканей. С другой стороны, в разных клеточных типах, экспрессирующих указанные молекулы, сигнальный каскад и его последствия могут различаться. В связи с обнаружением слабой экспрессии EPOR на поверхности лимфоцитов возникает вопрос об участии рецепторного комплекса EPOR-βcR в иммуномодуляторных механизмах.

Цель. Изучить влияние агониста негематопоэтической формы рецептора EPOR (EPOR-βcR) на основе рекомбинантного человеческого эритропоэтина на иммунологические показатели крови мышей линии C57BL/6 в динамике.

Исследования проводились на мышах линии C57BL/6. Мышам пятикратно вводили внутривенно раствор рекомбинантного полипептида «карбамилированный дарбэпоэтин (CdEPO) (ООО«Фармапарк», Россия) в течение 24 ч в дозе 50 мкг/кг. В качестве контрольной группы использовали интактных животных (n = 8). Иммунограммы животных оценивали на 4, 10, 20 дни после введения препарата (n = 5 в каждой точке). Анализ проводили на цитофлюориметре FACS Canto II (BD Biosciences). Гейтирование популяции лимфоцитов проводилось по графику CD45 PerCP/SSC с последующим выделением гейта для NK-клеток ($NK1.1^+$), для В-лимфоцитов ($CD3^-CD19^+$), субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$), субпопуляции активированных В-лимфоцитов ($CD19^+CD25^+$) и активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$) на соответствующих графиках. Данные представлены как арифметические средние значения и стандартная ошибка среднего. Данные представлены как арифметические средние значения и стандартная ошибка среднего. Для оценки статистической значимости различий между контрольной и опытными группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим применением критерия Тьюке и критерия Даннетта. Различия признавались значимыми при $p \le 0,05$.

В ходе исследования на 4-е сутки после введения животным CdEPO отмечалась тенденция роста доли активированных В-лимфоцитов (10,28±1,51%) в общей популяции В-лимфоцитов в крови относительно контрольного значения (5,8±0,57%). Эта тенденция сохранялась в последующих временных точках, на 20 сутки различия становились статистически значимыми (12,28±0,30%; p = 0,0096). Доли NK-клеток (3,65±0,3%) и активированных Т-лимфоцитов (3,24±0,22%) не претерпевали выраженных изменений (контрольные значения 5,85±0,55% и 3,73±0,5% соответственно).

На 10-е сутки было отмечено статистически значимое нарастание показателя пула NK-клеток (10,03±0,90%) и увеличение относительного содержания активированных Т-лимфоцитов (5,36±0,47%) в сравнении с контролем (p = 0,035 и 0,066) и четвёртыми сутками после введения (p = 0,035 и 0,047). Значения обоих показателей сохранялись более высокими и в конечной фазе исследования (20 суток): доля $CD25^+$Т-лимфоцитов (5,16±0,58%) и NK-клеток (9,09±1,77%).

Доля В- и Т-лимфоцитов в лимфоцитарной фракции, соотношение Т-киллеров и Т-хелперов колебались в пределах диапазона статистической значимости.

Таким образом, можно предполагать, что введение специфичного агониста рецепторного комплекса EPOR-βcR мышам линии C57BL/6 вызвало повышение доли NK-клеток в составе общей лимфоцитарной фракции на 10 сутки после введения. Также отмечается рост доли $CD25^+$В-клеток, наиболее выраженный на 20 сутки эксперимента.

Следовательно, стимуляция негематопоэтической гетеромерной формы рецептора эритропоэтина обладает некоторым иммунотропным действием на клеточное звено иммунитета, модальности которого при различных условиях и состояниях организма требуют дальнейшего изучения.

СИСТЕМНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ В ДИНАМИКЕ ФТОРИСТОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ОРГАНИЗМА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Ядыкина Т.К., Михайлова Н.Н., Жукова А.Г., Горохова Л.Г., Казицкая А.С., Бугаева М.С.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний», Новокузнецк, Россия

Алюминиевая промышленность – одна из наиболее перспективных и быстроразвивающихся отраслей цветной металлургии, однако длительное воздействие на организм рабочих соединений фтора в условиях электролитической технологии производства алюминия, несет потенциальную опасность для здоровья, являясь определяющим фактором развития хронической фтористой интоксикации (ХФИ) – профессионального флюороза.

Изменение направленности высокоспецифичных иммунных реакций, обеспечивающих адаптацию организма к длительной нагрузке фторидами, изучено недостаточно. Открытыми остаются системные иммунологические аспекты течения флюороза. Повреждение печени при ХФИ имеет иммуннопосредованный характер, так как фторид-ион не обладает прямым цитопатическим действием на гепатоциты. Иммунное нарушение функциональной активности печени, индуцированное фтором, осуществляется посредством развития неспецифического хронического воспаления, обусловленного изменением иммунного статуса организма. Цель**:** изучить системные проявления механизмов иммунной защиты в динамике экспериментального флюороза.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на белых нелинейных крысах-самцах массой 200 г, разделённых на 2 группы: контроль (n = 20); опыт (n = 40), с ХФИ (свободный доступ крыс к раствору NaF в концентрации 10 мг/л в течение 12 недель). Для изучения иммунного статуса ис-

следовали кровь из хвостовой вены через 1, 3 суток и 1, 3, 6, 9, 12 недель. Стандартными методами определяли: общее число лейкоцитов; цитокинов (TNFα, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10); уровень гаптоглобина (Hp), церулоплазмина (Cp); иммуноглобулинов (Ig) A, M, G; адренокортикотропный гормон (АКТГ). В отдельной серии забирали образцы печени для гистологического анализа тканей. Уровень HSP73 (heat shock protein 73), HOx-2 (heme oxygenase-2) в печени определяли вестерн-блоттингом. Данные обрабатывали в Statistica 6.0.

Результаты. Ранние сроки (1, 3 недели) эксперимента сопровождались активацией клеточного иммунитета (лейкоцитоз на фоне сниженного числа лимфоцитов и увеличенного – моноцитов) с последующим запуском цитокинового каскада (гиперпродукция TNFα на фоне снижения уровня противовоспалительных цитокинов [IL-4, IL-10]). Уровень IL-6, 8 сохранялся в физиологических пределах. Двукратное повышение содержания АКТГ уже на 3-и сутки эксперимента выполняет регулирующую роль в ранней индукции TNFα, повлекшей за собой активацию синтеза Cp в печени, что следует рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на предупреждение «окислительного стресса». Пусковым механизмом, инициирующим формирование процессов клеточной адаптации, является скачок синтеза белка с защитной функцией HSP73 и повышение в 2 раза уровня HOx-2 в печени на фоне гиперфункции ее ретикулоэндотелиальной системы на 1-й неделе. Усиление фагоцитарной функции системы органоспецифических макрофагов – клеток Купфера с 3-й недели, свидетельствовало об активном их участии в организации иммунного ответа. Выявленное утолщение базальной мембраны капилляров, связано с накоплением в ней иммунных комплексов и Ig. Адаптивным признаком гиперфункции на данном сроке также являлось скопление белка в цитоплазме, обусловленное компенсаторной активацией внутридолькового кровотока в печени, о чем свидетельствовало расширение синусоидальных капилляров и увеличение их массы, что обеспечивало лабильность метаболизма клеток печени. На начальной стадии развития ХФИ данные механизмы выступают первой линией защиты организма, что подтверждалось и отсутствием изменений в гуморальном звене иммунитета. Уровень Ig сохранялся в пределах физиологической нормы до 6-й недели. С 6-й недели запускался воспалительный процесс, развитие которого подтверждалось полуторакратным повышением уровня нейтрофилов и индукцией синтеза Il-6 на фоне достоверно высокого значения TNFα, свидетельствуя о развитии системного воспалительного ответа. Снижение иммунной реактивности с 9-й недели подтверждалось достоверным снижением уровня IgA, M, G; лейкопенией на фоне лимфоцитоза, высоким уровнем Hp, доминированием воспалительной реакции и необратимыми деструктивными изменениями в печени, сопровождающимися скоплением лейкоцитов в синусоидах и развитием некроза к 12-й неделе ХФИ.

Заключение. Экспериментальные исследования показали, что начальная (1-3 недели) ответная реакция организма на фтористую агрессию характеризуется компенсаторной реакцией печени, активацией клеточного звена иммунитета, индукцией синтеза цитокинов; защитных белков в гепатоцитах. Шестая неделя сопровождается снижением иммунной реактивности, приобретающей к 9-й неделе патологический характер, протекающий с нарушением баланса между регенерацией гепатоцитов и их локальным воспалением, обусловленным снижением иммунной защиты организма.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАНДАРТНОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА НА НОРМОЦИТЕМИЧЕСКИХ МЫШАХ

Яковлев А.К., Алпатова Н.А., Постнова Е.Л., Симутенко Л.В., Батуашвили Т.А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. За последние два десятилетия препараты рчЭПО использованы более чем у миллиона пациентов, их применение устраняет анемический синдром, уменьшает потребность в гемотрансфузиях, снижает инфекционную заболеваемость, повышает качество жизни. Данные средства входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения». В РФ зарегистрировано 13 препаратов рчЭПО (6 отечественных и 7 зарубежных). Импортозамещение в здравоохранении обострило вопросы повышения эффективности и безопасности лекарств. Отсутствие ОФС на эритропоэтин в ГФ РФ привело к различию в методиках определения качества препаратов у отечественных производителей, так как у препаратов рчЭПО, зарегистрированных в начале 1990-х гг., показатели качества и нормативные требования, отличаются от поступающих на регистрацию в настоящее время. По требованиям ЕФ основной показатель качества – специфическую активность определяют по стимуляции эритропоэза, у мышей линии B6D2F1, подсчитывая количество ретикулоцитов с помощью проточной цитометрии. Рассчитанная активность должна быть не менее 80 и не белее 125 %, доверительный интервал (P = 0,95) – не менее 64 и не более 156%. В РФ определение проводят на линейных и беспородных мышах, подсчитывая ретикулоциты с помощью проточной цитометрии и световой микроскопии. Требования к полученным результатам ограничиваются правильностью без учета их прецизионности, что влияет на точность. Условия, допускающие применение световой микроскопии, необходимы при разработке ОФС рчЭПО, гармонизированной с Европейской фармакопеей. Гармонизация с ЕФ позволит выйти на более высокий уровень контроля качества в соответствии с международными требованиями и повысит эффективность и безопасность лекарственных препаратов рчЭПО при клиническом применении.

Цель. Совершенствование и стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина для включения в ОФС ГФ РФ.

Задачи. 1) стандартизовать лабораторную модель определения активности эритропоэтина; 2) оценить правильность и прецизионность метода при подсчете ретикулоцитов проточной цитометрией и световой микроскопией; 3) изучить возможность гармонизации методик по показателям стандартности ЕФ.

Материалы и методы. Специфическую активность оценивали методом *in vivo* по стимуляции гемопоэза у мышей линий B6D2F1 и Balb/c, и беспородных в ответ на введение им в качестве испытуемого и стандартного образцов независимых разведений биологического референс препарата (BRP batch#3). Подсчет ретикулоцитов проводили на проточном цитофлуориметре (Navios, Beckman Coulter) и световом микроскопе (Axio Scope A1, Carl Zeiss). При выполнении работы учтены требования НД отечественных производителей и Европейской фар-

макопеи. Данные статистически обработаны методом параллельных линий.

Результаты. При статистической обработке методом параллельных линий результатов экспериментов на беспородных мышах, выявлено несоответствие обязательным критериям параллельности и линейности. Результаты на мышах линий B6D2F1 и Balb/c статистически не отличались.

Правильность результатов при подсчете ретикулоцитов методом проточной цитометрии имеет смещение в пределах 1-8 %, световой микроскопии – 4-31%. Прецизионность результатов проточной цитометрии, в 2 раза выше, чем микроскопии. Доверительные интервалы рассчитанной активности, полученной подсчетом световым микроскопом, не соответствовали требованиям ЕФ.

Наличие обратной зависимости между величиной стандартного отклонения результатов и количеством подсчитанных клеток, свидетельствует о возможности повышения правильности и прецизионности результатов микроскопии путем увеличения количество подсчитываемых клеток.

Заключение. 1. Для определения специфической активности эритропоэтинов подходят линейные мыши. 2. Использование проточной цитометрии характеризуется высокой точностью и соответствует требованиям Европейской фармакопеи. Результаты световой иммерсионной микроскопии обладают меньшей точностью и не соответствуют требованиям Европейской Фармакопеи по доверительному интервалу. 3. В случае отсутствия проточного цитометра использование менее точной световой микроскопии требует отработки оптимальных условий (увеличения количества подсчитываемых клеток), что позволит соответствовать требованиям ЕФ, как по величине рассчитанной активности, так и по доверительному интервалу полученных результатов.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОВЕЗИКУЛ МАКРОФАГОВ ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПА

Янковская А.А., Баторов Е.В., Шевела Е.Я.

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

Введение. Макрофаги являются гетерогенной популяцией клеток, и в зависимости от условий активации и функций можно выделить «классические», или провоспалительные, M1 и «альтернативные», или противовоспалительные M2 макрофаги. Исследованиями последних лет продемонстрирована значительная роль микровезикул (Мв) в реализации биологических эффектов различных типов клеток, однако спектр и свойства Мв, продуцируемых различными типами макрофагов и, в частности, M2, которые активно участвуют в процессах иммуномодуляции и репарации, остается неизученным.

Цель. Охарактеризовать Мв, секретируемые M1 и M2 макрофагами.

Материалы и методы. Макрофаги первого и второго типа генерировали из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови доноров при культивировании в присутствии GM-CSF, в условиях нормального и сниженного содержания ростовых факторов сыворотки. Продукцию Мв оценивали в 48-часовых супернатантах M1 и M2 макрофагов, стандартизованных по количеству клеток. Мв получали методом препаративного ступенчатого ультрацентрифугирования, окрашивали моноклональными антителами (CD206, CD11c, HLA-DR, B7H1) и анализировали при помощи проточной цитофлуометрии.

Результаты. M1-специфичные Мв коэкспрессируют характерные для M1 макрофагов маркеры – CD11c и HLA-DR, а также общие с M2 поверхностные структуры – маннозный рецептор (CD206) и коингибиторную молекулу B7H1. В ответ на стимуляцию эндотоксином спектр Мв значимо не изменялся. Среди Мв, продуцируемых M2 макрофагами, обнаруживалось достоверно меньше $CD11c^+$ Мв в сочетании с увеличением относительного количества $CD206^+$ Мв и коэкспрессирующих $HLA\text{-}DR^+$ и $B7H1^+$ Мв. При стимуляции ЛПС спектр также достоверно не менялся.

Заключение. Полученные предварительные результаты могут свидетельствовать о том, что M1 и M2 макрофаги продуцируют – спонтанно и при стимуляции эндотоксином – определенный спектр микровезикул, соответствующий определенному функциональному фенотипу.

КОМПЛЕКСНЫЙ ВАКЦИННЫЙ ПРЕПАРАТ ПРОТИВ ГЕМОФИЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Ястребова Н.Е., Овечко Н.Н., Токарская М.М., Елкина С.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАН, Москва, Россия

В настоящее время не существует вакцины, которая была бы эффективной в защите одновременно от кап-

ТАБЛИЦА. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ МВ В НЕСТИМУЛИРОВАННЫХ И ЛПС-СТИМУЛИРОВАННЫХ 48-ЧАСОВЫХ СУПЕРНАТАНТАХ, СТАНДАРТИЗОВАННЫХ ПО КОЛИЧЕСТВУ M1 И M2 КЛЕТОК (К ТЕЗИСАМ ЯНКОВСКОЙ А.А. И ДР.)

Исследуемый антиген	M1		M2	
	0	ЛПС	0	ЛПС
CD11c	3,38	4,7	1,5*	1,57*
HLA-DR	14,0	28,6	14,1	18,3
CD206	16,7	23,8	23,1*	27,6
B7H1	31,7	30,2	28,9	33,3
HLA-DR+B7H1	25,7	25,8	43,95*	46,4*

Примечание. Представлены медианные значения данных, полученных в четырех экспериментах. * $p_w < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с соответствующими показателями M1 макрофагов.

сульных и бескапсульных штаммов *H. influenzae*. Вместе с тем, распространенность, частота генерализации, тяжесть течения заболеваний и высокая летальность при инфекциях, обусловленных штаммами *H. influenzae*, принадлежащими к разным серотипам, требует разработки именно такого средства специфической профилактики. Известно, что комбинация углеводных составляющих с гликолипидами или гликопротеин-связывающим белком, может усилить захват антигена, гуморальный и клеточный ответы и развитие биологической памяти у взрослых и детей. Вероятно, углеводсодержащие препараты, такие как капсульный полисахарид, липоолигосахарид и препараты, содержащие белки наружной мембраны, а также комбинация некоторых из них, могут служить для создания нового вакцинного препарата, направленного на профилактику гемофильной инфекции, обусловленной как капсульными, так и бескапсульными штаммами *H. influenzae*. В связи с этим целью настоящего исследования явилось получение низкотоксичного препарата с высокой перекрестной активностью.

Объектами исследования являлись полученные из капсульного и бескапсульных штаммов препараты липоолигосахаридов, белоксодержащие препараты, препараты, полученные при смешивании их с капсульным полисахаридом, их иммуногенная и протективная активность.

Нами на основании данных субтипирования, выбран наиболее распространенный в популяции бескапсульный штамм *H. influenzae* – № 45 NTHi. Липоолигосахарид (ЛОС) 45NTHi обладал наиболее выраженной специфической и перекрестной активностью и в дозе 1 мкг защищал от заражения капсульным и бескапсульными штаммами *H. influenzae* 80-100% мышей. Детоксикация солянокислым гидроксиламином позволила уменьшить токсичность исходного препарата ЛОС (LD50 = 0,063 мкг) в 25 раз (LD50 = 1,58 мкг). Кроме того, получен хроматографически очищенный белоксодержащий препарат (БСП-ВЭ-3), содержащий в своем составе известные протективные белки наружной мембраны *H. influenzae* (P_2; P_5; P_6). Препарат содержал более 60% веществ белковой природы, суммарная примесь нуклеиновых кислот и углеводов не превышала 5%, был хроматографически гомогенен. Препарат обладал низкой токсичностью и в дозе 10 мкг/мышь защищал от гибели 50% мышей после заражения вирулентными культурами. Добавление к белковому препарату 1 мкг/мышь ЛОС усиливало перекрестную протективность обоих препаратов (80-100% мышей выживало). При иммунизации мышей смесью препаратов повышался уровень IgG-антител, как к ЛОС, так и к БСП. При этом, уровень IgG-антител к ЛОС был выше, что указывает на сильную стимуляцию гуморального иммунного ответа ЛОС и делает этот антиген более значимым в составе комплексного препарата для профилактики инфекций, обусловленных капсульными и бескапсульными штаммами гемофильной палочки, чем БСП.

Таким образом, препарат, содержащий 10 мкг БСП-ВЭ-3 и 1 мкг ЛОС, обладал перекрестной протективной активностью, защищая 80-100 мышей от заражения летальными дозами капсульного и бескапсульного штаммов *H. influenzae*. Иммунизация мышей приводила к повышению уровня антител и к ЛОС, и к БСП.

ИММУНОГЕНЕТИКА

ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ СИСТЕМЫ HLA ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Гусева В.И.[1], Лапин С.В.[1], Мазинг А.В.[1], Маслянский А.Л.[2], Мячикова В.Ю.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБУ «ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова»» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Предрасположенность к ревматоидному артриту (РА) определяется наличием ряда аллельных генов в локусе HLA-DRB1, при экспрессии которых образуются белки на мембране клеток иммунной системы, содержащие «общий эпитоп» (Shared Epitope [SE]). SE является последовательностью аминокислот QRRAA, находящейся в позиции 70-74 в третьей гипервариабельной области цепи DRβ. Из-за повышенного сродства белков с SE к цитруллиновым антигенам повышается риск развития серопозитивного РА у лиц с генотипом, содержащим аллели HLA-DRB1 *01:01; *04:01; *04:04; *04:05; *04:08.

Цель и задачи. Проанализировать распределение генов системы HLA II класса локуса DRB1 с SE у больных РА с разными клиническими проявлениями. Сравнить встречаемость этих генов в популяции жителей Санкт-Петербурга и Северо-Западного района РФ. Оценить прогностическую роль SE для диагностики РА.

Материалы и методы. Генетические исследования выполняли для двух групп, одна из которых состояла из 72 пациентов, а другая – 1070 человек из контрольной группы. Выявление генов осуществляли с помощью ПЦР в режиме реального времени. ДНК каждого пациента экстрагировали из цельной крови, предварительно забранной в пробирку с ЭДТА.

Результаты. В популяции Северо-Запада России распределение SE-содержащего генотипа составило около 30%. Среди больных РА SE был обнаружен у 67% (48/72), а среди тех, у кого выявили аллели HLA-DRB1*01 и *04, SE был обнаружен у 89,6% (43/48). При этом у 80,5% пациентов с РА были выявлены антитела к циклическому цитруллин-содержащему пептиду.

Заключение. Определение SE может использоваться в комплексной диагностике РА, в том числе для прогнозирования развития серопозитвного РА.

СРАВНЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ТАТАР ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ С ЕВРАЗИЙСКИМИ ПОПУЛЯЦИЯМИ ПО ПОЛИМОРФИЗМУ 745C > T ГЕНА TLR6

Евдокимов А.В., Бурмистрова А.Л.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Введение. Толл-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLRs) универсально распространены среди млекопитающих и отвечают за распознавание молекул микробного происхождения, общих для разных групп микроорганизмов. В результате этого распознавания инициируются механизмы врожденного иммунного ответа. Полногеномные исследования выявили большое количество точковых полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNPs), расположенных в области генов TLRs. Некоторые из этих SNPs демонстрировали значимые отличия по частоте встречаемости в различных человеческих популяциях. К таким SNPs относится точковая замена 745C > T в гене TLR6: аллель с заменой (745*T) с более высокой частотой (около 50%) встречается в европейских популяциях, в то время как в азиатских популяциях практически не встречается. Функциональные исследования этого полиморфизма выявили связь между аллелем 745*T и снижением уровня активации TLR6. Высокую частоту этого аллеля в европеоидных популяциях связывают с адаптивными преимуществами в условиях частых эпидемий в Европе. Уральский регион представляет собой интересную территорию для популяционно-генетических исследований: это перекресток миграционных путей из Азии и Европы. На этой территории проживают популяции самого различного происхождения, одной из самых многочисленных являются татары.

Цель. Сравнить популяцию татар Челябинской области по частоте встречаемости аллелей и генотипов по точковому полиморфизму 745C > T гена толл-подобного рецептора 6 (TLR6) с популяциями Евразии. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Выполнить генотипирование исследуемой группы татар Челябинской области по SNP 745C > T гена TLR6.

2. С помощью многомерных методов определить положение татар среди некоторых евразийских популяций по аллелям и генотипам 745C > T гена TLR6.

Материалы и методы. Исследуемая группа татар (124 человека) отобрана из числа потенциальных доноров стволовой клетки, проживающих на территории Челябинской области. Этническая принадлежность определялась на основании генеалогического анамнеза в трех поколениях. Геномная ДНК выделена из венозной крови реагентами Axygen (Quiagen, Германия), с полученными образцами ДНК проведена полимеразная цепная реакция с использованием набора реагентов фирмы НПФ «Литех» (Москва)

с электрофоретической детекцией в 3% агарозном геле. Информация о частотах встречаемости аллелей и генотипов по указанному полиморфизму в некоторых евразийских популяциях была получена из открытой базы данных ALFRED. Были использованы данные для 5 европейских популяций (тосканцы, иберийцы Испании, смешанная популяция европейцев Северо-Запада Европы, британцы, финны) и 6 азиатских популяций (китайцы хань из Пекина, китайцы дай, бенгальцы, пенджабцы, гуджаратцы, корейцы, вьетнамцы). Для определения положения татар среди популяций Евразии были использованы многомерные методы: кластерный анализ и анализ главных компонент.

Результаты. Частота встречаемости аллеля с заменой 745*T среди татар составила 28%, что в среднем в 1,5 раза ниже по сравнению с европейскими популяциями, но более чем в 10 раз превышает аналогичные значения для популяций Азии. Преобладающими генотипами у татар являются гомозиготы по аллелю 745*C и гетерозиготы (52 и 40% соответственно), гомозиготы по аллелю 745*T встречались редко (8%). Применение кластерного анализа позволило выделить 2 кластера популяций: азиатского и европейского происхождения. В последнюю группу вошла популяция татар. Согласно анализу главных компонент, формирование «европейского» кластера обусловлено увеличением доли аллеля с заменой 745*T и определяемых им генотипов (745*CT и 745*TT). Популяция татар располагается в «европейском» кластере рядом с популяциями тосканцев и иберийцев, на границе с «азиатским» кластером.

Заключение. Популяция татар Челябинской области по частотам встречаемости аллелей и генотипов, определяемых полиморфизмом 745C > T, наиболее сходна с европейскими популяциями, особенно южного происхождения (тосканцы и иберийцы). В то же время среди европейских популяций татары занимают положение, близкое к южно-азиатским популяциям (гуджаратцы). Подобное положение татар связано со сложной историей формирования этой популяции, включавшей миграцию тюркских народов с Востока на территорию Европы, где происходило несколько раундов натурального отбора в ходе эпидемий инфекционных заболеваний, в результате чего доля аллеля 745*T и определяемого им генотипов в популяции увеличилась.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ПО ГЕНАМ КОМПЛЕКСА *H2* КЛАССА II НА СЕЛЕКЦИЮ И АКТИВАЦИЮ Т-ЛИМФОЦИТОВ CD4 В НОРМЕ И ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Логунова Н.Н., Капина М.А. Рубакова Э.И., Апт А.С.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Генетический контроль ответа хозяина на *M. tuberculosis* носит полигенный характер. Ранее в нашей лаборатории был идентифицирован один из генов контролирующих чувствительность к туберкулезной инфекции (ТБ) у мышей, классический ген Класса II H2-Ab1, кодирующий бета-цепь димера H2-A. Молекулы Класса II критически важны для развития и дифференцировки Т-клеток $CD4^+$, причем как эффекторных, так и регуляторных. Эффективность иммунного ответа при ТБ во многом зависит от сбалансированности работы этих элементов ответа, поскольку избыточная супрессорная активность препятствует достижению необходимого уровня иммунологической защиты, а избыточная пролиферация и выработка цитокинов эффекторами повреждает ткани.

В данной работе мы исследовали роль полиморфизма по молекуле H2-A в образовании и регуляции клеток Teff ($CD4^+FoxP3^-$) и Treg ($CD4^+FoxP3^+$) в норме и при ТБ, используя линии мышей B6 ($H2\text{-}A^bE^0$, устойчивая к ТБ), I/St ($H2\text{-}A^iE^j$, чувствительная к ТБ) и полученную нами рекомбинантную конгенную B6.I-9.3.19.8 ($H2\text{-}A^jE^0$, промежуточная чувствительность к ТБ), несущую сегмент комплекса H2 17Ch: 34,18-34,34Mb от I/St на генетической основе B6. Изучение распределения Teff и Treg в периферических лимфоидных органах показало, что соотношение Teff:Treg зависит от линии мышей: доля Treg от всех клеток $CD4^+$ у B6 составляет 14±0,3%; у I/St – 7,7±1,3% и у B6.I-9.3.19.8 – 19,4±0,2%. В отличие от B6, клетки Teff у I/St и B6.I-9.3.19.8 имеют активированный фенотип до заражения: в селезенке увеличен процент клеток, экспрессирующих активационный поверхностный антиген CD69: B6 = 5,5±1,0%, B6.I-9.3.19.8 = 7,3±1,4% и I/St 8,1±0,9%, а также $CD44^+CD62L^-$: 26,5±1,8; 38,1±4,0 и 33,3±3,1 соответственно. Более высокий уровень активации характерен и для Treg, среди которых не только процент клеток $CD44^+CD62L^-$ выше у мышей I/St и B6.I-9.3.19.8, но и сам уровень экспрессии CD44 выше (средняя интенсивность свечения, MFI: B6 = 215±17, B6.I-9.3.19.8 = 305,3±18 и I/St = 311,3±11). Аналогичные показатели в норме обнаружены в легких, где получены следующие показатели по маркеру CTLA-4: MFI для Teff B6 = 9,2±0,8, B6.I-9.3.19.8 = 15,3±4,0 и I/St = 12,6±1,3 и для Treg, соответственно, 47,5±12,2; 73,7±16,5 и 107±4,4. Заражение ТБ приводило к более тяжелому течению заболевания у чувствительных линий, несмотря на то что активация Teff и Treg была выражена у них значительно сильнее, чем у B6. При этом, несмотря на дифференцировку большого количества клеток $CD4^+$ в хелперы Th1 во всех линиях мышей, количество клеток, продуцирующих IFNγ в ответ на антигены микобактерий, было достоверно ниже у мышей I/St (3,7±1,0) и B6.I-9.3.19.8 (3,9±1,2) по сравнению с B6 (5,9±1,0). Более того, «удельная активность» продукции IFNγ была выше у клеток B6 (MFI = 77,9±4,9 против 53,9±4,5 и 59,6±1,3).

Наши данные свидетельствуют, что аллельный вариант $H2\text{-}A^j$ при селекции или дифференцировке приводит к недостаточности Treg звена иммунитета у чувствительных линий мышей, что выражается чрезмерной неспецифической активацией CD4 Teff клеток и препятствует образованию протективного адаптивного иммунитета при ТБ.

ВЫЯВЛЕНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЦЕЛИАКИИ ПРИ РАЗНЫХ ГЕНОТИПАХ

Малкова А.М., Будкова А.И.

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Целиакия – хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся поражением эпителия тонкой кишки в результате иммунного ответа организма на дезаминированный глиадин. Согласно рекомендациям ESPGHAN 2012 диагноз целиакия подтверждается с помощью серологической диагностики специфичных антител, гистологического исследования тонкой кишки, выявления HLA DQ2/DQ8 генотипов.

Цель. Определить достоверность встречаемости серологических маркеров целиакии при разных генотипах.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовались образцы венозной крови 105 обследуемых лиц. Антитела к человеческой тканевой трансглутаминазе 2 типа и дезаминированному пептиду глиадину IgG определялись методом ИФА, антитела к эндомизию IgA методом нРИФ.

Для определения генотипа HLA DQ2/DQ8 обследуемых применялся метод ПЦР real time.

Результаты. Из 105 обследуемых у 56% (59/105) были выявлены специфичные для целиакии HLA-DQ генотипы. Среди них преобладают аллельные формы HLA-DQ2.5; HLA-DQ2.2 – 25% (13/59). Частота генотипа HLA-DQ2.5, как и HLA-DQ8 составила 23,1% (12/59), HLA-DQ8;HLA-DQ2.2 9,6% (5/59). Повышенные титры специфичных антител чаще всего наблюдаются при генотипе HLA-DQ2.5 – 25% (3/12).

Достоверно встречаемость повышенных титров специфичных антител выше у лиц с положительным генотипом.

Заключение. Исследование показало, что наиболее часто встречаемыми генотипами среди обследуемых являются аллельные формы HLA-DQ2.5; HLA-DQ2.2, HLA-DQ8 и HLA-DQ2.5. При этом у лиц с генотипом HLA-DQ2.5 серологические маркеры целиакии выявляются чаще всего.

Поскольку была выявлена статистически значимая разница при анализе результатов серологической диагностики на антитела к тканевой трансглютаминазе, эндомизию и генотипированию, можно говорить об оправданности использования тестов на выявление повышенных титров именно этих антител для диагностики целиакии.

ЭТНИЧЕСКИ АССОЦИИРОВАННЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА ВЫСОКОГО УРОВНЯ МЛАДЕНЧЕСКОЙ СМЕРТНОСТИ У ДЕТЕЙ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ КРАЙНЕГО СЕВЕРА: ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ (MBL2, FCN2) К ИНФЕКЦИОННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

Смольникова М.В., Епанешникова В.Б., Терещенко С.Ю.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Младенческая смертность детей коренного населения северных регионов остается крайне высокой, несмотря на значительные положительные изменения в организации медицинской помощи и финансовые вложения. Такая ситуация характерна не только для России, но и для других стран арктического присутствия. В последние годы показаны генетически обусловленные особенности метаболизма и иммунного реагирования у детей коренного населения северных территорий, которые могут способствовать тяжелому течению распространенных инфекционных заболеваний, с повышенным риском летального исхода.

Маннозосвязывающий лектин – острофазовый белок, относящийся к системе врожденного иммунитета и активно участвующий в элиминации широкого круга патогенных микроорганизмов посредством активации системы комплемента. Значительная часть человеческой популяции имеет врожденно низкий уровень продукции и/или низкую функциональную активность MBL вследствие носительства различных вариантов гена MBL2, что потенциально увеличивает предрасположенность к более тяжелому течению инфекционных заболеваний. Фиколины – лектин-распознающие молекулы, структурно и функционально гомологичные MBL.

Цель. Выявить генотипы MBL2 и FCN2, предрасполагающие к тяжелому течению бактериальных инфекций в различных этнических популяциях новорожденных коренных национальностей Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края.

Материалы и методы. Использованы 586 проб сухой капли крови новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и г. Красноярска из банка КГУЗ «Красноярский краевой консультативно-диагностический центр медицинской генетики». Этнический состав групп: 1) 126 новорожденных с преимущественно ненецким населением; 2) 90 детей с преимущественным долгано-нганасанским населением; 3) 167 новорожденных из арктических поселков; 4) 203 новорожденных г. Красноярска, преимущественно европеоиды.

Для выделения ДНК использован набор DIAtomTM DNA Prep («Центр молекулярной генетики», Москва). Генотипирование аллельных вариантов генов MBL2 (rs11800451 и rs1800450) и FCN2 (rs17549193 и rs7851696) осуществлено с помощью ПДРФ-анализа с дальнейшей визуализацией в у/ф свете.

Результаты. Редкий аллель гена MBL2 (rs1800451) выявлен только у одного новорожденного в популяции г. Красноярска (генотип CC), во всех остальных образцах ДНК был установлен генотип AA. Крайне редкая встречаемость аллеля C (1 гомозигота на 582 обследованных, частота 0,0034) описана впервые для различных Российских популяций: коренных жителей арктических регионов и европеоидов.

В обеих популяциях коренных жителей Арктики статистически значимо реже, чем в европеоидной популяции г. Красноярска, встречался вариантный аллель B (rs1800450), ассоциированный с дефектной структурой протеина MBL2. Частота гомозиготного генотипа BB у новорожденных ненцев составила 1,6% (OR = 0,13, CI = 0,03-0,58, p = 0,002 в сравнении с европеоидами), долган-нганосан – 1,1% (OR = 0,09, CI = 0,01-0,69, p = 0,004 в сравнении с европеоидами), смешанной арктической популяции – 6,1%, а у европеоидов г. Красноярска – 10,9%. Т.е. популяции арктических регионов России (ненцы и долгане-нганосане) обладают генотипом, ассоциированным с высоким уровнем активности MBL2 – важнейшего фактора неспецифической противоинфекционной защиты.

Описано, что для мутации rs17549193 гена FCN2 наличие вариантного аллеля T (генотипы CT и TT) сопряжено с низкой авидностью фиколина к патогенам. Нами установлено, что в популяциях арктических регионов значительно реже встречается вариантный аллель T в гетерозиготном состоянии (генотип CT). В популяции ненцев значительно реже встречается «неблагоприятный» аллель T в гомозиготном состоянии. Эта тенденция верна как при сравнении ненцев с долгано-нганасанами (OR = 0,23, CI = 0,05-1,2, p = 0,05), так и с европеоидами г. Красноярска (OR = 0,16, CI = 0,04-0,07, p = 0,005). Частота аллеля T в ненецкой популяции была статистически значимо ниже в сравнении с долгано-нганасанской и европеоидной популяциями. Мы предполагаем, что такой генотип, характерный для ненецкой

популяции (но не для долгано-нганасанской и смешанной популяций) является генетическим маркером высокой функциональной активностью L-фиколина в этой этнической группе.

СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ К АНТИГЕНАМ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ЯБЛОКА У ЛИЦ ВЗРОСЛОГО ВОЗРАСТА

Ткаченко К.Е., Прилуцкий А.С.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, Донецкая Народная Республика

Введение. Распространенность аллергических заболеваний стремительно возрастает во всем мире, и уже сейчас есть все основания говорить об аллергии, как о пандемии XXI века. Особое место среди прочих разновидностей аллергии, безусловно, занимает аллергия алиментарного генеза, которой подвержены абсолютно все возрастные категории и социальные слои населения. Развитие множества аллергических реакций, провоцируемых пищевыми аллергенами, как более легких, таких как оральный аллергический синдром, аллергический дерматит и крапивница, так и тяжелых системных анафилактических, существенно снижает качество и может представлять угрозу жизни таких пациентов. Именно поэтому чрезвычайно важна качественная диагностика пищевой сенсибилизации, на основании которой и будет осуществляться подбор соответствующей диеты. В нашем обществе яблоко принято относить к гипоаллергенным продуктам, в связи с чем, яблоко является фруктом, пожалуй, наиболее часто включаемым в пищевой рацион аллергиков. Вместе с тем, по данным ряда исследований специфическая сенсибилизация к антигенам яблока является одной из наиболее частых среди лиц, страдающих пищевой аллергией к фруктам. Известно, что различные сорта яблока обладают разным аллергенным потенциалом. Однако в отечественной литературе отсутствуют данные о подобных исследованиях, а в зарубежной они единичны и не включают сорта яблока доступные нашему потребителю.

Цель и задачи. Целью данной работы явилось изучение особенностей сенсибилизации к различным сортам яблока у лиц взрослого возраста, имеющих проявления пищевой аллергии на момент осмотра или в анамнезе.

Материалы и методы. Нами исследованы сыворотки крови 90 пациентов, в возрасте от 18-ти лет, средний возраст обследуемых составил 32±1,8года. Пациенты предъявляли жалобы на частое развитие различных аллергических реакций алиментарного характера, проявляющихся преимущественно кожным синдромом. У всех обследованных проводилось определение уровней специфических IgE-антител (sIgE) к 8-ми различным сортам яблока, которые были условно поделены на две группы: без красного пигмента в окраске – зеленые и желтые (Антоновка, Симиренко, Снежный кальвиль, Голден), и, имеющие в окрасе преимущественно красный пигмент (Айдаред, Джонатан, Чемпион, Лиголь). Лабораторное тестирование выполнялось с помощью тест-систем для иммуноферментного анализа отечественного производства (г. Донецк), с аналитической чувствительностью 0,05 – 0,075 МЕ/мл. Статистический анализ полученных данных проводился с помощью лицензионной программы «MedStat». Выполнена оценка характера распределений показателей на нормальность, и, учитывая отличие их от нормального, были рассчитаны следующие показатели: медиана, ошибка медианы (M±m); 95% доверительный интервал (ДИ). Также было проведено сравнение центральных тенденций двух независимых выборок с помощью W-критерия Вилкоксона, направленное на выявление различий в уровнях sIgE к разным сортам яблока. Выполнены сравнения частот сенсибилизации к антигенам различных сортов яблока с использованием критерия χ-квадрат. Сенсибилизированными считались лица с уровнями sIgE ≥ 0,35МЕ/мл.

Результаты. В ходе проведенного исследования было установлено, что средние значения показателей sIgE-антител для различных сортов яблока у обследованных пациентов были следующими: для группы сортов Антоновка, Симиренко, Снежный кальвиль, Голден – 0,21±0,04 МЕ/мл (0,19; 0,22); для группы сортов Айдаред, Джонатан, Чемпион, Лиголь – 0,285±0,03 МЕ/мл (0,28; 0,29). Сравнение центральных тенденций двух данных выборок с помощью W-критерия Вилкоксона (двусторонняя критическая область) продемонстрировало статистически достоверное отличие центральных тенденций на уровне значимости $p < 0,001$. Проведенный анализ частоты сенсибилизации выявил наличие достоверных различий в частоте сенсибилизации к антигенам различных сортов яблока ($p = 0,004$), при этом частота сенсибилизации к сортам яблока, не имеющим, и, имеющим красный пигмент в окрасе составила 3,9±1,0% и 9,4±1,5% соответственно.

Заключение. Таким образом, установлено, что среди лиц взрослого возраста с анамнезом пищевой аллергии частота специфической сенсибилизации к «зеленым и желтым» сортам яблока достоверно ниже, чем к «красным», $p = 0,004$. Выявлены достоверные различия в уровнях сенсибилизации к различным сортам яблока, $p < 0,001$, с более высокими показателями sIgE к антигенам сортов с красным пигментом в окрасе. Результаты исследования демонстрируют целесообразность и перспективность использования для диагностики специфической сенсибилизации к яблоку тест-систем для иммуноферментного анализа отечественного производства.

ВКЛАД МАТЕРИНСКИХ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ *HLA-DRB1** И *HLA-G 3'UTR* В РАЗВИТИЕ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА

Цепокина А.В.[1], Шабалдин А.В.[1], Понасенко А.В.[1], Шабалдина Е.В.[2]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия
[2] ГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Кемерово, Россия

Введение. Известно, что индукция тератогенеза, приводящего к ВПС, может быть обусловлена и не эффективной иммунной защитой эмбриона материнским микроокружением. *HLA-DRB1** относят к гену иммунного ответа, аллели которого ассоциированы как с особенностями иммунного реагирования на различные антигены, так и с иммунопатологическими заболеваниями.

Важное значение в формировании иммунной толерантности эмбриона имеет белок HLA-G, кодируемый соответствующим геном. Нарушения в иммунном процессе формирования беременности проявляется не только в репродуктивных потерях, но и в формировании

врожденных пороков и аномалий развития плода, в том числе и ВПС.

Локус HLA, расположенный на 6 хромосоме, компактен, и для некоторых гаплотипов, захватывающих аллели HLA I и HLA II, показано стойкое наследование из поколения в поколение.

Исходя из этого **целью** настоящего исследования явилось изучение распределение частоты встречаемости аллелей и генотипов *HLA-DRB1** и *HLA-G 3'UTR* у женщин, имеющих детей с различными вариантами врожденных пороков сердца.

Материалы и методы. Образцами для исследования послужили 103 образца геномной ДНК. Донорами ДНК являлись 103 женщины, биологические матери детей с различными ВПС. Выделено четыре группы сравнения, в зависимости от наличия у ребенка типа ВПС, согласно международной классификации, где учитываются первичные морфофункциональные нарушения в сердце и крупных сосудах. 1 группа – стенотические или обструктивные пороки левых отделов сердца (n = 16). 2 группа – стенотические или обструктивные пороки правых отделов сердца (n = 21). 3 группа – шунтовые пороки с перегрузкой правого желудочка (n = 23). 4 группа – шунтовые пороки с перегрузкой левого желудочка (n = 43). Геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование *HLA-G 3'UTR* проводили методом ПЦР с детекцией результатов в 3% агарозном геле. Анализ *HLA-DRB*1* проводили методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 10.0.

Результаты. Определено, что распределение частоты генотипов *HLA-DRB1* и HLA-G 3'UTR* по всей выборке не имело статистически значимых отличий от ожидаемых частот, рассчитанных в уравнении Харди–Вайнберга. Анализ по всей выборке показал, что частоты встречаемости аллелей *HLA-DRB1** среди женщин, имеющих аллель *HLA-G* 'UTR 14-bp ins и аллель *HLA-G* 3'UTR 14-bp del, не имели статистически значимых различий. Аналогичная закономерность выявлена и при сравнении частот аллелей *HLA-DRB1** среди женщин с тремя возможными генотипами *HLA-G* 3'UTR. Эти данные указывают на отсутствие гаплотипической связи между аллелями *HLA-G* 3'UTR и *HLA-DRB1**. Распределение частот аллелей и генотипов *HLA-DRB1** у женщин четырех групп, выделенных по форме ВПС детей, не имело статистически значимых различий. В то же время при анализе частот генотипов *HLA-G* 3'UTR выявлено, что у женщин первой группы статистически значимо чаще встречался гетерозиготный генотип 14-bp ins/14-bp del *HLA-G* 3'UTR (83,3 против 48,7%, ОШ = 4,41; 95% ДИ = 1,81-10,70). По результатам регрессионного анализа, с включением всех аллелей и генотипов *HLA-DRB1* и HLA-G 3'UTR,* определено, что для первой группы имеется единственный предиктор – аллель *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins (Beta = 0,27, p = 0,01). Для четвертой группы выявлен аллель, обладающий протективным эффектом в отношении снижения риска формирования шунтовых пороков с перегрузкой левого желудочка у детей – *HLA-G* 'UTR 14-bp del (Beta = -0,23, p = 0,03).

Таким образом, формирование стенотических или обструктивных врожденных пороков левого отдела сердца ассоциировано с материнским аллелем *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins и генотипом 14-bp ins/14-bp del HLA-G 3'UTR.

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

РЕЦЕПТОРНАЯ ФУНКЦИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ У ДЕТЕЙ, ОСЛОЖНЕННОМ КАНДИДОЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Агафонова Е.В., Велижинская Т.А.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия
ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Россия

В формировании атопического дерматита (АД) у детей ключевая роль принадлежит аллергическому воспалению с вовлечением в процесс различных иммунокомпетентных клеток. Иммунными нарушениями определяется не только тяжесть АД, но и формирование осложненных форм, в частности связанных с персистенцией грибковых патогенов. Исследования, направленные на функциональное зондирование нейтрофильных гранулоцитов (N), актуальны как в связи с расширением наших представлений о роли данных клеток в патогенезе атопических заболеваний, а также в аспекте определения наиболее значимых диагностических и прогностических критериев формирования осложненных форм патологии.

Материалы и методы. В исследование было включено 66 детей в возрасте от 3 до 15 лет с АД, осложненным формированием кандидоза (АДК). Диагноз АтД был установлен в соответствии с существующими международными критериями для детей. Диагностика К включала культуральные микологические исследования и наличие повышенного уровня маннанового антигена *Candida albicans* (МА; метод иммуносенсоров) в сыворотке крови. В контроле обследована группа здоровых детей (сопоставимые по возрасту, N = 26).Рецепторы на N оценивались методом ПЦФ (Becton Dickinson, США). Исследовали экспрессию рецепторов адгезии (CD11b, CD62L), цитолиза ($CD16^+$), проапоптотического ($CD95^+$), гистосовместимости II класса (HLADR). Статистическая обработка была проведена при помощи пакета программ Microsoft Office Excel (Microsoft, 2007). Достоверность различий определялась посредством U-критерия Манна–Уитни и критерия Пирсона (χ^2). Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При АДМИ имело место снижение содержания N ($1,82 \times 10^9$/л; $p < 0,05$), $CD62L^+$ (20,8 %; $p < 0,001$), а также $CD11b^+$ (19,2%; $p < 0,05$)N. CD62L, $CD11b^+$рецепторы принимают участие в хемотаксисе и фагоцитозе, индукции респираторного взрыва, адгезии N к сосудистой стенке. Субпопуляция N, экспрессирующая рецептор цитолиза ($CD16^+$) достоверно снижалась (5,51%; $p < 0,05$), более низкие значения отмечены для абсолютных показателей ($0,06 \times 10^9$/л; $p < 0,001$). CD16 является субъединицей низкоаффинного Fc рецептора N, в работах последних лет показано, что МА Candida albicans затрудняет адгезию грибов к фагоцитам, которая обеспечивается через рецепторы к Fc фрагменту антител и рецепторам к комплементу. Выявлены корреляции МА-$CD11b^+$ % ($r = -0,56, p < 0,05$), МА-$CD62L^+$ % ($r = -0,66, p < 0,05$). Выявлено повышение $CD95^+N$ (49,5% $p < 0,001$). Экспрессия CD95 на N может быть обусловлена повышенным уровнем противовоспалительных цитокинов (IL-8, IL-6, IFNγ и др.), которые индуцируются под влиянием антигенов и метаболитов грибов рода *Candida*. Выявлена корреляция $CD95^+$N-МА ($r = -0,56$; $p < 0,05$), по-видимому, усиление экспрессии проапоптотического рецептора определяется нарастанием антигенной нагрузки за счет циркуляции МА. Выявлено повышение $HLADR^+N$ (9,5%; $p < 0,001$) и корреляции между абсолютным содержанием N, количеством $CD95^+N$ ($r = -0,86$, $p < 0,05$) и $HLADR^+N$ ($r = -0,56$, $p < 0,05$). Показано, что избыточная экспрессия HLA-DR-антигенов, стимулируя апоптоз N, способствует истощению популяции N и определяет формирование гранулоцитопении. При АДК имела место трансформация фенотипа N, индуцируемая МА, что определяет депрессию фагоцитарной и микробицидной активности, формируя «мобилизационный стаз» N. Циркуляция МА, способствуя повышению экспрессии антигенов гистосовместимости второго класса, индуцирует апоптоз и формирует снижение абсолютного содержания N при АДК. Таким образом, выявлено, что снижение экспрессии рецепторов нарушает фагоцитоз, предотвращая поглощение патогенов, в том числе и захват грибковой клетки, что подтверждают концепцию о «мобилизационном стазе» N при кандидозной инвазии.

ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ЭБВ И ЦМВ ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Воронцова И.М.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ярославль, Россия

Введение. Частые респираторные инфекции (до 6-10 в год) у детей воспринимаются большинством специалистов как норма адаптации, что ведет к назначению лишь симптоматического лечения. Однако воспалительный процесс нарушает целостность естественных барьеров и может облегчить проникновение аллергенов в организм, способствуя сенсибилизации пациентов.

Цель и задачи. Выяснить частоту инфицированности вирусами группы герпес и наличия аллергического заболевания в группе часто болеющих детей. Обосновать необходимость противовирусного и иммуномодулирующего лечения данной группы пациентов.

Материалы и методы. 44 детям в возрасте 1,5-10 лет с частыми респираторными инфекциями проведено физикальное, лабораторное обследование, в том числе определение антител к раннему, капсидному и ядерному антигенам вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) и IgM, IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ), аллерготестирование. Всем пациентам проведено противовоспалительное лечение топическими глюкокортикостероидами (тГКС), противовирусная и иммуномодулирующая терапия. Повторное обследование проводилось спустя 3 месяца после первичного обращения.

Результаты. Ведущей жалобой при обращении был сухой надсадный кашель, особенно в вечернее и ночное время при нахождении в горизонтальном положении. При физикальном обследовании затруднение носового дыхания отмечено в 79,5% случаев, увеличение шейных лимфоузлов – в 90,1%, стекание слизи по задней стенке глотки – в 45%. Диагноз хронического аденоидита 2-3 степени был выставлен ЛОР-врачом 22 пациентам (50%). В 54,5% случаев выявлено инфицирование вирусами герпес-группы, при этом IgG к ядерному и/или капсидному антигенам ВЭБ выявлено в 18%, IgG к ЦМВ в 15,9%, сочетанное инфицирование ЭБВ и ЦМВ в 15,9%, сочетание последних с другими вирусами герпес-группы (зостер и простой) – у 2 (4,5%) пациентов. Анемия выявлена в 15,9%, паразитарная инвазия в 11% случаев. Диагноз аллергического ринита или аллергического риноконъюнктивита и/или бронхиальной астмы выставлен 11 пациентам (25%). Большинство из них было сенсибилизировано к бытовым аллергенам, часть – к бытовым и эпидермальным или пыльцевым аллергенам. У 1 пациентки ранее проведенная аденотомия без сопутствующего лечения привела к рецидиву спустя 4 месяца после вмешательства. 100% пациентов-атопиков имело одну или несколько герпес-вирусных инфекций.

Проведение комплексного лечения, включающего противовоспалительную терапию (тГКС), противовирусные препараты и лизаты бактерий, оказалось клинически эффективным: сухой надсадный кашель вследствие рефлекторного раздражения рецепторов носоглотки исчез, резко снизилось число случаев респираторных инфекций у детей, отмечена положительная динамика состояния ЛОР-органов.

Заключение. Обследование часто болеющих детей выявляет их инфицированность ВЭБ и ЦМВ. Сочетание инфицирования с аллергопатологией у четвери обследованных пациентов создает предпосылки к хронизации воспаления – с одной стороны и расширению спектра сенсибилизации – с другой. Своевременно проведенное лечение уменьшает вирусную нагрузку и воспаление, улучшает состояние естественных барьеров, что предотвращает проникновение аллергенов в организм через поврежденные слизистые. Применение бактериальных лизатов активирует механизмы врожденного иммунитета, повышая резистентность организма к рекуррентным респираторным инфекциям.

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НА АЛЬТЕРНАРИОЛ, ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИТ *ALTERNARIA ALTERNATA*, У ЛИЦ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ АЛЛЕРГЕНАМИ ПЛЕСНЕВОГО ГРИБА

Гальвидис И.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Первое описание симптомов аллергии, вызываемой плесневым грибом *Alternaria alternate* (АА), относится к 1698 году. И только в середине прошлого века наличие спор и мицелия этого гриба в окружающей среде стали связывать со случаями аллергической астмы. В настоящее время сенсибилизация аллергенами АА чрезвычайно распространена, а обострения бронхиальной астмы и аллергического ринита связывают с ростом гриба в сырых помещениях, благоприятствующих развитию плесени. Зарубежными исследователями обнаружено 16 аллергенов альтернарии, в основном представленных ферментами, на некоторые получены рекомбинантные аналоги, функции других еще неизвестны (I. Kustrzeba-Wójcicka, 2014). Стандартов для иммунохимической диагностики аллергических реакций на АА пока не существует. В тоже время появляются спорные публикации об обнаружении микотоксинов плесневых грибов в моче пациентов с хроническими заболеваниями, живущих в домах с повышенной влажностью (Hooper D., 2013). Альтернариол (АОЛ) – микотоксин, вторичный метаболит АА, может накапливаться в субстратах пораженных плесневым грибом и при низких температурах, при транспортировке и хранении урожая зерна, овощей и фруктов. АОЛ обладает высоким гено- и цитотоксическим действием, однако его содержание в продуктах питания не регламентировано и соответственно не контролируется (Solhaug A., 2016). Это низкомолекулярное соединение [272 Da] при попадании в организм не может индуцировать выработку антител. Тем не менее, нельзя исключать, что под действием экзогенных или эндогенных ферментов возможна конъюгация АОЛ с белками организма, что может вызвать иммунную реакцию. Участие АОЛ в развитии аллергических заболеваний спорно (S. Grover, 2015) и требует дальнейших исследований.

Цель. Исследовать серологические реакции на альтернариол у лиц с аллергологическим анамнезом при помощи прямого иммуноферментного анализа (ИФА).

Материалы и методы. Сыворотки пациентов (n = 15) IgE-позитивных к аллергенам АА по результатам тестирования в иммуноблотинге RIDA AllergyScreen и иммунофлюоресцентном методе ImmunoCAP были получены из КПО при ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Взаимодействие сывороток оценивали в ИФА, используя иммобилизованные конъюгаты альтернариола с БСА, овальбумином и желатиной (Буркин А.А., 2011) и пероксидазные конъюгаты антител к IgG и IgE человека.

Результаты. Выявленное взаимодействие IgG и IgE антител в сыворотках пациентов с конъюгатами АОЛ было обусловлено реакциями с белками-носителями – БСА, овальбумином и в меньшей степени желатиной. При параллельном тестировании сывороток крови людей, на выявление специфического иммуноглобулина G, в трех образцах сывороток обнаружено двукратное увеличение оптической плотности при связывании с конъюгатом

желатина-АОЛ адсорбированным на планшете по сравнению с контролем – не конъюгированной желатиной. IgE-антител к альтернариолу обнаружено не было.

Заключение. Выявление позитивных сывороток к АОЛ может свидетельствовать о факте «встречи» человека с микотоксином, возможно в результате употребления контаминированных альтернариолом продуктов питания, содержание которого не вызывает выраженный токсический эффект, но стимулирует выработку IgG антител. Однако данный факт требует подтверждения проведением дальнейших исследований на расширенном контингенте лиц.

ПОДХОДЫ СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ И БИОИНФОРМАТИКИ В МЕТОДОЛОГИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Гурьянова С.В.

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

Распространенность аллергических заболеваний (АЗ), несмотря на значительные успехи современной медицины, продолжает год от года увеличиваться. С целью повышения эффективности и качества специализированной медицинской помощи создаются регламентирующие документы по диагностике и терапии АЗ, основанные на принципах доказательной медицины, в том числе и «Федеральные клинические рекомендации» по клинической иммунологии и аллергологии, разработанные Российской ассоциацией аллергологов и клинических иммунологов. Доказательной базой для их формирования служили публикации, вошедшие в базы данных EMBASE и PubMed/MEDLINE, данные международных согласительных документов. «Федеральные клинические рекомендации» являются важным и необходимым руководством в ежедневной практике врача, содержат разработки интегрированного алгоритма диагностики и лечения АЗ, но, тем не менее, не решают многих проблем, стоящих перед клиницистами: сложности дифференциальной диагностики, ложно положительные и ложно отрицательные результаты клинико-лабораторных исследований, генетические особенности пациентов, гендерные отличия, болезненность, а иногда и опасность в провокационных тестов, не учитывают географические особенности. Для формирования документов, дающих исчерпывающие ответы на поставленные вопросы необходим анализ большого массива данных: только в базе данных PubMed насчитывается более 400 тысяч публикаций по аллергии, при этом в нее не входит значительная часть исследований национальных профессиональных сообществ, в том числе и российских. Очевидно, что столь необходимый инструмент в повседневной практике врача, как «Федеральные клинические рекомендации» должны постоянно обновляться, учитывать и представлять медицинскому сообществу новые научные данные для формирования адекватных стратегий диагностики и терапии аллергических заболеваний. Для решения этой сложной задачи необходима консолидация врачей и ученых различных направлений на базе современных технологий: биоинформатики и системной биологии.

Создаваемые ресурсы посвящены решению различных задач: постоянное обновление базы данных номенклатуры аллергенов, распределение аллергенов по молекулярному весу, структуре, сезонности и географии, наличие их в продуктах питания, в том числе природного и биотехнологического происхождения, перечень эпитопов аллергенности, генотипирование. Эти данные позволяют определять, прогнозировать и предотвращать воздействие аллергенов, находящихся в пищевых продуктах, лекарственных средствах, окружающей среде.

Интегрировать данные научных исследований в понимание функционирования живых систем с учетом многочисленных взаимодействий на молекулярном, клеточном уровне, на уровне тканей, органов и организмов, позволяет системная биология. Разрабатываются многочисленные модели, учитывающие взаимовлияние факторов разных уровней в попытке связать их с соответствующими заболеваниями, в том числе и аллергическими. Используются стратегии для визуализации причинно-следственных связей: например, анализ корреляции уровней экспрессии генов, белков, пептидов у перенесших заболевание и здоровых людей. Для отображения более сложных связей между компонентами описываемой системы создаются программные продукты. Самым современным является язык OpenBEL (open-access biological expression language). В выражении BEL могут быть отображены взаимосвязи между молекулами (их наименование регламентируется соответствующими базами данных), модификациями, процессами, трансформациями и т.д. с установлением прямых и корреляционных взаимосвязей. Язык BEL разработан как семантическая тройка (подлежащиее, сказуемое, дополнение) для представления конкретных научных результаты в виде причинно-следственных связей. Например, p (HGNC: CCND1) = > kin (p (HGNC: CDK4) является выражением, эквивалентным следующему «Увеличенное количество белка, обозначенного «CCND» в базе данных HGNC, непосредственно увеличивает активность киназы «CDK4» обозначенной таким образом в базе данных HGNC». Наиболее широкий охват множественных вариантов биологических процессов в клетках представляет ресурс SBV Improver, охвативший более 100 сетей. Удобство данного ресурса заключается в возможности выделить любой цитокин или биологический процесс и определить его взаимосвязь с объектами в клеточных сетях системы.

Систематизация знаний об аллергических процессах на основе подходов системной биологии и биоинформатики является важным инструментом в поиске новых лекарственных средств, в том числе для АСИТ, биомаркеров, а также разработки интегрированного алгоритма диагностики и лечения аллергических заболеваний.

СОДЕРЖАНИЕ IL-17 И IL-22 В «КОЖНОМ ОКНЕ» ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Климов В.В., Исаев П.Ю.

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Среди атопических аллергических болезней на основе гиперпродукции IgE особое место занимает бронхиальная астма, корректная диагностика которой возможна только при аллергологическом обследовании. IgE является единственным цитофильным иммуноглобулином, который через высоко-аффинный FcεRI соединяется с клетками-мишенями в коже, носу, бронхах и других органах. Кожа является универсальным орга-

ном для проведения кожных аллергологических проб, основанных на выявлении IgE-опосредованной сенсибилизации и важных для диагностики всех атопических аллергических болезней, включая аллергическую астму (Ильина Н.И., Феденко Е.С., 2004). В регуляции иммунных ответов на аллергены как в норме, так и при атопиях большое значение имеют неадаптивные иммунорегуляторные Т-клетки, адаптивные хелперные Т-клетки (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22), а также недавно охарактеризованные врождённые лимфоидные клетки нескольких субпопуляций (ILC1, ILC2, ILC17, ILC22 и другие). Многие из них действуют на локальном уровне и, естественно, секретируют цитокины (Farahani et al., 2014; Asano et al., 2015).

Целью настоящей работы была оценка содержания IL-17 и IL-22 как ключевых цитокинов Th17 и Th22 в кожных экссудатах при бронхиальной астме.

Обследовано 25 пациентов обоего пола в возрасте от 18 до 55 лет с бронхиальной астмой в периоде ремиссии болезни. Диагностика патологий включала сбор жалоб, семейного анамнеза и анамнеза заболевания, клиническое и аллергологическое обследование, структурировалась согласно принятой классификации. Контрольную группу составили 10 практически здоровых доноров-добровольцев в возрасте 17-24 лет.

Материалом для исследования уровня цитокинов служили бесклеточные фракции кожного экссудата, полученные с помощью камеры. В работе применялись «кожное окно» и камера – модель, которая позволяла исследовать цитокины на локальном уровне (Климов В.В. и соавт., 2014). Определение цитокинов проводилось с помощью твёрдофазного иммуноферментного анализа с пересчётом на 1 г белка в экссудате.

У пациентов с бронхиальной астмой в экссудатах «кожного окна» выявлено статистически значимое снижение IL-17 (0,9 (0,7-1,2) пг/г белка) и повышение IL-22 (2,0 (1,7-2,6) пг/г белка) по отношению к контролю. Полученные данные могут свидетельствовать о дисбалансе локально действующих хелперных субпопуляций Т-лимфоцитов с активацией Th22 и инактивацией Th17. Известно, что Th17 действуют в синергизме с Th1, ILC1 и ILC17, а Th22, несмотря на некоторую амбивалентность, проявляют синергизм с Th2, ILC2 и ILC22 (Cosmi et al., 2011; Araujo-Pires et al., 2014; Asano et al., 2015).

Полученные нами результаты носят предварительный характер. Для уточнения активности иммунорегуляторных Т-клеток на уровне кожи при бронхиальной астме необходимы дополнительные исследования.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭОЗИНОФИЛЬНОГО КАТИОННОГО БЕЛКА ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ У ВЗРОСЛЫХ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Кляусов А.С., Осипов С.А.

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», Волгоград, Россия

Введение. Эозинофильный катионный белок (ECP) – один из специфических секреторных гранул клеток эозинофилов, обладающий цитотоксическим эффектом, т.е. участвующий в повреждении мембран клеток в поздней фазе аллергических реакций (Bystrom J. et al., 2011). Значимость повышения концентрации ECP при различной тяжести бронхиальной астмы подтверждается рядом исследований, тем не менее в современных стандартах лечения аллергических заболеваний отсутствуют рекомендации по использованию ECP в качестве диагностически значимого маркера (Rondón C. et al., 2010; Gerald C.-H. Koh et al., 2007).

Цель и задачи. Определить возможность использования значения концентрации эозинофильного катионного белка в сыворотке крови у больных с аллергическим ринитом или бронхиальной астмой для прогнозирования изменения состояния пациента.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе поликлиник г. Волгограда. 88 пациентов с аллергическими заболеваниями в возрасте от 18 лет были отобраны для проведения исследования. Пациенты (54 человека, средний возраст 38±15 лет) с подтвержденным врачом-аллергологом диагнозом «интермиттирующий аллергический ринит» (АР) были поделены на 2 группы в зависимости от состояния пациента (ремиссия или обострение) на момент включения в исследование. Третью и четвертую группы (34 человека, средний возраст 47±16 лет) составили пациенты с подтвержденным диагнозом атопическая бронхиальная астма (БА) в стадии ремиссии и состоянии обострения. Концентрации IgE и ECP определялись в сыворотке крови у больных с использованием анализатора SIEMENS IMMULITE 2000 XPi (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, США). Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы STATISTICA 6.0 с использованием непараметрического U-теста Манна–Уитни и корреляционного анализа: тест Спирмена.

Результаты. В ходе исследования было выявлено, что в группе пациентов с аллергическим ринитом в состоянии ремиссии уровень ECP составлял 23,00 [17,50-5,50] нг/мл при уровне нормальных показателей 0-24 нг/мл, значение общего IgE: 86,60 [53,90-302,00] МЕ/мл. Абсолютное и относительное количество эозинофилов в крови: 0,16 [0,11-0,28] × 10^9/л и 3,05 [1,90-3,88] % соответственно. В группе пациентов с АР в состоянии обострения уровень ECP оказался выше нормы 30,00 [20,50-65,00] нг/мл при значениях общего IgE: 131,20 [43,65-293,50] МЕ/мл. Абсолютное и относительное количество эозинофилов: 0,18 [0,09-0,26] × 10^9/л и 2,35 [1,40-5,13] %. При сравнении данных групп было выявлено достоверное отличие по уровню концентрации ECP ($p < 0,05$), данный показатель оказался значимо выше в группе пациентов в состоянии обострения. Также в группе больных с АР в состоянии обострения при анализе корреляционных связей показателей выявлена прямая коррелятивная связь ($r = 0,427$ при $p < 0,05$) между уровнем ECP и общим IgE.

У пациентов с диагнозом «бронхиальная астма» в состоянии обострения концентрация ECP была значительно выше нормы и составила 49,00 [37,00-105,00] нг/мл, значения общего IgE: 133,00 [36,70-209,00] МЕ/мл. Абсолютное и относительное количество эозинофилов: 0,32 [0,17-0,50] × 10^9/л и 5,65 [2,63-8,40] %. При анализе линейных связей показателей в данной группе была выявлена прямая корреляционная связь ($r = 0,630$, $p < 0,05$) между абсолютным количеством эозинофилов и уровнем ECP, а также между относительным содержанием эозинофилов и концентрацией ECP ($r = 0,571$, $p < 0,05$). У больных с диагнозом бронхиальная астма в состоянии ремиссии уровень ECP составлял 24,00 [15,00-30,00] нг/мл при значениях общего IgE: 37,85 [15,63-180,00] МЕ/мл. Абсолютное и относительное количество эозинофилов: 0,21 [0,14-0,24] × 10^9/л и 2,80 [1,65-3,63] %. Анализ пока-

зателей данной группы позволил выявить наличие достоверной положительной зависимости ($r = 0,524$, $p < 0,05$) между уровнем ECP и абсолютным количеством эозинофилов.

Заключение. ECP имеет потенциал в качестве маркера аллергического воспаления, однако более информативным становится в сочетании с другими маркерами аллергических заболеваний. При аллергическом рините возможно использование изменения концентрации ECP с целью общей оценки состояния пациента, а также для прогнозирования перехода заболевания из одной стадии в другую (обострение < = > ремиссия).

ВЛИЯНИЕ АНТИМИКОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ БРОНХОЛЕГОЧНЫМ АСПЕРГИЛЛЕЗОМ

Козлова Я.И., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е., Аак О.В., Климко Н.Н.

ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург, Россия

Введение. *Aspergillus spp.* – один из основных плесневых грибов, который может быть источником аллергенов. Клинические проявления гиперчувствительности к *Aspergillus spp.* у больных с атопией могут варьировать от обострений бронхиальной астмы (БА) до развития тяжелой БА с микогенной сенсибилизацией и аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА). Для АБЛА характерны неконтролируемое течение бронхиальной астмы, рецидивирующие легочные инфильтраты, бронхоэктазы и прогрессирующая дыхательная недостаточность. Количество исследований эффективности применения азолов в лечении АБЛА ограничено, а влияние антимикотической терапии на иммунологические показатели пациентов требует дальнейшего изучения.

Цель. Изучить динамику иммунологических показателей у больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом на фоне применения антимикотической терапии.

Материалы и методы. В исследование включили 11 больных АБЛА в возрасте от 29 до 78 лет (медиана – 36 лет). Аллергологическое обследование включало кожное тестирование с 6 грибковыми аллергенами: *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Rhizopus, Candida*. Методом иммуноферментного анализа определяли уровень общего IgE (ООО «Полигност», Россия) и специфических IgE (sIgE) к грибковым (панель биотинилированных аллергенов «Алкор Био», Россия) в сыворотке крови. Диагноз АБЛА устанавливали на основании критериев R. Agarwal et al. (2013). Для оценки продукции интерферона-γ (IFNγ) использовали цельную кровь, взятую в вакутейнеры с гепарином (20 МЕ/мл). Кровь разводили 1:5 питательной средой RPMI 1640 с добавлением L-глутамина («Биолот», Россия), 200 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия). Спонтанную продукцию IFNγ цитокинов определяли в супернатанте культуры клеток без добавления индукторов. Для оценки митогениндуцированной продукции IFNγ инкубацию клеток крови проводили в течение 24 часов с ФГА в концентрации 50 мг/мл (Sigma, США). Продукцию IFNγ, активированную аллергеном *A. fumigatus*, («Алкор Био», Россия) в концентрации 10 мкг/мл, определяли на 6 сутки. После окончания инкубации надосадочную жидкость аликвотировали и замораживали при -20 °С до проведения анализа. Полученные супернатанты использовали для определения спонтанной и индуцированной продукции IFNγ методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем («Вектор-Бест», Россия). Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10.

Результаты. У всех больных АБЛА prick-тест с *A. fumigatus* был положительный, в сыворотке крови выявлен повышенный уровень sIgE к *A. fumigatus* (Me 1,56 (0,36 ÷ 10,56) МЕ/мл) и общего IgE (Me 986 (873 ÷ 1695) МЕ/мл). При посеве мокроты и/или БАЛ у 9 больных (81%) выявляли рост *A. fumigatus*, у 2 (18%) – *A. niger*. В анализируемых случаях по данным КТ органов грудной клетки у 6 (55%) больных обнаружена очаговая и сегментарная инфильтрация легких, у 5 (45%) – бронхоэктазы. В ходе исследования больным АБЛА проведено лечение итраконазолом в дозе 400 мг в сутки. У всех больных после 24 недель терапии отмечен выраженный клинический эффект: уменьшение одышки и кашля, улучшение показателей функции внешнего дыхания, положительная динамика на КТ органов грудной клетки. Все больные переносили препарат хорошо, нежелательных явлений не было. При повторном обследовании через 24 недели у всех больных отмечено статистически значимое снижение уровня sIgE к *A. fumigatus* (Me 0,66 (0,01÷5,24) МЕ/мл, $p = 0,003$) и общего IgE (Me 540 (73 ÷ 613) МЕ/мл, $p = 0,003$). Выявлено повышение способности клеток крови к продукции IFNγ в ответ на стимуляцию клеток крови ФГА (1914 (1294 ÷ 2232) *vs* 910 (852 ÷ 1648) пг/мл, $p = 0,004$) и на индукцию аллергеном *A. fumigatus* (48,0 (24,0 ÷ 61,0) *vs* 19,0 (2,0 ÷ 34,0) пг/мл, $p = 0,001$). Установлено снижение абсолютного числа эозинофилов ($p = 0,05$).

Заключение. Тенденция к нормализации иммунологического профиля больных на фоне клинических признаков улучшения состояния свидетельствует об успешном использовании антимикотической терапии у больных АБЛА. Применение итраконазола с целью снижения грибковой нагрузки и восстановления Th2/Th1-дисбаланса эффективно у данной категории больных. Адекватная противовоспалительная и антимикотическая терапия способствует предотвращению прогрессирования этого тяжелого хронического заболевания легких и профилактики инвалидизации пациентов с АБЛА.

ПОИСК НОВЫХ БИОМАРКЕРОВ ИНФЕКЦИОННЫХ ОБОСТРЕНИЙ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Косякова Н.И.[1], Прохоренко С.В.[2], Андреева Л.А.[1], Панкратова Е.В.[1], Сахаров П.А.[1]

[1] Больница Научного центра РАН, Пущино, Россия
[2] Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

В процессе обострения атопической бронхиальной астмы (АБА) индуцируется специфическая реакция организма, которая характеризуется повышением уровня белков острой фазы и других биомаркеров. Среди них широко известны такие, как С-реактивный белок (СРБ), про-

кальцитонин (ПКТ), фактор некроза опухоли-α (TNFα), интерлейкины (IL)-6, 8 и др. В литературе появились сообщения о биомаркере – пресепсине (PS), который является N-концевым фрагментом рецептора макрофагов $CD14^-$ и может стать новым маркером тяжести обострения АБА.

Цель. Изучить информативность биомаркеров воспаления в сыворотке крови у пациентов с АБА в период инфекционно-индуцированного обострения.

Материалы и методы. За период 2015-2017 гг. анализировалась медицинская документация 315 пациентов АБА и было изучено у них течение АБА в период сезонного подъема ОРВИ и Гриппа. Критериями включения пациентов в группу наблюдения стали: наличие клинико-лабораторных проявлений инфекционно-индуцированных обострений АБА, температуры, катаральных проявлений, учащения приступов удушья, прогрессивное нарастание экспираторной одышки, кашля, появление свистящих хрипов, а также нарастание бронхиальной обструкции (снижение объема форсированного выдоха за 1 секунду или пиковой скорости выдоха); письменное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения на момент исследования служили: наличие ХОБЛ, тяжелых заболеваний сердечно-сосудистой системы, онкопатологии, хронического алкоголизма, наркомании, токсикомании, психических заболеваний, беременности, заболеваний крови, хронической почечной и печеночной недостаточности. Отвечающим критериям исследования было 35 пациентов, м. – 21, ж. – 14. Средний возраст – 51,3±3,8 лет, средняя продолжительность болезни – 9,1±3,3 лет. Проводилось микробиологическое и молекулярно-биологическое исследование мокроты; в сыворотке крови изучалась в динамике, в день поступления, на 3-5 и 7-10 дни лечения, продукция биомаркеров воспаления – СРБ, ПКТ, TNFα, IL-8 и PS, а также IL-4 и IgE, как маркеров активности Th2-лимфоцитов. Группу контроля составили 10 доноров той же возрастной группы. Статистическая обработка полученных данных была выполнена с использованием пакета программ прикладной статистики Statistica for Windows, версия 6.

Результаты и обсуждение. У больных АБА в 28,5% случаев обострение индуцировалось вирусной инфекцией, в 42,4% – бактериальной и в 29,4% случаях – вирусно-бактериальной инфекцией. Пневмония была зарегистрирована у 9 пациентов, обострение хронических очагов инфекции ЛОР-органов и моче-половой системы у 15, что потребовало активной антибактериальной терапии. У всех пациентов АБА с бактериальной и вирусно-бактериальной инфекцией наблюдалось значительное снижение показателей ФВД, дисбаланс в системе цитокинов, высокий уровень биомаркеров воспаления. Были выявлены достоверные корреляционные взаимосвязи между ОФВ1 и IL-8 (r = 0,95), TNFα и тяжестью обострения АБА (r = 0,68, p = 0,007), Гиперпродукцией IL-4 и высоким уровнем IgE (r = 0,65, p = 0,003), что свидетельствует об активности воспаления и связанной с ним тяжести обструкции дыхательных путей. Наиболее информативными биомаркерами тяжести обострения АБА являются уровень пресепсина и лейкоцитарный индекс интоксикации, которые коррелируют с тяжестью обострения и появляются раньше, чем уровень СРБ и ПКЦ уже в первые часы и дни обострения (r = 0,62 при p < 0,05). У пациентов без инфекционно-индуцированного обострения АБА эти маркеры повышались не значительно. Таким образом, новый биомаркер пресепсин может стать прогностическим маркером тяжести инфекционно-индуцированного обострения АБА.

СПЕЦИФИКА ИММУННОГО СТАТУСА И НАЗАЛЬНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА ПРИ РАЗВЕРНУТОЙ АСТМАТИЧЕСКОЙ ТРИАДЕ

Лазарева А.М., Смирнова С.В.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

В основе формирования брохоконстрикторного синдрома лежат неиммунологические механизмы, связанные с ингибированием циклоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты с гиперпродукцией лейкотриенов. Манифестация заболевания начинается с полипозного риносинусита и при отсутствии других проявлений астматической триады (АТ), расценивается как неразвернутая астматическая триада.

Цель. изучить особенности иммунного статуса, концентрации цитокинов и микробного пейзажа слизистой оболочки носа при полипозном риносинусите и астматической триаде.

Обследованы больные полипозным риносинуситом (ПРС, n = 68) и астматической триадой (АТ, n = 32) в возрасте от 18 до 64 лет. Группу контроля составляли практически здоровые доноры крови ГБУЗ «Красноярского краевого центра крови № 1» (n = 219), сопоставимые по полу и возрасту. Диагностика аллергического риносинусита основывалась на комплексном обследовании больных оториноларингологом и аллергологом-иммунологом. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных антител $CD3^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD4^+CD8^+$, CD16/56, $CD3^+CD16/56$, $CD19^+$, концентрацию иммуноглобулинов A, M и G и цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNFα и IFNγ, пг/мл) определяли иммуноферментным методом. Для оценки микрофлоры слизистой оболочки носа во время обострения заболевания проводили посев микроорганизмов на питательные дифференциально-диагностические средах (КА, ЖСА, Эндо, энтерококк-агар).

При исследовании иммунного статуса при полипозном риносинусите выявлена активация В-лимфоцитов при снижении Т-клеточного иммунитета. Формирование развернутой астматической триады сопряжено изменение в иммуногенезе с активацией Т-лимфоцитов и снижением гуморального звена иммунитета. При неразвернутой астматической триаде (полипозный риносинусит) и в процессе формирования бронхиальной астмы неиммунного генеза наблюдается разнонаправленный дисбаланс концентрации воспалительных и провоспалительных цитокинов. Микробиоценоз слизистой оболочки носа как при полипозном риносинусите так и при астматической триаде нарушен в сторону дисбактериоза с преобладанием патогенной и условно-патогенной микрофлоры.

УРОВНИ СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А У ЛИЦ С АЛЛЕРГИЕЙ К БЫТОВЫМ КЛЕЩАМ

Лесниченко Д.А.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, Донецкая Народная Республика

В настоящее время распространенность аллергических заболеваний колеблется в пределах 20-40% населения. Наиболее часто в клинической практике встречаются атопические болезни (атопическая бронхиальная астма, поллиноз, аллергический ринит и атопический дерматит). Существуют работы, свидетельствующие о снижении содержания общего иммуноглобулина А в сыворотке лиц с атопией. В то же время защиту слизистых оболочек респираторного тракта, желудочно-кишечного тракта обеспечивает в первую очередь секреторная форма IgA (sIgA), обладающая антибактериальными, антивирусными и антиаллергическими свойствами. Низкий уровень секреторного IgA на слизистых оболочках способствует беспрепятственному проникновению аллергенов через слизистые оболочки респираторного и желудочно-кишечного тракта. При этом работы по исследованию содержания sIgA в сыворотке и секретах у пациентов с атопией немногочисленны, данные их противоречивы. Следует отметить, что среди аллергенов жилища человека причиной аллергических заболеваний атопического характера чаще всего являются клещи домашней пыли. По данным ряда авторов, частота регистрации сенсибилизации к клещам *Dermatophagoides* среди лиц с жалобами на кожные и респираторные проявления аллергического характера, колеблется в широких пределах, достигая 51,9%.

Цель. Определить влияние наличия аллергии к бытовым клещам на концентрацию секреторного IgA в сыворотке и ротовой жидкости взрослых лиц.

Проведено исследование уровня специфических IgE к 3 видам бытовых клещей (*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus, Tyrophagus putrescentiae)* и sIgA в сыворотке и ротовой жидкости 122 пациентов старше 10 лет, с подозрением на бытовую аллергию. Определение содержания указанных маркеров проводилось с помощью разработанных сотрудниками кафедры клинической иммунологии, аллергологии и эндокринологии ДонНМУ им.М.Горького иммуноферментных тест-систем для определения указанных иммуноглобулинов. Статистическая обработка полученного материала проводилась при помощи программы MedStat.

В результате проведенного анализа установлено, что содержание sIgA сыворотки у пациентов с повышенными уровнями специфических IgE к аллергенам бытовых клещей составило 2,04±0,17 мг/л, в то время как обследованные с нормальным уровнем антител к указанным аллергенам характеризовались уровнем sIgA сыворотки 2,41±0,29 мг/л ($p = 0,021$). Концентрация sIgA в ротовой жидкости в данных группах составила 136,9±6,8 и 156,6±11,7 мг/л соответственно ($p = 0,016$). Для обследованных с подтвержденной аллергией к бытовым клещам характерно увеличение удельного веса лиц с более низкими концентрациями секреторного IgA в сыворотке и ротовой жидкости. Так, концентрация sIgA в сыворотке менее 3,0 мг/л в данной группе выявлена в 72,6±5,7% случаев, в то время как в группе без аллергии к клещам указанные значения sIgA имели место у 54,3±8,4% обследованных ($p = 0,018$). Частота содержания секреторного IgA в ротовой жидкости в концентрации менее 150,0 мг/л у лиц с аллергией к клещам имела тенденцию к снижению в сравнении с несенсибилизированными, и составила 59,3±5,5 и 39,0±7,6% соответственно ($p = 0,056$). Также была установлена достоверная ($p < 0,05$) обратная связь концентрации sIgA сыворотки с уровнем специфических IgE к *D. farinae* и *D. pteronyssinus* (tau = -0,145 и -0,136 соответственно) и секреторного IgA ротовой жидкости с антителами к *D. farinae*, *D. pteronyssinus, T.putrescentiae (*tau = -0,161, -0,160 и -0,129 соответственно).

Таким образом, установлено, что для лиц, сенсибилизированных к бытовым клещам, характерно достоверное ($p < 0,05$) снижение концентрации sIgA в сыворотке и ротовой жидкости. При этом среди указанного контингента наблюдается достоверное ($p < 0,05$) повышение частоты регистрации обследуемых с содержанием исследуемого маркера < 3,0 мг/л в сыворотке и тенденция ($p < 0,1$) к повышению частоты регистрации обследуемых с содержанием исследуемого маркера < 150 мг/л в ротовой жилкости, в сравнении с данными, полученными при обследовании лиц с нормальными уровнями специфических IgE к бытовым клещам. Кроме того, установлена достоверная ($p < 0,05$) обратная связь концентрации секреторного IgA сыворотки с уровнем специфических IgE к *Dermatophagoides farinae* и *Dermatophagoides pteronyssinus* и секреторного IgA ротовой жидкости с антителами к *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus, Tyrophagus putrescentiae*.

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОЛЛИНОЗОВ В САМАРЕ

Мазоха К.С., Хабибулина Л.Р., Асеева Е.В., Козлова О.С.

Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия

Поллиноз относится к числу наиболее распространенных заболеваний в структуре аллергической патологии. Выявление этиологических факторов, способствующих возникновению и формированию заболевания, позволяет оптимизировать терапию и предотвратить прогрессирование болезни.

Цель. Изучение этиологической структуры пыльцевой сенсибилизации у взрослых и детей в Самаре.

Материалы и методы. Под наблюдением (2013-2015 гг.) находилось 410 больных поллинозом, среди которых 199 детей в возрасте от 3 до 18 лет и 211 взрослых. У всех пациентов проведено аллергологическое обследование методом ПРИК-тестов с применением диагностических аллергенов (ФГУП НПО «МИКРОГЕН», г. Ставрополь; «Севафарма», Чехия). Использовался набор серийных пыльцевых диагностикумов (18 наименований): ольха клейкая, береза висячая, клен ясенелистный, дуб черешчатый, орешник (лещина обыкновенная), тополь черный, ежа сборная, овсяница луговая, тимофеевка луговая, пырей ползучий, мятлик луговой, полынь горькая, амброзия полыннолистная, лебеда татарская, подсолнечник однолетний, конопля сорная, циклахена дурнишниколистная, одуванчик лекарственный. Полученные данные обработаны с применением статистических формул программы Microsoft Excel с помощью пакета AtteStat. Достоверность различий определяли доверительным интервалом более 95%.

Результаты. Анализ аллергологического обследования показал, что у больных поллинозом наиболее часто от-

мечалась сенсибилизация к пыльце сорных трав (80,2%), из них: к полыни – у 64,6% пациентов, к циклахене – у 52,9%, амброзии полыннолистной – у 37,6% обследованных. Аллергия к пыльце сорных трав диагностировалась с одинаковой частотой у детей и взрослых – 76,4 и 83,9% соответственно (табл.). Сенсибилизация к пыльце луговых трав выявлена у 59,8% детей и 65,4% взрослых (p = 0,5029), пыльце деревьев – у 61,8% детей и 53,1% взрослых (p = 0,2030). У детей сенсибилизация к сорным травам встречается в 1,3 раза чаще, чем к луговым травам (p = 0,0017) и пыльце деревьев (p = 0,0099). У взрослых также доминировала сенсибилизация к пыльце сорных трав, которая регистрировалась в 1,3-1,6 раза чаще, чем к пыльце луговых трав и деревьев, соответственно (p = 0,0001). Характерно наличие сочетанной сенсибилизации одновременно к двум или трем группам аллергенов, которая отмечалась у 65,8% детей и 70,1% взрослых.

Заключение. По результатам кожного аллергологического тестирования наиболее распространенной в Самаре является сенсибилизация к пыльце сорных трав (полынь и циклахена). В этиологической структуре поллинозов преобладает полисенсибилизация.

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ МАЗОХА К.С. И ДР.)

Результаты кожных проб у пациентов с поллинозом (%)				
Видовая группа	Все	Возрастные группы		Уровень значимости различий (p)
		Дети (n = 199)	Взрослые (n = 211)	
Древесные растения	57,3	61,8	53,1	0,2030
Луговые травы	62,7	59,8	65,4	0,5029
Сорные травы	80,2	76,4	83,9	0,1622

IgE-АУТОАНТИТЕЛА К ТИРЕОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЕ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ

Мазурина С.А.[1], Сибгатуллина Н.А.[2], Кузьмина Н.С.[1], Зубков А.В.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
[2] Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Казань, Россия

Хроническая спонтанная крапивница (ХСК) представляет собой гетерогенную группу заболеваний и характеризуется спонтанным проявлением волдырей, сопровождающихся зудом и/или ангиоотеком в течение шести недель и более. Аутоиммунная форма – одна из разновидностей ХСК, диагностика которой основывается на положительной кожной пробе с аутосывороткой, свидетельствующей о наличии аутоантител к IgE или его рецептору FcεRI, и определяется у 42-50% пациентов. В остальных случаях ХСК является идиопатической, причины которой остаются неясными. Спектр возможных аутоантител до конца не исследован. Сыворотки некоторых пациентов, лишенные аутоАТ к FcεRI рецептору, могут индуцировать выделение гистамина из базофилов крови *in vitro*. По-видимому, аутоантитела других специфичностей и отличные от IgG также играют определенную роль в иммунопатогенезе крапивницы. Часто ХСК связывают с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы, а выявление IgG-аутоантитела к тиреопероксидазев сыворотке (IgG-ТРО), по данным разных авторов, составляет 12-29%. Ассоциация с аутоиммунным тиреоидитом характеризуется более серьезным и длительным курсом лечения пациентов с ХСК. Однако до сих пор в клинике при ХСК определяют только антитиреоидные IgG антитела. **Целью** нашего исследования было выявить sIgE антитела к ТПО у больных ХСК.

В исследование были включены 54 больных крапивницей в возрасте 17-75 лет. При поступлении у пациентов оценивали анамнестические данные и клинические симптомы, а также проводили внутрикожный тест с аутологичной сывороткой согласно методу, предложенному в 1993 году M. Hide и соавт. (АСКП).

У 17 (31,5%) пациентов была выявлена положительная кожная проба с аутосывороткой (аутоиммунная форма ХСК), а у 37 (68,5%) – причина крапивницы не была установлена, и она рассматривалась как идиопатическая (ХИК).

В сыворотке крови всех пациентов определяли содержание гормонов ТТГ и свободного Т4, IgG-антитела к ТПО в коммерческих наборах ИФА. sIgE к ТПО определяли методом твердофазного ИФА, используя высокоочищенный препарат ТПО и коньюгат моноклональных антител к IgE 8E/4F4 с пероксидазой хрена (ООО «Полигност», Санкт-Петербург). В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки практически здоровых доноров (n = 50). Результаты анализа считали положительными при значениях оптической плотности (ОП) образцов, превышающих в два раза ОП отрицательного контроля.

Результаты лабораторного исследования функции щитовидной железы выявили признаки «первичного гипотиреоза» у 14 (25,9%). При этом оказалось, что у 5 пациентов ХСК изменения уровня гормонов щитовидной железы сочетались с положительной АСКП. Интересно отметить, что у 3 пациентов с ХСК имелся верифицированный диагноз аутоиммунного тиреоидита. Эти пациенты находились на заместительной гормональной терапии и содержание гормонов ТТГ и свободного Т4 было в пределах нормы.

Определение IgG антител к ТПО выявило повышенные их значения у 8 (14,8%) пациентов, из них только у 1 больного ХСК обнаруженные IgG к ТПО сочетались с положительной АСКП.

sIgE к ТПО в сыворотке крови выявлены у 8 (14,8%) пациентов ХСК, при этом только у 2 пациентов sIgE к ТПО сочетались с выявленными IgG антителами к ТПО и повышенным содержанием ТТГ в сыворотке крови. Интересно при этом отметить, что sIgE к ТПО были обнаружены у больных с так называемой идиопатической формой ХСК и их наличие не было связано с тяжестью заболевания.

Как известно, положительное кожное тестирование с аутологичной сывороткой выделяет аутоиммунную форму ХСК, которая в нашем исследовании была установлена у 17 (31,5%) пациентов. Определение sIgE к ТПО позволяет выделить еще один вариант аутоиммунной формы ХСК, обусловленный антитиреоидным иммунитетом. Дальнейшие исследования sIgE к ТПО у лиц с ХСК предполагает оценить роль этого иммунного ответа в иммунопатогенезе крапивницы, как предвестника развития аутоиммунной патологии щитовидной железы.

АЭРОПАЛИНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОФИЛАКТИКИ ПОЛЛИНОЗА В САМАРЕ

Манжос М.В.[1], Хабибулина Л.Р.[1], Кавеленова Л.М.[2], Власова Н.В.[2], Моисеева Т.В.[1]

[1] Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия
[2] Самарский национальный исследовательский университет им. акад. С.П. Королева, Самара, Россия

Течение поллиноза характеризуется сезонными обострениями, обусловленными контактом с пыльцой растений и зависит от разнообразия флоры, сроков цветения растений, степени аллергенности пыльцы. Это определяет необходимость разработки в каждом регионе научно обоснованного представления о пыльцевых спектрах, прогнозировании аэроаллергенной обстановки.

Цель. Изучение аэропалинологических аспектов развития поллиноза в г. Самаре для усовершенствования комплекса профилактических и лечебных мероприятий.

Материалы и методы. Аэропалинологические исследования проводились в активный период вегетации (с апреля по октябрь) 2013-2015 гг. С помощью ловушки-импактора волюметрическим методом на предметные стекла, покрытые смесью вазелина и воска, улавливались пыльцевые зерна (п. з.) растений. В полученных препаратах подсчитывали п. з. и определяли их принадлежность к различным систематическим группам. В дальнейшем определялось содержание п. з в 1 м^3. При составлении календаря пыления сведения о количественном содержании пыльцы усредняли за декаду. После получения и математической обработки данных, относящихся к различным годам и видам растений, были построены рейтинговые ряды в порядке убывания значений.

Результаты. Продолжительность сезона пыления составила 6 месяцев (апрель-сентябрь). В 2013 г. в воздушном бассейне г. Самары был зарегистрирован 21 таксон – 12 древесных и 9 травянистых, в 2014 г. отмечено 20 таксонов – 13 древесных и 7 травянистых, в 2015 г. – 20 таксонов – 12 древесных и 8 травянистых.

Было зарегистрировано три периода увеличения концентрации пыльцевых зерен в воздухе: два основных периода и один промежуточный. Начальная волна пыления регистрировалась в весенний период (первая-третья декада апреля) и была представлена пыльцой древесных растений. Вторая волна была зафиксирована в весенне-летний период (первая декада мая – третья декада июня) и была ассоциирована с пылением сосны и злаковых трав, третья волна пыления определялась в летне-осенний период (первая декада июля – до конца периода вегетации растений) и была представлена пыльцой сорных трав. Анализ результатов рейтинговых рядов для растений-источников пыльцы в воздухе г. Самары показал, что первое место среди древесных растений в 2013 г. занял тополь. Пыльца амброзии значительно преобладала над другими таксонами и была лидером в 2014-2015 гг. Второе место по количеству пыльцевых зерен в течение всего периода наблюдения занимала пыльца березы, девятое-тринадцатое место – пыльца полыни. Злаковые культуры в 2013 году были на четвертой позиции, в 2014 – на седьмой и на двенадцатой в 2015 году. По результатам исследования был составлен ориентировочный календарь пыления для г. Самары.

Выводы. Данные аэропалинологического мониторинга дают представление о пыльцевом спектре конкретного региона, позволяют прогнозировать аэроаллергенную ситуацию, усовершенствовать комплекс профилактических и лечебных мероприятий для лиц, страдающих поллинозом.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ НА ФОНЕ ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ

Мурашов Э.Г.[1, 2], Столов С.В. [1, 2], Тотолян Арег А.[2, 3]

[1] Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[3] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Воспаление дыхательных путей, клеточная инфильтрация с последующей продукцией цитокинов – белковых медиаторов, играющих ключевую роль в управлении патофизиологическими процессами при бронхиальной астме (БА), являются ключевыми механизмами в патогенезе бронхообструкции. В этой связи перспективным направлением изучения активности воспалительного процесса в бронхоальвеолярной ткани может стать оценка содержания цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости, получаемой при проведении лечебной санации бронхов.

Цель и задачи. Изучить изменения цитологического состава и продукции ряда цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFNγ, GM-CSF, TNFα) в бронхоальвеолярной жидкости при проведении противовоспалительной терапии больным БА. Определить дифференциально-диагностические критерии различных вариантов БА в зависимости от содержания цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости.

Материалы и методы. Больные были разделены на 2 группы: 1-я группа – 40 больных с аллергическим вариантом БА, 2-ая группа – 40 больных со смешанным вариантом БА. Группа сравнения была представлена 20 пациентами без бронхолегочных заболеваний.

Материалом для иммунологического и цитологического исследования служила бронхоальвеолярная жидкость, полученная на 2-3 сутки госпитализации после стойкого купирования бронхоспазма и стабилизации клинического состояния. Повторный забор бронхоальвеолярной жидкости проводили перед выпиской, обычно на 16-е сутки после поступления в стационар.

Результаты и обсуждение. Для анализа выраженности иммуновоспалительного процесса нами проведено исследование содержания ряда цитокинов БАЖ в обеих группах наблюдаемых больных на фоне лечения.

При анализе содержания IL-2 в БАЖ было выявлено, что в обеих группах больных (АБА и СБА) на фоне лечения отмечалось снижение этого интерлейкина, но только в группе СБА это снижение было статистически значимо (с 1,6 пг/мл [1,2-2,1] до 0,96 пг/мл [0,7-1,1] при $p < 0,05$).

Повышенный уровень IL-4 при обострении БА отражает преобладание субпопуляции Th2-лимфоцитов, отвечающих за дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки и снижение физиологического ингибирующего действия IFNγ на синтез IgE. Причем более значимое повышение IL-4 отмечено в группе АБА (128,0 пг/мл [96,1-158,2]) по сравнению с СБА (94,2 пг/мл [71,5-117,4]). Оценка содержания IL-4, являющегося медиаторам воспаления Th2-типа, на фоне лечения выявила достоверное его снижение у больных АБА с 128,0

пг/мл (96,1-8,2) до 54,0 пг/мл (41,5-67,5) при $p < 0,05$. Аналогичные результаты получены и у больных СБА (94,2 пг/мл [71,5-117,4] и 37,6 пг/мл [29,4-8,1] соответственно [$p < 0,05$]).

При оценке содержания IL-6 в БАЖ на фоне лечения отмечалось достоверное снижение этого показателя и для больных АБА и для больных СБА. В группе АБА уровень IL-6 понизился со 150,0 пг/мл (114,6-185.8) до 41,2 пг/мл (32,5-52,7) при $p < 0,05$. Такие же результаты установлены и в группе больных СБА (51,4 пг/мл [39,7-65,2] и 8,4 пг/мл [6,2-10,5]) соответственно ($p < 0,05$).

Содержание IL-8 в БАЖ в группах больных АБА и СБА на фоне лечения достоверно снизилось с 5824 пг/мл (4374-5965) до 1020 пг/мл (968-1279) при АБА ($p < 0,05$); с 2143 пг/мл (1608-2679) до 864 пг/мл (648-1083) при СБА ($p < 0,05$).

При анализе содержания IL-10 в БАЖ было выявлено, что в обеих группах больных (АБА и СБА) на фоне лечения отмечалось достоверное снижение этого интерлейкина: с 3,6 пг/мл (2,8-4,3) до 1,2 пг/мл (0,9-1,5) при АБА ($p < 0,05$); с 4,2 пг/мл (3,2-5,3) до 2,0 пг/мл (1,5-2,5) при СБА ($p < 0,05$).

Статистически достоверное снижение уровня TNFα на фоне лечения отмечалось только в группах АБА (с 2,6 пг/мл [2,1-3,1] до 1,0 пг/мл [0,7-1,3]) при $p < 0,05$.

При анализе содержания IFNγ отмечалось статистически значимое его повышение в группах больных АБА и СБА на фоне терапии с 3,2 пг/мл (2,4-4,0) до 5,7 пг/мл (4,3-7,1) при АБА ($p < 0,05$); с 2,6 пг/мл (1,9-3,3) до 10,6 пг/мл (7,9-13,3) при СБА ($p < 0,05$).

Содержание GM-CSF в обеих группах больных БА на фоне лечения уменьшилось с 6,0 пг/мл (4,4-7,5) до 2,6 пг/мл (2,1-3,1) при АБА ($p < 0,05$); с 3,7 пг/мл (2,8-4,6) до 1,7 пг/мл (1,3-2,2) при СБА ($p < 0,05$).

Ввиду разнообразности эффектов IFNγ и IL-4 формирование фенотипа иммунного ответа зависит от сбалансированности их выработки. По соотношению IFNγ/IL-4 оценивается чувствительность больных БА к сенсибилизации и возможность обострения заболевания. Достоверное повышение коэффициента IFNγ/IL-4 после курса лечения отмечалось также в обеих группах. У больных АБА с 0,025 пг/мл (0,019-0,049) до 0,097 пг/мл (0,048-0,132) при $p < 0,05$; у больных СБА с 0,027 пг/мл (0,021-0,031) до 0,282 пг/мл (0,238-0,352) при $p < 0,05$.

Таким образом, установлено снижение на фоне лечения большинства изучаемых цитокинов в обеих группах больных БА, что позволяет использовать содержание IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFNγ и коэффициент IFNγ/IL-4 в качестве показателей эффективности терапии.

Выводы. Патогенетическая терапия БА снижает содержание IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF и повышает IFNγ. Оценка цитокиновой активности БАЖ может служить показателем эффективности лечения заболевания.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ АЛЛЕРГИИ НА ЛИМОН У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ КЛИНИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Прилуцкий А.С., Лыгина Ю.А.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, Донецкая Народная Республика

Лимон широко используется в мире как пищевой продукт, а также в качестве вкусовых добавок (кондитерские изделия, напитки, лекарственные средства). Употребление его в пищу может привести к возникновению аллергических реакций, в особенности у детей. Однако на современном этапе мы располагаем крайне скудными и противоречивыми сведениями о распространенности клинически выраженной аллергии и сенсибилизации к лимону. Исследования, посвященные этому вопросу, единичны и проводились на малых объемах выборки. Кроме того, изучаемые контингенты разнородны по этиологии имеющихся аллергических болезней, пищевому поведению и возрастному составу и др.

Цель. Определение частоты сенсибилизации и клинических проявлений аллергии к лимону у детей с отягощенным аллергологическим анамнезом (атопический дерматит, пищевая аллергия).

Материалы и методы. Нами определены уровни специфических IgE-антител (sIgE) к лимону в сыворотках крови 334 детей и подростков (0-17 лет) с наличием в анамнезе или на момент обращения аллергических заболеваний (атопический дерматит и др.). Определение уровня sIgE-антител проводилось с помощью отечественной тест-системы IV поколения (г. Донецк). Данная тест-система характеризуется высокой аналитической чувствительностью (0,05-0,075 МЕ/мл), позволяющей определять sIgE в более низкой концентрации, чем ряд зарубежных аналогов. Также проведен детальный опрос (анкетирование) и клинический осмотр 48 детей и подростков (0-17 лет) с атопическим дерматитом, пищевой аллергией. Статистическая обработка данных выполнялась при помощи программ Statistica 6.0 и MedStat. Проводилась проверка распределений выборок показателей на нормальность (тест «хи-квадрат», Колмогорова–Смирнова и Лилиефорса, W-тест Шапиро–Уилка). В связи с непараметрическим характером распределения выборок (исходя из всех вышеперечисленных методов) произведен расчет медианы, ее ошибки, 95% доверительного интервала (ДИ). Для определения достоверности различий между двумя независимыми выборками использовали тест U Манна–Уитни, W-критерий Вилкоксона.

Результаты. В ходе проведенной работы клинические проявления аллергии на лимон были зарегистрированы у 8,33±0,06 % детей с диагностированным атопическим дерматитом. У всех детей с установленной связью части обострений заболевания с употреблением в пищу лимона выявлены диагностически значимые уровни sIgE к данному продукту.

При проведении последующих исследований установлено, что в сыворотке крови 25,32±0,02% обследованных детей с симптомами атопического дерматита или наличием аллергических заболеваний в анамнезе были обнаружены концентрации sIgE к лимону, достоверно превышающие ($p < 0,05$) диагностические уровни. Следует отметить, что этот показатель статистически достоверно был выше ($p < 0,05$) установленной нами частоты кожных проявлений аллергии, связанных с употреблением лимона в пищу, диагностированных клинически.

Заключение. У части детей с атопическим дерматитом на момент обращения или в анамнезе имеется скрытая сенсибилизация к лимону, которую возможно определить только при помощи лабораторного обследования. Ее частота достоверно выше частоты выявления клинической связи обострений заболевания у детей с употреблением лимона в пищу.

6-НУКЛЕОТИДНЫЙ INS/DEL ПОЛИМОРФИЗМ В ПРОМОТОРЕ *CASP8* ГЕНА СВЯЗАН С АЛЛЕРГИЕЙ У ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ

Пушкарев В.П.[1, 4], Дятлов Д.А.[2, 3], Никифоров В.С.[4], Пушкарева Ю.Э.[1], Яровинский Б.Г.[1]

[1] Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия
[2] Уральский государственный университет физической культуры, Челябинск, Россия
[3] ООО «Спортивные технологии», Челябинск, Россия
[4] Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск, Россия

Введение. Аллергические заболевания (АЗ) называют эпидемией третьего тысячелетия из-за их растущего распространения особенно в промышленно развитых странах. Считается, что АЗ и сенсибилизация встречаются чаще среди спортсменов, чем в общей популяции. Шартановой Н.В. (2012) представлены данные о высоком распространении АЗ (23,5%) у высококвалифицированных российских спортсменов. Анализ сцепления идентифицировал регион 2q32-q33 как связанный с астмой, атопическими фенотипами в различных популяциях. В этом же регионе расположен ген CASP8, который кодирует каспазу-8 – ключевое звено апоптоза, индуцируемого взаимодействием рецептора смерти с лигандом. Апоптоз участвует в регуляции количества лейкоцитов после физической нагрузки и зависит от ее интенсивности. Smith A.K. и соавт. (2008) выявили ассоциацию между полиморфизмами в CASP10 и CASP8 генах и $ОФВ_1$/ФЖЕЛ и гиперчувствительностью бронхов у астматиков. Sun T. и соавт. (2007) обнаружили 6-нуклеотидный Ins/Del полиморфизм в промоторном регионе CASP8 (rs3834129), который разрушает сайт прикрепления активатора транскрипции Sp1 и приводит к снижению экспрессии каспазы-8 в лимфоцитах.

Цель. Исследовать ассоциацию между rs3834129 и аллергией у высококвалифицированных российских спортсменов разных видов спорта.

Материалы и методы. Было обследовано 245 спортсменов (181 мужчина и 64 женщины; средний возраст ± стандартное отклонение = 26,8±12,2 лет), которые имели разряды: 1+КМС – 61, МС – 107, МСМК – 64, ЗМС – 13. Спортсмены занимались преимущественно циклическими видами спорта (плавание, бег, скоростной бег на коньках, лыжные гонки, триатлон). Информацию о наличии аллергии получили с помощью опроса. Все участники дали письменное информированное согласие. Геномную ДНК экстрагировали колоночным методом. Генотипирование проводили с помощью ПЦР (F-праймер: ACCTTCACATGCAGGAATCAT, R-праймер: CCATAGTAATTCTTGCTCTGCCA) с последующим гель-электрофорезом. Del (D) аллелю соответствовал ПЦР-продукт длиной 114 нуклеотидных пар (н.п.), Ins (I) аллелю -120 н.п. Статистический анализ проводили с помощью программы SNPSTATS (www.snpstats.net).

Результаты. 44 спортсмена (18%) сообщили о наличии аллергии. В общей структуре АЗ преобладали респираторные (аллергический ринит) и кожные проявления (атопический дерматит). Распределение генотипических и аллельных частот вариации rs3834129 CASP8 в основной (аллергия) и контрольной группе представлены в таблице.

В обеих группах генотипические частоты не отклонялись от равновесия Харди–Вайнберга. Аллельные частоты сходны со значениями для европеоидных популяций, представленными в браузере Ensembl Project. Различие генотипических частот между группами оценивали с помощью точного теста Фишера. Нулевая гипотеза отсутствия различия между генотипическими частотами была отклонена ($p = 0,018$). В соответствии с рецессивной моделью сравнили число людей с генотипом D/D против тех, у кого есть I аллель (I/D+I/I), между группами спортсменов с аллергией и без нее и выявили достоверное различие ($p = 0,012$). Полученное для этих двух групп отношение шансов (ОШ) = 0,32 показало, что шансы встретить в группе с аллергией людей с генотипом D/D примерно в 3 раза ниже, чем в контрольной группе. Так как границы 95% доверительного интервала 0,12-0,86 не включают 1, можно сделать вывод о статистической значимости выявленной связи между D/D генотипом вариации rs3834129 CASP8 и наличием аллергии, при уровне значимости $p < 0,05$.

Заключение. В группе квалифицированных российских спортсменов впервые выявлена ассоциация между вариацией rs3834129 CASP8 и наличием аллергии. D аллель и D/D генотип, которые приводят к снижению экспрессии каспазы-8 в лимфоцитах, обладают протекторным эффектом против развития аллергии. Вероятно, сниженная активность каспазы-8 у людей с D/D генотипом смягчает выраженность апоптоза в лимфоцитах крови, вызванного физическими нагрузками.

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ИНСЕКТНОЙ АЛЛЕРГИИ И ЕЕ УДЕЛЬНОГО ВЕСА В ОБЩЕЙ СТРУКТУРЕ АЛЛЕРГОПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ – ЖИТЕЛЕЙ МОСКОВСКОГО РЕГИОНА

Рыбникова Е.А.[1], Шабанов Д.В.[2], Федоскова Т.Г.[2], Продеус А.П.[1]

[1] ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗМ, Москва, Россия
[2] ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Актуальность проблемы инсектной аллергии (ИА) обусловлена высокой распространенностью насекомых в окружающей среде, непредсказуемостью контактов с ними, высокой частотой, остротой и тяжестью системных реакций, включая наиболее тяжелое проявление – анафилактический шок.

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ ПУШКАРЕВА В.П. И ДР.)

Группа	D/D	I/D	I/I	D	I
Основная	5 (0,11)	28 (0,64)	11 (0,25)	0,43	0,57
Контрольная	57 (0,28)	87 (0,43)	57 (0,28)	0,50	0,50

Проведен ряд исследований, отражающих распространенность ИА среди взрослого населения. Так, например, в России аллергия к жалящим насекомым отмечается у 0,1-0,4 % населения, к нежалящим насекомым – у 1,7-17,5%.

Среди детского населения проблема ИА является не менее острой. Однако в современной отечественной литературе практически отсутствуют данные по распространенности ИА среди детского контингента и особенностям клинического течения у детей. Несмотря на то, что в раннем детском возрасте тяжелые аллергические реакции на ужаления встречаются не часто, они отражены в литературе. Однако общепринятая шкала оценки тяжести реакций и единый лечебно-диагностический алгоритм ИА у детей также не разработаны.

Цель. Изучение распространенности ИА и ее удельного весе в общей структуре аллергопатологии среди детского населения московского региона.

Материалы и методы. Обследованы 350 детей московского региона в возрасте от 0 до 18 лет. Среди них сформирована группа из 140 детей (40%, n = 350), имеющих в анамнезе жалобы на выраженные местные и системные гиперергические реакции на ужаления и укусы насекомыми. Анкетирование проводили с применением специализированного опросника по раннему выявлению ИА, разработанного авторами в рамках выполнения работы.

Результаты. По результатам анкетирования у 140 (40%, n = 350) детей имеются в анамнезе жалобы на выраженные местные и системные гиперергические реакции при ужалениях и укусах насекомыми. Из них у 8,8% детей симптомы соответствовали системным реакциям различной степени тяжести (по классификации H. Mueller).

У 3 детей (2,1%, n = 140) в анамнезе отмечена анафилактическая реакция на ужаление осы, которая сопровождалась системными реакциями, такими как головокружение, шум в ушах, рвота, ангионевротический отек области глаз, а также выраженный ангионевротический отек с геморрагическим компонентом в месте ужаления, сохранявшийся более двух недель на фоне терапии местными и системными глюкокортикостероидами. У остальных детей отмечались местные реакции различной степени тяжести в виде болезненности, чувства жжения и распирания, распространенного отека, геморрагической сыпи в месте укуса и ужаления, в ряде случаев с последующим присоединением инфекционного воспаления в месте укуса/ужаления.

Из 140 детей (40%, n = 350) отобрано 48 пациентов (34%, n = 140), имеющих аллергопатологию с преобладанием в группе аллергического ринита у 84% (n = 140) и бронхиальной астмы у 67% (n = 140); 50% (n = 140) детей страдают поллинозом и 24% (n = 140) атопическим дерматитом.

У 12 детей (8,5%, n = 140) из группы с гиперергическими реакциями на насекомых отмечалась также непереносимость рыбы в анамнезе.

Симптомы ГЧ отмечены преимущественно при укусах комарами – 70,5% (n = 140), мошкой – 26,4%, слепнем – 17,6%, при ужалениях осами – 26,4%, пчелами – 8,8%.

Развитие симптомов ГЧ отмечено преимущественно в возрастных группах 5-7 лет – 33% (n = 140), и 8-13 лет – 42%, 14-18 лет – 22%, реже в группе детей 3-5 лет-3%. Однако возникновение выраженных системных анафилактических реакций отмечено у детей подросткового возраста 12-16 лет, имеющих преимущественно сенсибилизацию к бытовым и эпидермальным аллергенам.

Заключение. Результаты исследования подтверждают высокую распространенность ИА среди детского контингента и необходимость дальнейшей разработки и внедрения в клиническую практику единых алгоритмов выявления и обследования больных с ИА. Тяжесть системных реакций в отдельных клинических случаях доказывает актуальность изучения проблемы ИА у детей.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДЕБЮТОМ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ НА ЭНДОТОКСИНЫ

Серов Д.А.[1], Радзюкевич Я.В.[1], Косякова Н.И.[2], Прохоренко И.Р.[1]

[1] Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия
[2] Больница Пущинского научного центра РАН, Пущино, Россия

Введение. Бронхиальная астма (БА) – хроническое аллергическое воспаление дыхательных путей, ведущее к повышению концентрации провоспалительных цитокинов в крови. Для лечения широко используются как антилейкотриеновые препараты, так и ингаляционные глюкокортикостероиды (иГКС). Системное воспаление, сопровождающее БА, может приводить к компенсаторной гиперпродукции противовоспалительных цитокинов (sTNFRII, IL-1ra) и, как следствие, к снижению функциональной активности иммунных клеток, что увеличивает риск бактериемии, в т.ч. грамотрицательной. Эндотоксины являются одними из самых сильных бактериальных агентов и индукторов секреции провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-6, IL-8, IL-1β).

Цель. Оценка влияния терапии бронхиальной астмы в дебюте на ЛПС-индуцированные цитокиновые ответы клеток крови пациентов.

Материалы и методы. Исследование проводили на цельной крови пациентов с дебютом атопической бронхиальной астмы – АБА (n = 10). Забор крови для исследования осуществляли в клинических условиях до начала терапии и через 2 недели после начала терапии ингаляционным глюкокортикостероидом (флутиказон пропионатом) или монтелукастом *per os.* В стерильных условиях кровь инкубировали с 100 нг/мл ЛПС *E. coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, USA) в течение 6 ч для определения секреции TNFα, IL-6, IL-8 и 24 ч для определения концентраций IL-1β, IFNβ. Параллельно контрольные пробы инкубировали в отсутствие ЛПС. Пробы инкубировали при 37 °C, в атмосфере 5% CO_2. Концентрации цитокинов измеряли методом ИФА с использованием наборов реагентов (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) по инструкции, рекомендованной производителем. По результатам измерений рассчитывали средние значения с доверительными интервалами. Достоверность различий выборочных средних значений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для парных выборок. Проверку нормальности распределений оценивали с использованием критериев Шапиро–Уилка, Колмогорова–Смирнова.

Результаты. На фоне терапии АБА в контрольных сыворотках пациентов наблюдается достоверное снижение концентрации раннего провоспалительного цитокина IL-6 (с 206±92 до 17±6 пкг/мл), что может указывать на снижение активности воспалительного процесса. Через 2 недели терапии обнаружено достоверное увеличение

секреции TNFα и IL-6 в 2 и в 1,2 раза, соответственно, в ответ на эндотоксин *E. coli*, демонстрируя эффективность лечения на усиление ответов клеток врождённого иммунитета на потенциальные инфекционные агенты. Лечение иГСК, блокаторами CysLT1 не выявило статистически достоверных отличий в наработке цитокинов клетками крови в ответ на ЛПС. Лечение АБА не влияло на концентрации цитокинов IL-8, IL-1β, IFNγ, IL-1ra в контроле и в ответ на ЛПС *E. coli*.

Заключение. Терапия АБА снижает уровень провоспалительных цитокинов в крови пациентов, восстанавливая способность клеток врождённого иммунитета отвечать на антигены бактериальной природы (эндотоксины). Полученные данные показывают, что терапия АБА в первую очередь влияет на врожденный иммунитет. Использование иГКС в качестве основной терапии не изменило ЛПС-индуцированную секрецию про- и противовоспалительных цитокинов, что согласуется с недавними работами (Cohen et al., 2016), подтверждающими неоднозначную роль ГКС в снижении иммунного ответа на эндотоксины. Таким образом, исследованные варианты терапии оказывали сходные модулирующие эффекты на клетки врожденного иммунитета.

ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ СЕЗОННЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ В ПЕРИОДЫ ПОЛЛИНАЦИИ И РЕМИССИИ

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Семенова Н.И.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Согласно данным эпидемиологических исследований, распространенность сезонного аллергического ринита (САР) в популяции составляет от трех до двадцати процентов (Яшина Л.А., Игнатьева В.И., 2013). Патогенетической базой клинического проявления САР являются изменения иммунного реагирования, которые опосредованы формированием сенсибилизации. Раскрытие особенностей иммунопатогенеза САР является основой совершенствования терапии и предотвращения прогрессии этой патологии.

Цель. Изучение факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа у больных сезонным аллергическим ринитом легкой степени тяжести.

Были обследованы одни и те же пациенты (34 человека, средний возраст 30,0±5,6 лет) в активную фазу САР легкой степени и в условиях стойкой клинической ремиссии вне сезона пыления. Диагноз выставлялся в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями, с учетом Классификации международных согласительных документов по АР (EAACI//WAO, ARIA 2008). В качестве контроля обследованы 20 практически здоровых доноров крови. При оценке показателей иммунного статуса использовали проточную цитофлюориметрию с соответствующим набором моноклональных антител (anti-CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, FoxP3, GransimB). Метаболическую активность нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте, содержание сывороточных иммуноглобулинов – в реакции радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини, уровень IgE, IFNγ, TNFα, IL-6, IL-4 – методом ИФА. Статистическая обработка полученных данных проводилась с применением пакета прикладных программ Statistica 6.1.

Установлено, что в активную фазу заболевания активировано созревание Т-лимфоцитов (75,50±6,40%, в контроле 66,20±2,35%) с преимущественной дифференцировкой в сторону цитотоксической субпопуляции ($CD8^+$,% 30,74±5,49, в контроле 21,40±0,70) и усилением литических потенций этих клеток ($CD8^+Gr^+$,% 24,12±7,13, в контроле 9,80±1,23) при снижении процессов Т-клеточной негативной иммуносупресии ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$, % 1,09±0,45, в контроле 1,34±0,13). Также регистрируется увеличение количества В-клеток ($CD19^+$, % 10,38±2,82, в контроле 6,09±0,23) и активация их эффекторных свойств, документированное гипериммуноглобулинемией IgA (2,08±0,49 г/л, в контроле 1,42±0,15г/л), IgE (308,20±232,31 МЕ/мл, в контроле 78,20±11,47 МЕ/мл). В системе врожденного иммунитета выявлено усиление активности нейтрофилов по данным спонтанного НСТ-теста (97,38±10,81 у.е., в контроле 90,20±1,03 у.е.). Однако при дополнительной стимуляции нейтрофилов продукция активных форм кислорода ниже, чем в группе сравнения, что находит свое отражение в сниженном значении коэффициента стимуляции НСТ (1,54±0,24, в контроле 2,10±0,01). Анализ показателей $CD16^+$ клеток демонстрирует количественную сохранность (10,26±4,36%, в контроле 11,6±0,52%) при угнетении цитолитических свойств ($CD16^+Gr^+$,% 6,25±4,33, в контроле 10,20±0,79). Содержание в сыворотке крови провоспалительных медиаторов IL-6 (2,3±0,8 пг/мл) и TNFα (1,6±0,5 пг/мл), а также оппозитных цитокинов IL-4 (2,7±1,9 пг/мл) и IFNγ (6,2±2,4 пг/мл) статистически достоверно не изменено (в контроле 2,2±0,6; 1,6±0,5; 1,9±0,1; 5,4±1,0 пг/мл соответственно), однако параметры стандартных отклонений уровней IL-4 и IFNγ значительно превышают соответствующие контрольные критерии.

Исследование параметров иммунного статуса в период ремиссии выявило увеличение, в сравнении с нормативными данными, числа циркулирующих зрелых Т-лимфоцитов (74,56±4,97%), за счет Т-эффекторов ($CD8^+$,% 29,04±6,23) при активации их литических потенций ($CD8^+Gr^+$,% 23,79±6,20). В гуморальном звене определяется увеличение количества зрелых В-лимфоцитов (10,44±3,13%), гипериммуноглобулинемия IgA (1,99±0,44г/л), IgE (292,88±294,74 МЕ/мл). Нейтрофилы характеризуются снижением метаболизма в условиях дополнительной стимуляции *in vitro* (Кст. НСТ1,55±0,15 у.е.), а $CD16^+$ клетки отличает угнетение функциональных потенций ($CD16^+Gr^+$,% 6,56±4,56). Остальные исследованные показатели находятся в пределах контрольных значений.

Таким образом, выявленные, в сравнении с нормативными критериями, особенности функционирования иммунной системы у больных САР легкой степени в период активации соответствуют активации аллергического воспаления. Отличные от контрольных данных количественные и функциональные показатели врожденного и адаптивного иммунитета в стадии клинической ремиссии являются объективным доказательством нарушения системного иммунного реагирования даже в условиях отсутствия причинно-значимого аллергена.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Симакова Н.Ю., Григорян М.С, Аникина А.Н., Кривцова Ю.Н.

ФГБУ «Детский медицинский центр» УДП РФ, Москва, Россия

Введение. Актуальность: высокий уровень распространенности и заболеваемости аллергическими болезнями, в том числе и у детей. Распространенность аллергии за последние 20 лет увеличилась в 3-4 раза (в России, согласно официальной статистике, в 4-6 раз). Наиболее распространенными аллергическими заболеваниями являются: аллергический ринит, атопический дерматит, крапивница и бронхиальная астма. Большинство исследователей прогнозируют дальнейший рост заболеваемости, что диктует поиск новых путей решений проблемы, в частности применение современных методов диагностики, лечения и профилактики.

Цель. Оценка результатов обследования детей при аллергодиагностике.

Материалы и методы. В исследование включались дети в возрасте от 1 года до 18 лет (n = 579), наблюдавшиеся по поводу аллергических проявлений (заложенность носа, ринорея, приступы чихания, зуд в полости носа, зуд век, высыпания и зуд кожи, а также дети с частыми респираторными заболеваниями и рецидивирующей ЛОР патологией).

Проводилось обследование методом MAST диагностики (множественный аллергосорбентный тест) и определение общего уровня IgE в четырех возрастных группах.

Результаты. В ходе обследования аллергоспецифические IgE антитела были обнаружены у 50% детей (в группе с года до трех, в период обострения, составили 90%) и отмечался повышенный уровень общего IgE у 33% детей. Из них 70% детей страдали аллергическим ринитом (заболевание, обусловленное развитием аллергических реакций первого типа – IgE зависимых), уровень общего IgE ,во всех возрастных группах, был повышен в 5 раз, а при поливалентной высокой сенсибилизации – в 10 и более раз. Высокая степень сенсибилизации была выявлена у 58% детей к пыльцевым аллергенам: широко распространенным в нашем регионе древесным растениям (ольхе, березе, лещине), а также луговым травам (овсянице, еже сборной, тимофеевке). У 22% был обнаружен высокий уровень сенсибилизации к эпидермальным аллергенам: эпидермису кошки и собаки. У 18% детей – высокий уровень сенсибилизации к бытовым аллергенам: к домашней пыли и клещам. У 2% детей – высокий уровень сенсибилизации к пищевым аллергенам: яблоку, лесному ореху, моркови, яйцу, коровьему молоку. Отмечено, что для больных с атопией, сенсибилизированных к пыльцевым аллергенам, характерно наличие пищевой аллергии на фрукты (30%), орехи (15%), овощи (5%).

Эти данные еще раз подтверждают, что у больных с пыльцевой аллергией перекрестные аллергические реакции на фрукты и овощи развиваются чаще.

Выводы. 1. Повышенный уровень общего IgE может указывать на развитие атопического заболевания, обладает относительной информативностью, может оставаться нормальным при моносенсибилизации и в период ремиссии.

2. MAST-диагностику проводить и при нормальных значениях общего IgE, в период обострения заболевания. Обследование больных с сенсибилизацией к аллергенам растительного происхождения, выявление специфических IgE-антител к пыльцевым и пищевым аллергенам позволяют назначить больным адекватную элиминационную диету и специфическую иммунотерапию пыльцевыми аллергенами.

ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭНДОТИПЫ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ У ДЕТЕЙ

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

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Цель. изучить особенности иммунных механизмов, лежащих в основе патогенеза разных типов хронической крапивницы (ХК) у детей.

Материалы и методы. Обследовано 62 ребёнка от 9 мес. до 18 лет (9,4±0,72) с ХК, из которых 32 (52%) пациента от 0,9 до 18 лет (8,5±0,9) со спонтанной крапивницей (СК), 30 (48%) пациентов от 3 до 18 лет (11,8±0,9) со смешанной ХК с преобладанием индуцированных форм (ИК). Методом ИФА измерены уровень общего IgE, и концентрации компонентов комплемента (С3а, С4, С1 ингибитора, ООО "Цитокин"). Изучение активации базофилов проводили методом проточной цитометрии, (BECKMAN-COULTER).

Результаты. Выявлено повышение общего IgE в группе СК по сравнению с ИК. Отмечено повышение С3а в обеих группах детей с ХК. Снижение С4 у детей со СК достоверно отличалось от показателей С4 у детей с ИК. У пациентов с ИК С1 ингибитор повышен при сравнении со СК. У детей с ИК количество активированных базофилов было повышено у 19 (62%) пациентов, что достоверно отличалось от группы детей со СК.

Заключение. Данное исследование демонстрирует иммунологические различия в основе патогенеза различных эндотипов хронической крапивницы у детей.

ТАБЛИЦА. ПОКАЗАТЕЛИ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО РЕЗУЛЬТАТА В ИССЛЕДОВАНИИ (К ТЕЗИСАМ СИМАКОВОЙ Н.Ю. И ДР.)

Возраст	Обследованных	Положительный MAST		Положительный общий IgE	
		абс.	%	абс.	%
1-3	50	45	90	22	44
4-7	257	101	39	57	22
8-14	210	111	53	86	41
> 15	62	33	53	26	42
Всего	579	290	50	191	33

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ СИНЕЛЬНИКОВОЙ Н.А. И ДР.)

	СК	ИК	Норма	СК/ИК, p
IgE, МЕ/мл	158,8±47,4	90,8±19,34	< 100	p = 0,04
C3a, нг/мл	314,0±27,4	329,8±26,1	50-150	p>0,05
C4, мкг/мл	193,6±13,32	342,4±54,5	200-500	p = 0,01
C1inh,мкг/мл	345,72±28,4	477,9±45,2	150-350	p = 0,02
Базофилы, %	5,9±1,4	14,74±3,6	0-8	p = 0,002

СООТНОШЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССОВ E И G4 К АЛЛЕРГЕНУ ЯИЧНОГО БЕЛКА У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

Смолдовская О.В.[1], Волошин С.А.[1], Фейзханова Г.У.[1], Бутвиловская В.И.[1], Арефьева А.С.[1], Павлушкина Л.В.[2], Резников Ю.П.[3], Рубина А.Ю.[1]

[1] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия
[2] Городская детская клиническая больница № 13 им. Н.Ф. Филатова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия
[3] ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» УД Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. IgE-ассоциированная аллергия к яйцу встречается у 8,9% детей развитых стран. При этом наличие специфических иммуноглобулинов класса E (sIgE) не является обязательным условием клинического проявления пищевой аллергии. Иногда это связано с наличием аллерген-специфических иммуноглобулинов класса G, включая G4, выступающих в качестве блокирующих антител, поэтому отношение sIgE/sIgG4 рассматривают как предиктор толерантности при оценке эффективности АСИТ.

Цель. Изучение отношения sIgE/sIgG4 к аллергену яичного белка у детей дошкольного возраста и оценка его поведения с возрастом.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты ДГКБ им. Н.Ф. Филатова в возрасте от 6 месяцев до 7 лет с аллергическими симптомами. Анализ sIgE и sIgG4 в образцах сыворотки крови пациентов проводили на биологических микрочипах, содержащих ячейки с иммобилизованными аллергенами, в том числе с аллергеном яичного белка. Выявление комплексов аллерген–антитело, образующихся при инкубации образцов с биочипом, проводили с использованием проявляющих антивидовых антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями Cy5 (anti-IgE-Cy5) и Cy3 (anti-IgG4-Cy3). Измерение флуоресцентных сигналов, Cy3-фл.ед. и Cy5-фл.ед., а также определение соответствующих концентраций sIgE и sIgG4 проводили на аппаратно-программном комплексе (УАПК). Отношение sIgE/sIgG4 (Cy3-фл.ед./Cy5-фл.ед.) было рассчитано для каждого из пациентов, по полученным данным определялись средние значения для групп выборки.

Результаты. Рассчитанные значения суммарной статистики, количество пациентов с уровнями sIgE и sIgG4 к яичному белку, превышающими детектируемые значения, а также размер выборок для каждой возрастной группы и приведены в таблице. Средние значение sIgE/sIgG4 уменьшается с увеличением возраста пациентов в группе, однако по U-критерию Манна–Уитни достоверных различий ($P < 0,05$) между средними соседних возрастных групп нет. При этом достоверно различаются средние и медианные значения sIgE/sIgG4 объединенных групп детей: 6 мес.-2 года и 2-4 года ($P < 0,0001$), а также 2-4 года и 4-7 лет ($P = 0,0109$).

Заключение. Наблюдаемое уменьшение отношения sIgE/sIgG4 к белку яйца подтверждает активную роль sIgG4 в формировании толерантности к соответствующему аллергену с возрастом, при этом определяющим является не абсолютный уровень sIgG4, а его соотношение с sIgE.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (соглашение № 14-50-00060).

МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ: ПРИМЕНЕНИЕ ТЕЛЕСНО-ОРИЕНТИРОВАННОЙ ПСИХОКОРРЕКЦИИ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Смык А.В., Маркова Е.В.

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

Введение. Бронхиальная астма (БА) является иммунопатологическим процессом, протекающим в форме

ТАБЛИЦА. ИЗМЕНЕНИЕ ОТНОШЕНИЯ sIgE/sIgG4 К БЕЛКУ ЯЙЦА С ВОЗРАСТОМ (К ТЕЗИСАМ СМОЛДОВСКОЙ О.В. И ДР.)

Параметр/возраст, полных лет	0	1	2	3	4	5	6
N	27	31	29	27	26	24	14
N (sIgE > 0,35 МЕ/мл)	7	4	10	10	6	4	4
N (sIgG4 > 100 нг/мл)	6	8	25	18	21	21	12
Среднее значение sIgE/sIgG4, Cy5-фл.ед./Cy3-фл.ед.	1,91	1,26	1,14	0,79	0,7	0,64	0,47
Средние (медианные) значения sIgE/sIgG4,Cy5-фл.ед./Cy3-фл.ед. для объединенных групп	1,56 (1,27)		0,97 (0,47)		0,63 (0,27)		

хронического воспалительного заболевания дыхательных путей, вызывающего их гиперреактивность, обструкцию и респираторные симптомы. При этом указанная патология является классическим психосоматическим заболеванием, в основе которого лежат как физиологические, так и психологические причины, в том числе стресс и личностные особенности пациента, в частности алекситимия. Нами была разработана медицинская технология лечения пациентов с БА средней степени тяжести, которая, кроме стандартной медикаментозной терапии, включает в себя курс телесно-ориентированной психокоррекции (ТОП), направленный на снижение уровня алекситимии, как одного из важных патогенетических факторов БА.

Цель. Определение эффективности применения медицинской технологии на базе ТОП в комплексном лечении БА.

Материалы и методы. Нами обследованы 180 пациентов, которые были разделены на две группы. С пациентами первой группой проводилась ТОП в соответствии с разработанной нами медицинской технологией. Пациентам второй группы (контрольной) назначалось обследование и медикаментозное лечение по аналогичной схеме, за исключением курса ТОП. При обследовании пациентов применялся комплекс экспериментально-психологических (оценка уровня алекситимии; оценка уровня контроля бронхиальной астмы) и иммунологических методов (определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и фагоцитоза латексных частиц моноцитами и нейтрофилами методом проточной цитофлюорометрии).

Результаты. Установлено, что ТОП снижает уровень алекситимии у больных бронхиальной астмой до нормативных значений. Снижение уровня алекситимии в процессе психокоррекционного воздействия сопровождается улучшением функции внешнего дыхания и возрастанием активности клеточного звена иммунной системы, симпатического отдела вегетативной нервной системы и уровня стрессорных гормонов, свидетельствующих о повышении эрготропных функций организма, что наиболее выражено у больных с доминирующим правым полушарием головного мозга.

Заключение. Представленные нами результаты свидетельствуют о том, что введение ТОП в терапию пациентов, страдающих БА, позволяет достичь более выраженного терапевтического эффекта по сравнению со стандартной медикаментозной терапией. Таким образом, предлагаемая медицинская технология показала свою эффективность в комплексной терапии БА.

ЧУСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН К ВОЗДЕЙСТВИЮ СВИНЦА У ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Супрун Е.Н., Супрун С.В., Гусева О.Е., Пивкина Т.В.

Хабаровский филиал ДНЦ ФПД – Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровск, Россия
Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск, Россия

В предыдущих работах нами исследованы особенности спонтанной трансформации эритроцитарных мембран у детей с бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми и в зависимости от тяжести заболевания. Однако большой интерес представляет не только нативное состояние клеточной мембраны у таких детей, но и ее чувствительность к различным неблагоприятным воздействиям. В качестве модельного токсиканта нами выбран свинец как один из наиболее распространенных. Он содержится, в том числе, в автомобильных выхлопах и поэтому присутствует во всех регионах.

Нами обследовано 20 детей с бронхиальной астмой в возрасте от 2 до 17 лет. Им проводилась оценка спонтанной трансформации эритроцитов, методом микроскопирования под световым микроскопом в нативном мазке взвеси цельной крови, затем вносился раствор солей свинца *in vitro*, и оценивалось изменение показателей трансформации под их воздействием. Клиническое состояние детей, страдающих бронхиальной астмой, оценивалось согласно стандартам GINA-2015.

В ходе исследования выявлены некоторые корреляционные связи между тяжестью течения бронхиальной астмы и степенью воздействия свинца на клеточные мембраны. В частности, обнаружена сильная достоверная обратная корреляционная связь ($R = -0,74$) между степенью тяжести заболевания и изменением количества дискоцитов под воздействием свинца, сильная прямая корреляционная связь ($R = 0,73$) между тяжестью заболевания и изменением количества переходных форм эритроцитов в целом. Что же касается конкретных видов переходных форм эритроцитов, то обнаружена сильная прямая достоверная корреляционная связь ($R = 0,92$) степени тяжести бронхиальной астмы и количества сфероидов с одной стороны, и сильная обратная достоверная корреляционная связь ($R = -0,68$) степени тяжести заболевания и количества эхиноцитов.

Таким образом, свинец в большей степени повреждает клеточные мембраны у больных с более тяжелым течением бронхиальной астмы, что выражается в большем снижении количества нормальных форм эритроцитов – дискоцитов и, соответственно, повышении первичных переходных форм – сфероидов под воздействием свинца. Что касается дальнейшего пути трансформации, то наличие обратной сильной корреляционной связи с числом эхиноцитов, позволяет предположить, что свинец стимулирует трансформацию по стоматоцитарному пути, который, как было показано в предыдущей работе, характерен для детей, страдающих бронхиальной астмой, и при спонтанной трансформации эритроцитов.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ АЛЛЕРГЕНОМ «ОСЕННЯЯ СМЕСЬ ТРАВ»

Хабибулина Л.Р., Манжос М.В., Мазоха К.С., Асеева Е.В., Козлова О.С.

Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия

Поллиноз – это хроническое аллергическое заболевание, которое вызывается пыльцой растений и чаще всего проявляющееся клиническими симптомами аллергического ринита, конъюнктивита и бронхиальной астмы. Аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) является единственным патогенетическим методом лечения, позволяющим изменить естественное течение заболевания.

Цель. Провести сравнительную оценку эффективности АСИТ аллергеном «Осенняя смесь трав» («Севафар-

ма», Чехия) у пациентов с поллинозом на территории г. Самары и г. Пензы.

Материалы и методы. АСИТ была проведена с 2012 по 2016 гг. в группе, состоящей из 133 пациентов в возрасте от 3 до 65 лет с диагнозом «поллиноз» и сенсибилизацией к пыльце полыни. У 26% пациентов были зарегистрированы также и симптомы бронхиальной астмы. Иммунотерапию проводили предсезонным методом, средняя курсовая доза вводимого аллергена составила 80172 PNU. Эффективность оценивалась по суммарной шкале баллов с учетом тяжести симптоматики заболевания и потребности в фармакотерапевтических средствах. В состав лечебной смеси "Осенняя смесь трав" входят следующие экстракты – полынь горькая (*Artemisia absinthium L.*), полынь обыкновенная (*Artemisia vulgaris L.*), золотарник канадский (*Solidago Canadensis L.*).

Результаты. После I курса АСИТ отличные и хорошие результаты получены у 34,6% пациентов, удовлетворительные – у 54,1%. Отмечено уменьшение интенсивности симптомов с 13±4,49 до 8±4,17 баллов (p = 0,0001), снижение потребности в терапии с 3±1,76 до 2±1,62 баллов (p = 0,0001). Терапия была неэффективной у 11,3% больных.

После II курса АСИТ отличные и хорошие результаты получены у 43,2% пациентов, удовлетворительные – у 47,4% человек. Интенсивность симптомов по сравнению с первым годом лечения уменьшилась до 7±3,77 баллов (p = 0,0010), потребность в лекарственных препаратах существенно не изменилась (p = 0,0700). У 9,5% пациентов положительной динамики симптомов не наблюдалось. После III курса АСИТ количество пациентов с отличными и хорошими результатами увеличилось до 51,4%, у 40,5% больных отмечались удовлетворительные результаты терапии, лечение было неэффективным у 8,1% пролеченных пациентов.

При сравнении полученных данных с результатами ранее проведенных исследований показано, что эффективность АСИТ аллергеном «Осенняя смесь трав» в Самаре ниже, чем в Пензе, где отличные и хорошие результаты по окончании I курса лечения зарегистрированы у 84% пациентов (p = 0,0001), после II курса АСИТ – у 88% больных (p = 0,0001), а пациентов без положительного эффекта от проводимой иммунотерапии не было. Вероятно, это связано с различными аэропалинологическими характеристиками данных регионов и доминированием в атмосфере г. Самары в летне-осенний период пыльцы амброзии трехраздельной, а не полыни, как в г. Пензе.

Заключение. Иммунотерапия аллергеном «Осенняя смесь трав» («Севафарма», Чехия) приводит к уменьшению клинических проявлений заболевания, ее эффективность определяется наличием в лечебной смеси аллергена, доминирующего в аэропалинологических характеристиках региона.

ВОЗМОЖНОСТИ СИСТЕМНОЙ ЭНЗИМОТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Чурюкина Э.В., Сизякина Л.П.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Бронхиальная астма (БА) – это гетерогенное иммунозависимое заболевание. Особый интерес представляет фенотип БА с сопутствующим синдромом вторичной иммунной недостаточности (ВИН) и наличием коморбидной патологии, ассоциированной с метаболическим синдромом (ожирением, стеатозом печени, панкреатитом), ввиду частой встречаемости и общностью некоторых патогенетических механизмов (Чурюкина Э.В., Сизякина Л.П., 2016). Наличие противовоспалительного, фибринолитического, противоотечного, иммуномодулирующего свойств, доказанного влияния на систему гомеостаза препаратов системной энзимотерапии (СЭТ) побудило изучить их использование в комплексном лечении иммунокомпрометированных больных БА с метаболическим синдромом (МС).

Цель. Оценить эффективность и безопасность использования СЭТ вобэнзимом в комплексном лечении больных БА с сопутствующим синдромом ВИН и наличием коморбидной патологии, ассоциированной с МС.

В исследовании приняли участие 55 пациентов, страдающих БА с сопутствующим синдром ВИН, в возрасте от 18 до 55 лет. Больные были разделены на две группы: контрольная группа – 35 пациентов, получавших стандартную терапию (ИГКС, ДДБА), и группа, с оптимизацией стандартного лечения препаратом СЭТ – вобэнзимом по схеме: 5 драже внутрь не менее чем за 30 минут до еды, не разжевывая, запивая водой три раза в день – 20 больных с сопутствующими заболеваниями ЖКТ (гастродуоденит, колит) и коморбидной патологией, ассоциированной с МС. Результаты оценивали по динамике клинико-функционального, иммунологического обследования. Установлена положительная динамика клинических проявлений БА (4,8±0,2 – до лечения, 2,6±0,9 баллов – на фоне лечения вобэнзимом; контрольная группа – 4,7±0,9 до лечения, 3,9±0,8 – после лечения; ночные симптомы 3,2±0,4 – до лечения, 2,0±0,7 – на фоне лечения вобэнзимом; контрольная группа 3,2±0,8 – до лечения, 3,0±0,5 – после лечения), улучшение бронхиальной проходимости (ПСВ на фоне лечения вобэнзимом до 70,1±2,2%, контрольная до 66,9±4,0%; ЖЕЛ – до 88,7±2,4%, 78,7±2,4% соответственно), снижение потребности в β_2-агонистах короткого действия. В иммунном статусе: у больных, получавших СЭТ, увеличение популяции зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$ 69,6±2,8%); Т-хелперов ($CD4^+$ 40,6±3,2%), уменьшение числа $CD95^+$ лимфоцитов (рецепторов маркирующих готовность к апоптозу): 2,6±0,7% (в контрольной группе оставался повышенным: 6,2±0,5%). В гуморальном звене – снижение его исходной гиперактивности: снижение изначально повышенного уровня содержания $CD20^+$ лимфоцитов (до 8,36±0,44%) и IgE общего в сыворотке крови (70,8±17,2, исходно – 128,6±14,3 г/л). Обнаружена особенность динамики ЦИК: через 2 недели после начала СЭТ – резкое увеличение в сыворотке крови (160,69±46,4 у.е., до лечения – 129,8±32,7 у.е.), а после окончания курса СЭТ – достоверное и значительное его снижение (62,4±12,4 у.е.) (что объясняется способностью системных энзимов расщеплять не только циркулирующие в крови ИК, но и фиксированные в тканях и вывод их в кровеносное русло с дальнейшим их ингибированием). В фагоцитарном звене – достоверные изменения стимулированного кислородзависимого метаболизма по сравнению с исходными показателями (повышение коэффициента стимуляции (1,46±0,29 – до СЭТ, 1,87±0,26 – после лечения). Оценка цитокинового статуса больных обнаружила снижение повышенных

фоновых значений IL-2, IL-4, IFNγ в сыворотке крови и назальных смывах у пациентов получивших СЭТ вобэнзимом через 2 недели. При этом изменения носили специфический характер: уровень IL-2 имел тенденцию к снижению (в 1,7 раз) в сыворотке крови и увеличению в назальных смывах (в 2,3 раза), тенденция повышения уровня IFNγ в сыворотке крови (до 6,96±1,02 пг/мл) и назальных смывах (до 8,88±3,24 пг/мл), а также снижение IL-4 в сыворотке крови (в 1,7 раз) и в назальных смывах (в 2 раза), что показало участие системных энзимов в регуляции цитокинов. Анализ динамики показателей гуморального и фагоцитарного звеньев иммунной системы у больных контрольной группы не выявил значимых изменений, обнаружил тенденцию к угнетению клеточного звена, нарушению соотношения Th1/Th2 с преобладанием Th2. Таким образом, включение в комплексную базисную терапию БА с ВИН, препарата СЭТ вобэнзима сопровождается улучшением параметров функционального состояния бронхов, интенсификацией функциональной активности клеточного и стабилизацией гуморального звеньев, уменьшением ЦИК на фоне позитивных изменений основных маркеров атопии (IL-4, общий IgE). Полученные данные убеждают в безопасности включения препарата СЭТ в комплексное лечение больных БА, повышении эффективности базисной терапии, улучшении контроля над течением заболевания, позволяют выработать показания к назначению вобэнзима иммунокомпрометированным больным БА с коморбидной патологией, ассоциированной с метаболическим синдромом.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ АЛЛЕРГЕНОВ ЯДА МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ

Шабанов Д.В.[1,3], Федоскова Т.Г.[1], Мартынов А.И.[1], Рыбникова Е.А.[2], Мирославский О.В.[1], Мухтеремова Г.А.[1]

[1] ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия
[2] ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗМ, Москва, Россия
[3] ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Значимость аллергии на яд перепончатокрылых не вызывает сомнения вследствие широкой распространенности жалящих насекомых (ЖН), непредсказуемости контактов с ними, тяжести и стремительности развития угрожающих жизни симптомов при ужалении. Распространенность аллергии к ЖН в нашей стране достигает 8%. Системные реакции встречаются в 5,3% случаев реакций на ужаления. В педиатрической практике частота системных реакций значительно ниже. Так, частота анафилактического шока на ужаления насекомыми у детей составляет 0,3-1,0% среди всех случаев анафилаксии. Учитывая характерные для России многовековые традиции пчеловодства, тяжесть и выраженность реакций при ужалении медоносными пчелами, наибольший интерес представляют реакции на ужаление указанными ЖН. Диагностики данного вида аллергии осуществляется путем тщательного опроса, проведения кожного тестирования и выявления специфических IgE к конкретным аллергенам насекомых. Однако в нашей стране отсутствуют зарегистрированные лечебно-диагностические аллергены ЖН, в т.ч. и Пчелы медоносной, для кожного тестирования, вследствие чего лабораторная диагностика приобретает особую значимость. Золотым стандартом можно считать компонентную *in vitro* аллергодиагностику ImmunoCAP (Pharmacia Diagnostics AB). Однако для диагностики аллергии на яд пчел ситуация не однозначна. В соответствии с WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee в яде Пчелы медоносной зарегистрировано 12 аллергенов, а системы диагностики включают компоненты пяти аллергенов (rApi m1 Phospholipase A2, i208; rApi m2 Hyaluronidase, i214; rApi m5 Dipeptidyl peptidase, i216; rApi m10 Icarapin, i217), также используется суммарный аллерген Пчелы медоносной Apis mellifera i1 и компоненты в составе панели ISAC rApi m1 Phospholipase A2, nApi m4 Melittin. Таким образом, специфическая IgE диагностика возможна только для 5 аллергенов из 12. Другими методиками диагностики аллергии на яд медоносных пчел являются тест базофильной активации по молекулам $CD63^+$ и CD203c и определение уровня лейкотриенов после стимуляции аллергеном.

Цель. Изучение распространенности ИА к ЖН и особенностей патогенеза ИА с применением лабораторной диагностики.

Материалы и методы. Из 930 обследованных пациентов отобрана группа 55 человек с анамнестическими данными о развитии гиперергических реакций на ужаление пчелой. Проведено исследование уровня общего и спец. IgE к яду пчел и ос (использовались классический ИФА с отечественными и зарубежными аллергенами и метод ImmunoCAP® (Pharmacia Diagnostics AB), также проведено исследование экспрессии $CD63^+$ и CD203c после стимуляции клеток ядом Apis mellifera по методике FlowCAST® (B hlmann laboratory).

Результаты. В результате обследования группы пациентов (n = 55) выявлено повышение общего IgE менее чем в 50% случаев, а специфических IgE к яду ЖН у 32 больных (58%). При исследовании базофильной активации получено, что активация по $CD63^+$ выявлена у 39 пациентов (71%), что подтверждает IgE-опосредованный характер реакции. При исследовании базофильной активации по молекулам CD203c в группе IgE опосредованной реактивности (39 пациентов – 71%) выявлена значительная активация $CD203c^{bright}$. В то же время у 16 пациентов, при обследовании которых не обнаружено спец. IgE, $CD63^-$neg, выявлена умеренная активация $CD203c^{dim}$. Таким образом, результаты обследования свидетельствуют о наличии у 29% не-IgE-опосредованной аллергии на яд медоносных пчел.

Заключение. Аллергия на яд перепончатокрылых способствует снижению качества жизни и служит причиной серьезных социально-экономических проблем. Снижению качества жизни способствует несвоевременность постановки диагноза и позднее назначение адекватной терапии. Результаты исследования подтверждают необходимость дальнейшего изучения особенностей патогенеза ИА, внедрение в лабораторную диагностику полного спектра аллергенов медоносных пчел, а также необходимость разработки и использования в клинической практике единых алгоритмов обследования больных с аллергией на яд ЖН.

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПСОРИАЗА И ПСОРИАТИЧЕСКОГО АРТРИТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

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

ФИЦ КНЦ СО РАН «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», Россия, Красноярск

Цель. На основании изучения основных показателей клеточного и гуморального звена иммунитета провести сравнительный анализ в зависимости от степени тяжести псориаза и псориатического артрита.

Материалы и методы. В исследование включены больные вульгарным псориазом (ПС, n = 67), больные псориатическим артритом (ПсА, n = 60), контрольная группа (n = 101). Возраст обследуемых варьировал от 18 до 66 лет. Больные ПС и ПсА обследованы в прогрессирующую стадию кожного процесса. В зависимости от степени тяжести кожного процесса, которая оценивалась по индексу PASI (Psoriasis area and severity index), больные разделены на группы: легкая степень тяжести – PASI < 10 баллов, среднетяжелая степень тяжести – PASI ≥ 10,0 баллов. Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови оценивали по поглощению латексных частиц. Определение показателей клеточного звена иммунитета проводилось методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 (ТОО «Сорбент», Москва, Россия) на проточном 5-параметровом цитометре Cytomics™ FC 500 (США). Гуморальное звено иммунитета оценивалось определением концентрации иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) в сыворотке крови путем твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) в сыворотке крови оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «DIA.METRA CIC-C1 и CIC-C3D» (Италия). Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Результаты исследования представлены в виде медианы с интерквартильным размахом (25-75-й процентили). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Выявлены изменения иммунологических показателей в зависимости от степени тяжести клинических проявлений ПС и ПсА. Так, в группе больных ПС легкой степени тяжести количество фагоцитирующих нейтрофилов статистически значимо выше (58,0% [38,0; 67,0] и 43,0% [32,0; 65,0] соответственно), а фагоцитарное число статистически значимо ниже в сравнении с группой больных ПС среднетяжелой степени тяжести (4,0 [3,8; 4,7] и 4,7 [4,1; 5,5] соответственно). При сравнительном анализе концентрации ЦИК-C3d в сыворотке крови больных ПсА и ПС в зависимости от степени тяжести заболевания установлено, что у больных легкой степени тяжести ПсА концентрация ЦИК-C3d в сыворотке крови статистически значимо выше в сравнении с группой больных ПсА среднетяжелой степени тяжести: 38,8 мг/мл [29,7; 46,5] и 22,5 мг/мл [17,5; 35,3] соответственно). В группе больных ПС среднетяжелой степени тяжести концентрация ЦИК-C3d в сыворотке крови статистически значимо выше в сравнении с группой больных ПС легкой степени тяжести: 21,4 мг/мл [16,3; 29,5] и 17,9 мг/мл [12,9; 19,9] соответственно). При сравнении основных иммунологических показателей клеточного иммунитета в зависимости от степени тяжести ПС и ПсА не выявлено статистически значимых межгрупповых различий в относительном и абсолютном количестве $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD19^+$ лимфоцитов, концентрации IgA, IgM, IgG.

Выводы. Установлены изменения иммунологических параметров в зависимости от тяжести клинических проявлений заболевания: при псориазе легкой степени тяжести относительно среднетяжелой, количество фагоцитирующих нейтрофилов в периферической крови статистически значимо выше, а фагоцитарное число ниже; при псориазе среднетяжелой степени тяжести относительно легкой и псориатическом артрите легкой степени тяжести относительно среднетяжелой, концентрация ЦИК-C3d в сыворотке крови статистически значимо выше. Полученные показатели свидетельствуют о наличии сопряженности изменений в клеточном и гуморальном звеньях иммунитета со степенью тяжести псориаза и псориатического артрита.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НА ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ХРОМОСОМАХ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Барковская М.Ш., Богомолов А.Г., Кнауэр Н.Ю., Блинова Е.А., Сизиков А.Э., Рубцов Н.Б., Козлов В.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Введение. Длина теломерных последовательностей клетки является важным индикатором ее пролиферативной истории и потенциала. В предыдущих исследованиях было показано, что средняя длина теломер при заболеваниях атопической и аутоиммунной природы снижена в клетках иммунной системы, что может служить признаком раннего старения при иммуноопосредованных заболеваниях. Также на настоящий момент известно, что теломерные повторы распределены на различных плечах

индивидуальных хромосом неравномерно. Это явление получило название теломерного профиля, который считается врожденной особенностью индивидуума и может оказывать влияние на ускоренное старение иммунной системы.

Цель и задачи. Исследовать характер распределения теломерных последовательностей на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с РА в сравнении со здоровыми донорами.

Задачи:

– оптимизация метода количественной флуоресцентной гибридизации *in situ* (Q-FISH) для оценки длин теломерных последовательностей у пациентов с иммунопатологией;

– разработка программного обеспечения, позволяющего проводить количественный анализ теломерных повторов на Q-FISH изображениях метафазных пластинок;

– измерение сигналов флуоресценции теломерных последовательностей и проведение цитогенетического анализа на препаратах метафазных хромосом доноров и пациентов с РА.

Материалы и методы. В исследование были включены условно здоровые доноры (n = 6, медиана возраста 51,5 [49-53]) и пациенты с РА (n = 6, медиана возраста 51,5 [50-54]). Работа проводилась на препаратах метафазных хромосом, полученных из МНК периферической крови. У всех испытуемых было получено информированное медицинское согласие на исследование. На момент забора материала все пациенты находились на лечении в Клинике иммунопатологии НИИФКИ г. Новосибирска в стадии обострения основного заболевания. Диагностика заболевания проводилась специалистами клиники в соответствии с критериями ACR/EULAR 2010. Для определения длины теломер был использован метод Q-FISH с последующей идентификацией хромосом в соответствии с ISCN 2013. В ходе работы были модифицированы методические условия, что улучшило морфологию метафазных хромосом и позволило сделать цитогенетический анализ более достоверным. Также было создано программное обеспечение (MeTeLen) (http://www.bionet.nsc.ru/en/development/application-development/development-of-a-computer/metelen.html), позволяющее проводить анализ количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом в Q-FISH-изображениях. Тестирование и валидационные эксперименты показали, что созданная программа и модифицированная методика могут служить для корректного вычисления длины теломер у пациентов с РА и здоровых доноров.

Результаты. Поскольку теломерный профиль является индивидуальной характеристикой, то было проанализировано наличие укороченных теломерных последовательностей на отдельных плечах индивидуальных хромосом относительно средней длины теломер для каждого испытуемого отдельно. У пациентов с РА было обнаружено большее количество достоверно укороченных теломер, чем у здоровых доноров. При сравнении теломерных профилей между группами, было обнаружено, что длина теломерной последовательности на p-плече 16 хромосомы у пациентов с РА достоверно меньше, чем у доноров ($p < 0,05$; U-критерий Манна–Уитни).

Заключение. Выявленные особенности длины теломер пациентов с РА, с одной стороны, могут быть результатом пролиферативного стресса, который возникает в результате массового деления клеток иммунной системы в процессе аутоиммунной реакции. С другой стороны, укороченная длина теломер на p-плече 16 хромосомы при РА может иметь значение для патогенеза этого заболевания. Так, укорочение теломер может приводить к повышенной экспрессии генов, расположенных рядом с теломерными регионами. В 13 регионе p плеча 16 хромосомы локализуется ряд генов (CIITA, CLEC16A, DNAJA3, SOCS1, TRAP 1), которые ассоциированы с РА или могут принимать участие в его патогенезе. Кроме того, можно предположить, что наличие большого количества укороченных теломер может способствовать гибели клетки через апоптоз. Потому что именно эти теломерные последовательности могут первыми подвергаться критическому укорочению, приводить к слиянию хромосом конец-в-конец и повреждению генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-15-00346.

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ/ХЕМОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ПЕЧЕНИ

Бацунов О.К.[1, 3], Арсентьева Н.А.[1], Любимова Н.Е.[1], Смирнова М.Н.[2], Семенов А.В.[1, 3], Тотолян Арег А.[1, 3]

[1] ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[2] СПБГУЗ «Городская клиническая больница № 31», Санкт-Петербург, Россия
[3] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Аутоиммунный гепатит (АИГ) – это хроническое воспалительное иммунозависимое заболевание печени. Характеризуется неблагоприятным течением с высокой частотой и быстрыми темпами развития цирроза печени. К аутоиммунным заболеваниям печени относится и первичный билиарный цирроз (ПБЦ), проявляющийся в виде малосимптомного хронического деструктивного негнойного холангита, далее проходящего стадию холестаза, которая завершается формированием цирроза. В основе патогенеза обоих заболеваний лежит развитие иммунных процессов против собственных тканей организма. Значительную роль в развитии любых иммунных реакций играют цитокины – регуляторные пептиды иммунной системы. Отдельную группу составляют хемокины – семейство цитокинов, основная функция которых состоит в контроле клеточной миграции. При гепатите в печени усиленно продуцируются провоспалительные хемокины, вызывая миграцию лейкоцитов с периферии в печеночную паренхиму, что активирует иммунные процессы в очаге воспаления. Вследствие этого изучение цитокинового/хемокинового профиля в периферической крови пациентов позволят глубже понять механизмы иммунопатологии при различных формах гепатитов, а также выявить параметры с потенциалом биомаркеров для этих заболеваний.

Цель. Определение концентраций некоторых цитокинов/хемокинов в плазме крови больных аутоиммунными поражениями печени.

Материалы и методы. В работе была использована плазма крови 24 больных аутоиммунными поражениями печени, из них 10 – с диагнозом аутоиммунный гепатит, 14 – с диагнозом первичный билиарный цирроз и 37 – условно здоровых доноров. В ходе эксперимента использовали коммерческие тест-системы Milliplex MAP (Millipore,

США), основанные на технологии Luminex xMAP (Luminex, США) с применением магнитных микросфер Milliplex Mag. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX (Luminex,США). Определяли концентрация следующих цитокинов/хемокинов: IFNγ, TNFα, CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3α, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/I-TAC.

Результаты. В плазме крови больных АИГ и больных ПБЦ концентрация CCL8/MCP-2 была снижена (для АИГ Me = 14,7 [Q1 = 8,2 – Q3 = 18,7] пкг/мл, p < 0,001, ПБЦ – 15,7 [9,9-21,2] пкг/мл, p < 0,001), в группе здоровых доноров 37,8 [29,9-44,3] пкг/мл. В плазме крови больных в обеих группах увеличены концентрации хемокинов: CXCL9/MIG (для АИГ 2311 [1250-4901] пкг/мл, p = 0,0004, ПБЦ – 2873 [1940-6806] пкг/мл, p < 0,0001, в группе здоровых доноров 441,1 [341,9-806,9] пкг/мл), CXCL10/IP-10 (АИГ – 634,6 [461,0-911,7] пкг/мл, p < 0,0001, ПБЦ – 1053 [607-1518] пкг/мл, p < 0,0001, в группе здоровых доноров 183,5 [112,9-254,7] пкг/мл), CCL2/MCP-1 (АИГ – 233,7 [194,3-290,4] пкг/мл, p = 0,0028, ПБЦ – 266,9 [160,8-432,0] пкг/мл, p = 0,001, в группе здоровых доноров 143,7 [102,7-200,4] пкг/мл). В плазме крови больных больных ПБЦ также увеличены концентрации следующих цитокинов/хемокинов: CXCL11/I-TAC (у больных – 141,2 [94,1-293,1] пкг/мл, p = 0,0026, в группе здоровых доноров 77,9 [57,7-124,2] пкг/мл) и TNFα (у больных – 8,8 [6,1-13,6] пкг/мл, p = 0,0227, в группе здоровых доноров 6,8 мл [5,9-8,6] пкг/).

Заключение. В результате проведенного исследования показано, что в плазме периферической крови больных аутоиммунным гепатитом повышена концентрация хемокинов CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, а больных первичным билиарным циррозом – также повышена концентрация этих хемокинов и, кроме того, концентрации CXCL11/I-TAC и TNFα. Также показано, что в плазме периферической крови обеих групп пациентов снижена концентрация хемокина CCL8/MCP-2.

ВЛИЯНИЕ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ В-КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Будкова А.И.[1], Мазинг А.В.[1], Серебрякова М.К.[3], Кудрявцев И.В.[1,3], Тришина И.Н.[2], Маслянский А.Л.[2], Тотолян Арег А.[1,4]

[1] ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[3] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[4] ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Введение. В-лимфоциты выполняют ряд функций. В развитии аутоиммунных заболеваний (АИЗ) они играют важную роль: синтез аутоантител, презентация аутоантигенов, секреция провоспалительных цитокинов, образование эктопических герминативных центров и моделирование иммунного ответа.

Материалы и методы. Были обследованы 25 больных с СКВ (23 женщины, 2 мужчин) в возрасте от 18 до 65 лет. Группу контроля составили 49 здоровых доноров (28 женщин, 21 мужчина) в возрасте 35-62 лет. В качестве группы сравнения были обследованы 27 больных с ССД и 47 больных с СШ. Из базовой иммуносупрессивной терапии 32% (n = 8) больных СКВ получали последние 3 месяца циклофосфан, 100% (n = 25) – глюкокортикоиды. Для выявления популяции В-лимфоцитов периферической крови был использован метод проточной цитофлуометрии. Статистический анализ был проведен с помощью программы GraphPad Prizm 7.

Результаты. Мы обнаружили у больных СКВ снижение субпопуляций «наивных» В-клеток под влиянием циклофосфана по сравнению с больными без данной терапии (p = < 0,05). Также у больных СКВ, независимо от терапии, оказалось достоверно выше число плазмобластов по сравнению с донорами (p < 0,01). Полученные результаты свидетельствуют о том, что при АИЗ патогенетические механизмы заболеваний и терапия приводят к сдвигам в содержании субпопуляций В-клеток. Необходимо отметить отсутствие влияния циклофосфана у больных СКВ на повышенное число плазмобластов, вырабатывающих в большом количестве антитела.

Вывод. Использование в качестве мишени иммуносупрессивной терапии определенные субпопуляции В-клеток, возможно, является одним из перспективных способов достижения скорой и длительной ремиссии.

ЗНАЧИМОСТЬ ЦИТОКИНОВ АДАПТИВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Th-ЛИМФОЦИТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

Валеева А.Р., Скороходкина О.В.

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Казань, Россия

Введение. Аутоиммунные заболевания кишечника, к основным нозологическим формам которых относят язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), являются одной из наиболее актуальных проблем в современной гастроэнтерологии ввиду высокой их социальной значимости. Патогенез данной патологии довольно сложен и к настоящему моменту раскрыт не полностью. Так, в качестве значимых причин, влияющих на формирование воспалительной реакции при ЯК называются такие, как факторы окружающей среды, наличие генетической предрасположенности, также обсуждается роль кишечной микробиоты как аутоантигена, индуцирующего развитие аутоиммунных реакций. Традиционно считается, что в развитии ЯК преобладает Th2-опосредованный иммунный ответ. Однако в последнее время в литературе активно обсуждается роль и Th17-лимфоцитов в патогенезе ЯК, с учетом их значимости в формировании аутоиммунных процессов и при другой патологии.

Цель. Анализируя уровень IL-4, IL-17A и IL-10, охарактеризовать функциональную активность Th2- и Th17-лимфоцитов в формировании аутоиммунного воспаления у пациентов с ЯК в стадии обострения и ремиссии заболевания.

Материалы и методы. Уровень указанных цитокинов исследовался в сыворотке крови 48 больных в стадии обострения ЯК, а также у 20 больных в период ремиссии заболевания с помощью метода мультиплексного анализа

(Bio-Rad USA). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ STATISTICA 6.0, применялись непараметрические методы описательной статистики (метод Манна–Уитни). Контрольную группу составили 11 здоровых добровольцев.

Результаты. Анализ полученных результатов показал достоверное увеличение уровня IL-4 и IL-17A у пациентов ЯК как в обострении, так и в период ремиссии заболевания. Так, в период обострения ЯК уровень ключевого цитокина Th2-лимфоцитов IL-4 достигал 3,23 пг/мл [2,18; 5,02], а в ремиссии – 3,42 пг/мл [2,8; 4,18], в то время как в контрольной группе указанные показатели не превышали 1,87 пг/мл [1,4; 3,2] (p = 0,002; 0,009 соответственно). Повышение уровня данного цитокина указывает на наличие повышенной функциональной активности Th-2 лимфоцитов у больных ЯК, что в целом соответствует данным и других авторов. Уровень IL-17A, основного цитокина секретируемого Th17-лимфоцитами, также был увеличен в период обострения ЯК, и его значения достигали 15 пг/мл [12,11; 23,38], а в ремиссии заболевания – 14,68 пг/мл [11,29; 17,19], в то время как в контрольной группе указанные показатели соответствовали 7,36 пг/мл [5,18;8,06], (p = 0,00007; 0,00029 соответственно). Повышение уровня IL-17A может свидетельствовать о роли Th17-лимфоцитов в формировании аутоиммунного воспаления при ЯК. В свою очередь IL-10, секретируемый регуляторными Т-лимфоцитами (Treg), обладает известным иммуносупрессивным эффектом. В нашем исследовании было выявлено, что только в период ремиссии ЯК уровень IL-10 был достоверно повышен до 27,99 пг/мл [17,53; 33,55], значения которого в контрольной группе составляли не более 4,36 пг/мл [3,26; 15,25], (p = 0,0046). В период же обострения заболевания уровень IL-10 достоверно не отличался от группы контроля и соответствовал 21,93 пг/мл [3,61; 35,35], (p = 0,065). Следовательно, зафиксированное повышение уровня IL-10, указывает на возможную ингибирующую роль Treg, в развитии аутоиммунного воспаления при ЯК особенно в период ремиссии заболевания.

Заключение. На основании полученных результатов сделаны следующие выводы: 1) увеличение уровней цитокинов IL-4, IL-17A у больных ЯК указывает на повышение функциональной активности Th2-, Th17-субпопуляций лимфоцитов и их участии в патогенезе хронического аутоиммунного воспаления как при обострении, так и в ремиссии заболевания; 2) повышение уровня IL-10 в период ремиссии заболевания может отражать значимость регуляторных Т-лимфоцитов в ингибировании аутоиммунного воспаления при ЯК.

ЭФФЕКТЫ IL-6 НА ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У БОЛЬНЫХ АБДОМИНАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ С РАЗЛИЧНЫМ СОСТОЯНИЕМ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Василенко М.А.[1], Кириенкова Е.В.[1], Скуратовская Д.А.[1], Затолокин П.А.[1, 2], Литвинова Л.С.[1]

[1] Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия
[2] Областная клиническая больница Калининградской области, Калининград, Россия

Введение. Ожирение сопровождается субклиническим хроническим воспалением жировой ткани (ЖТ), что оказывает влияние на метаболическую и секреторную функцию ЖТ, способствуя формированию инсулинорезистентности (ИР) и сахарного диабета (СД) 2 типа (Mathis D., 2013). Ключевыми молекулами с выраженными провоспалительными свойствами являются – фактор некроза опухолей α (TNFα) и IL-6, концентрация которых в висцеральном жире более чем в 100 раз превышает их сывороточный уровень (Fernandez-Real J.M. et al., 2003). IL-6 интересен тем, что оказывает противоположно направленные эффекты на разные ткани. Установлено, что в мышечной ткани высокая концентрация этого цитокина повышает чувствительность к инсулину путем ингибирования синтеза ряда провоспалительных молекул, в том числе TNFα. Напротив, в печени и жировой ткани IL-6 вызывает формирование ИР за счет нарушения инсулинового сигналинга.

В связи с вышесказанным **целью** нашего исследования явилось определение тканеспецифических особенностей синтеза IL-6 различными депо жировой ткани с оценкой взаимосвязей продукции IL-6 с показателями углеводного обмена (УО) у больных ожирением без и с СД 2 типа.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили биоптаты ЖТ разной локализации (висцеральная – большой сальник [БС], брыжейка тонкой кишки [БР] и подкожная [ПЖТ]) от 155 пациентов больных абдоминальным ожирением (АО). Участники исследования были разделены на группы, в зависимости от степени (ст.) ожирения (по индексу массы тела, ИМТ) и состоянию УО (наличие/отсутствие СД 2 типа). Уровни экспрессии мРНК генов IL-6 определяли методом количественной полимеразной реакции в режиме реального времени (ПЦР), сывороточное содержание IL-6 – методом иммуноферментного анализа.

Результаты. У всех больных АО (независимо от состояния УО), уровень экспрессии мРНК гена IL-6 в биоптатах ЖТ БР и БС превышал таковой в ПЖТ. Независимо от состояния УО у больных ожирением с ИМТ < 40 кг/м^2 сывороточная концентрация IL-6 связана с его экспрессией в ЖТ БР, тогда как при морбидном ожирении (ИМТ ≥ 40 кг/м^2) вклад в сывороточный уровень исследуемого цитокина вносят оба депо висцеральной жировой ткани: БР и БС. У всех пациентов с ИМТ ≥ 35 кг/м^2, независимо от состояния УО, регистрировалось достоверное повышение сывороточного содержания IL-6 относительно контроля.

Выявлено более высокое (в среднем, в 2 раза) плазменное содержание IL-6 у больных ожирением с СД 2 типа по сравнению с результатами, полученными у больных АО без СД 2 типа (p < 0,05). У больных ожирением (ИМТ ≥ 35 кг/м^2) без СД 2 типа обнаружены позитивные корреляции сывороточного уровня IL-6 с инсулином (r = 0,69) и отрицательная с глюкозой сыворотки (r = -0,38, r = -0,41 – II и III ст.), тогда так у больных СД 2 типа с аналогичным ИМТ содержание IL-6 в сыворотке крови имело корреляции с С-пептидом (r = 0,83), инсулином (r = 0,69) и гликированным гемоглобином (r = 0,91). Уровень экспрессии гена IL-6 у больных с СД 2 типа в ЖТБР положительно коррелировал с глюкозой (r = 0,90), а в ЖТБС с индексом HOMA-IR (r = 0,66) и гликированным гемоглобином (r = 0,43, p < 0,05 во всех случаях).

Заключение. В результате проведенного исследования показано, что независимо от состояния УО уровень экспрессии мРНК IL-6 в висцеральной ЖТ (БР и БС) превышал таковой в ПЖТ.

Установлено, что у всех больных ожирением независимо от состояния УО на выявлены положительные корреляционные взаимосвязи между сывороточным уровнем IL-6 и инсулином, что косвенно подтверждает влиянии

IL-6 на компенсаторную гиперпродукцию инсулина в патогенезе инсулинорезистентности.

Тем не менее, выявленные нами отрицательные ассоциации IL-6 с глюкозой в сыворотке крови у больных без СД 2 типа и, напротив, положительные между содержанием IL-6 и гликированным гемоглобином, а также между уровнем его экспрессии в висцеральной ЖТ с глюкозой и индексом HOMA-IR у больных с СД 2 типа могут свидетельствовать о разнонаправленных эффектах IL-6 на показатели углеводного обмена.

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА ПРОДУКЦИЮ КОЛЛАГЕНА IV ТИПА ДЕРМАЛЬНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Васильева Е.А., Федулова Э.Н., Мухина И.В.

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения РФ, Нижний Новгород, Россия

Введение. Фибробласты кожи участвуют в репарации ткани, продуцируя компоненты внеклеточного матрикса и базальной мембраны. Коллаген IV типа – главный компонент базальной мембраны кожи, участвует в клеточной адгезии и миграции. Для хронического течения болезни Крона и язвенного колита характерно развитие воспаления на системном уровне, появление в кровотоке медиаторов воспаления, в том числе липополисахарида (LPS), которые, в свою очередь, могут влиять на функцию фибробластов, в том числе дермальных, и изменять секрецию фибробластами компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны.

Цель. Оценить уровень секреции коллагена IV типа дермальными фибробластами при их культивировании *in vitro* в ответ на стимуляцию липополисахаридом.

Материалы и методы. В исследовании использованы дермальные фибробласты, выделенные от пяти детей с болезнью Крона, пяти детей с язвенным колитом и пяти условно здоровых детей (контрольная группа) в возрасте 13-17 лет. От всех участников и их родителей получено письменное информированное согласие, исследование одобрено этическим комитетом и ученым советом института. Критериями включения пациентов стали возраст, отсутствие других аутоиммунных заболеваний и педиатрический индекс активности болезни Крона и язвенного колита (PCDAI/PUCAI = 10-20 баллов). Первичные культуры дермальных фибробластов получали из биоптатов кожи предплечья путем ферментативной обработки по стандартной методике. Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% ЭТС (ПанЭко, Россия), 0,33 мг/мл L-глутамина (ПанЭко, Россия), 55 Ед/мл пенициллина и 55 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5% CO_2. Замену среды проводили каждые 3-4 дня. Клетки после третьего пассажа засевали в 24-луночный планшет (Thermo scientific, Германия) и культивировали до достижения культурой монослоя. Для стимуляции секреторной активности дермальных фибробластов культуральную среду в соответствующих лунках меняли на питательную среду, содержащую индуктор воспаления LPS. Контролями служили лунки с дермальными фибробластами, в которые добавляли питательную среду без индуктора. В качестве стимулятора активности дермальных фибробластов использовали индуктор воспаления *Lipopolysaccharides* из *Escherichia coli*, серотип O55:B5 (Sigma, Германия) в концентрации 10 мкг/мл. Стимуляцию дермальных фибробластов проводили в течение 24 часов. Супернатанты отбирали, пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 μм (GE Osmonics, США), и при необходимости аликвоты хранили при -80 °С. Оценку уровня коллагена IV типа в культуральной среде проводили методом ELISA тест-системой EKF diagnostics (Япония) согласно инструкции производителя.

Результаты. Спонтанная продукция коллагена IV типа дермальными фибробластами детей с язвенным колитом статистически значимо снижена по сравнению с ее уровнем в группе условно здоровых детей и детей с болезнью Крона. Средние значения концентраций коллагена IV типа в супернатанте дермальных фибробластов условно здоровых детей и детей с болезнью Крона, язвенным колитом составили соответственно: 5,34±0,93 мкг/мл, 4,27±1,51 мкг/мл; 3,72±1,98 ($p = 0,015$ против контроля; $p = 0,021$ против болезни Крона). В ходе исследования установлено, что в ответ на добавление LPS *E. coli* O55:B5 дермальные фибробласты детей с болезнью Крона и язвенным колитом снижают секрецию коллагена IV типа. Концентрация в супернатанте коллагена IV типа уменьшалась на 50,2%, с 4,27±1,51 мкг/мл до 2,13±0,55 мкг/мл ($p = 0,021$) у детей с болезнью Крона; на 38,7% с 3,72±1,98 мкг/мл до 2,28±0,83 мкг/мл ($p = 0,027$) у детей с язвенным колитом; на 3,4% в группе условно здоровых детей.

Заключение. Уровень спонтанной секреции дермальными фибробластами коллагена IV типа снижен в группах детей с болезнью Крона и язвенным колитом по сравнению со значением в группе условно здоровых детей. Индуктор воспаления липополисахарид LPS *E. coli* O55:B5 снижает его секрецию дермальными фибробластами по сравнению с его уже сниженным базовым уровнем в результате хронического воспаления в кишечнике. Таким образом, механизмом нарушения целостности и защитных функций кожи у детей с воспалительными заболеваниями кишечника может быть снижение продукции дермальными фибробластами коллагена IV типа, потенцируемое липополисахаридом.

КЛЕТКИ-СУПРЕССОРЫ МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ

Герасимова Д.Г.[1], Закиров Р.Ш.[2], Радыгина Т.В.[2], Курбатова О.В.[3], Самохина И.В.[2], Мурашкин Н.Н.[2], Петричук С.В.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет» им. Н.Н. Пирогова, Москва, Россия
[2] ФГБНУ «Научный центр здоровья детей», Москва, Россия
[3] ФГБНУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Псориаз является распространенным иммуноопосредованным, хроническим воспалительным заболеванием кожи. Важную роль в развитии псориаза играют дендритные клетки и активированные Т-лимфоциты (act-Th),

взаимодействие которых запускает ряд механизмов, приводящих в конечном итоге к развитию воспалительного процесса и формированию псориатических поражений кожи. Особое внимание уделяется участию в патогенезе псориаза клеткам-супрессорам миелоидного происхождения (MDSCs) и регуляторным Т-клеткам (Treg). MDSCs относятся к гемопоэтической линии и представляют собой гетерогенную популяцию ранних миелоидных клеток-предшественников. Результаты исследования MDSCs у взрослых, больных псориазом, и здоровых пациентов показали, что MDSCs значительно увеличиваются в крови пациентов с псориазом по сравнению со здоровыми лицами. MDSCs участвуют в привлечении и поддержке Treg.

Цель. Оценить количество MDSCs, Treg, act-Th и Th17-лимфоцитов (Th17-лф) периферической крови у детей с псориазом в зависимости от возраста и длительности заболевания.

Материалы и методы. Обследовано 54 пациента с тяжелым течением псориаза. Степень тяжести псориаза оценивали с помощью индекса PASI(> 12 баллов). Группа сравнения (гр. ср.) составила 32 человека. Возраст пациентов составил 2-17 лет. Всем детям провели количественную оценку популяций MDSCs ($CD11b^+CD33^+HLA\text{-}DR^-$), Th17-лф. ($CD3^+CD4^+CD161^+CD45^+$), Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{low+}CD45^+$), act-Th ($CD3^+CD4^+CD127h^+CD45^+$) на проточном цитометре BD FACSCanto™ (США) и CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США). Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с помощью пакета Statistica 6.0, критерий Манна–Уитни, данные представлены в виде медиана [верх.; ниж. квартиль].

Результаты. Количество MDSCs у детей с псориазом находилось в диапазоне от 18 до 211 кл/мкл и было достоверно больше, чем в группе сравнения (пациенты с псориазом – 65 [92; 43] кл/мкл; гр. ср. – 50 [61; 35] кл/мкл; $p = 0,013$), что согласуется с данными у взрослых пациентов с псориазом. Проведенный анализ не выявил зависимости количества MDSCs от возраста пациентов как в группе детей с псориазом, так и в группе сравнения. Получено, что количество MDSCs зависит от длительности заболевания. Максимальное количество MDSCs наблюдалось у детей, болеющих менее 3-х лет, и составляло 75 [121; 43] кл/мкл. При длительности заболевания более 6 лет, количество MDSCs уменьшалось на 40%. Корреляционный анализ выявил обратную зависимость между количеством MDSCs и содержанием Th17-лф и act-Th (% CD4), при этом зависимости между MDSCs и Treg-лф обнаружено не было. Анализ абсолютного количества супрессорных клеток (MDSCs + Treg) показал, что с увеличением длительности заболевания количество этих клеток уменьшается ($r = -0.39$). Динамическое наблюдение детей с псориазом, не отвечающих на терапию, показало увеличение количества MDSCs.

Выводы. Таким образом, анализ количества клеток-супрессоров у детей с тяжелым течением псориаза показал, что в первые годы заболевания иммунная система активно отвечает на патологический процесс увеличением количества MDSCs в циркуляции. Длительное течение заболевания приводит к снижению ответной реакции, что выражается в уменьшении количества MDSCs на фоне повышения содержания аутоагрессивных Th17-лф и активированных Т-хелперов, что сопровождается утяжелением состояния пациентов. Дальнейшее изучение клеток-супрессоров миелоидного происхождения должно быть направлено на оценку их функциональной и метаболической активности.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА ЖЕНЩИН СТАРШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ С ОСТЕОАРТРОЗОМ, СОПРОВОЖДАЮЩИМСЯ ОСТЕОПЕНИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Гладкова Е.В., Карякина Е.В., Бабушкина И.В., Белова С.В., Царева Е.Е., Персова Е.А.

НИИТОН ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, Саратов, Россия

Введение. Остеоартроз (ОА) крупных суставов – распространенная группа полиэтиологических заболеваний с широкой распространенностью (до 20% населения) и высокой степенью инвалидизации пациентов, что формирует существенную медико-экономическую нагрузку на общество. Значительная доля пациентов – женщины старшей возрастной группы, у которых течение ОА сопровождается выраженными нарушениями ремоделирования костной ткани, что в значительной степени усугубляет течение основного заболевания, поражающего все суставные структуры, усложняет лечение и ухудшает прогноз. Особенности патофизиологических механизмов прогрессирования поражения суставов обусловлены как местными, так и системными клеточными реакциями, действием гуморальных факторов в условиях выраженных воспалительно-дегенеративных изменений, что требует дополнительного изучения.

Цель. Изучение особенностей иммунных реакций у женщин с остеоартрозом, сопровождающимся остеопеническим синдромом.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 32 пациентки с остеоартрозом (ОА) в возрасте 64-72 лет (с интерквартальной широтой – 69 лет), осложненным постменопаузальным остеопорозом (ОП) – опытная группа и 20 добровольцев – доноров без заболеваний опорно-двигательного аппарата (группа контроля). Всем участникам исследования в сыворотке крови проведено определение содержания цитокинов (TNFα, IL-1, IL-4, IL-6, IL-10), иммуноглобулинов основных классов (A, M, G) и показателей состояния костного метаболизма (уровня 25-гидроксивитамина D [25 (OH) D], основного неколлагенового белка матрикса кости – остеокальцина и SerumCross Laps – фрагментов коллагена I типа) методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием спектрофотометра многофункционального Epoch™. Определение компонентов комплемента C3 и C4 проводили турбидиметрическим методом с использованием наборов CORMAY COMPLEMENT C 3 и CORMAY COMPLEMENT C4 и автоматического биохимического анализатора Sapphire 400. Статистическая обработка полученных результатов осуществлена с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты. У пациенток опытной группы отмечено повышение ($p < 0,05$) уровня SerumCross Laps (0,56±0,04 нг/мл) по сравнению с показателями контрольной группы (0,39±0,03 нг/мл), снижение уровня остеокальцина (22,25±1,32 нг/мл) и (14,48±1,65 нг/мл) и сывороточного D [25 (OH) D] – 25,6±7,3 и 52,7±9,2 нг/мл соответственно. Несмотря на выраженные воспалительные и дегенеративные процессы в пораженных суставах, определяющих аутоиммунный компонент, у пациенток с ОА выявляли лишь незначительное повышение C3, не достигавшее существенных отличий от аналогичных значений в контрольной группе, а также разнонаправленные колебания уровня C4, не

выходящие за пределы нормальных значений, характерных для данной возрастной группы. Вместе с тем, при изучении провоспалительных сывороточных цитокинов обнаружено существенное повышение их содержания у пациенток опытной группы по сравнению с контрольными значениями: TNFα (4,24±0,69 и 8,94±0,91 пг/мл) и IL-1 (6,4±0,3 и 4,8±0,1 пг/мл) соответственно. В содержании противовоспалительных цитокинов у женщин с ОА и ОП констатированы разнонаправленные изменения. В опытной группе на фоне увеличения ($p < 0,05$) содержания IL-10 отмечалось некоторое угнетение синтеза и накопления в биологических жидкостях IL-6, что в определенной степени связано с ограничением в реализации стимулированного иммунного ответа и подавлением выработки Т-клетками медиаторов провоспалительного звена. Кроме того, у пациенток опытной группы отмечали повышенное содержание (19,8±0,22 г/л) IgG. Проведенный корреляционный анализ выявил наличие значимых взаимосвязей между изученными показателями ремоделирования костной ткани и концентрацией провоспалительных цитокинов в сыворотке крови.

Заключение. Особенности иммунного статуса пациенток старшей возрастной группы с ОА и остеопеническим синдромом характеризуются наличием неспецифических иммуновоспалительных изменений и выраженным дисбалансом про- и противовспалительных цитокинов, что поддерживает и усугубляет нарушения ремоделирования костной ткани. Выявленные нарушения должны являться предметом направленной медикаментозной коррекции.

ОЦЕНКА ЛОКАЛЬНЫХ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПАРОДОНТИТОМ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА

Голицына А.А., Югай Ю.В., Чагина Е.А.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, Россия

Введение. Воспалительные заболевания пародонта являются актуальной и нерешенной проблемой современной стоматологии. Сахарный диабет значительно повышает риск возникновения пародонтита, а также влияет на степень деструкции и интенсивность воспалительного процесса тканей пародонта (Зырянов Б.Н., 2014).

Цель. Оценка локальных уровней TNFα, IL-4, IL-17 и IFNγ у пациентов с пародонтитом при нарушении углеводного обмена (сахарный диабет II типа) и без него.

Материалы и методы. Проведено обследование 65 больных в возрасте от 30 до 60 лет, распределенных на 2 группы: I группа – пациенты, страдающие сахарным диабетом II типа и пародонтитом различной степени тяжести, 30 человек; II группа – пациенты, страдающие пародонтитом различной степени тяжести без выявленной сопутствующей патологии, 35 человек. Контрольную группу составили практически здоровые добровольцы аналогичного возраста (20 человек). В качестве материала исследования использовались слюна и кровь, полученная из микроциркуляторного русла (МЦР) десны пациентов. Уровни TNFα, IL-4, IL-17 и IFNγ определяли иммуноферментным методом с применением специфических реактивов R&D Diagnostics Inc (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Расчеты количества TNFα, IL-4, IL-17 и IFNγ проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пг/мл. Статистическая обработка материала проведена с использованием программы SPSS v16.

Результаты. В таблице представлены локальные уровни исследованных цитокинов у пациентов с пародонтитом и сопутствующим сахарным диабетом II типа (1 группа) и больных пародонтитом без соматической патологии (2 группа).

В обеих исследуемых группах больных установлено увеличение TNFα, IL-4, IL-17 и IFNγ в сравнении с контролем ($p < 0,001$). Анализ показателей между исследованными группами позволил установить более выраженное увеличение IL-4 у больных с пародонтитом на фоне сахарного диабета II типа в сравнении с пациента-

ТАБЛИЦА. ЛОКАЛЬНЫЕ УРОВНИ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА И БЕЗ НЕГО (К ТЕЗИСАМ ГОЛИЦЫНОЙ А.А. И ДР.)

Показатели M±m пг/мл		Контр. группа n = 20	1 группа Больные с пародонтитом и сахарным диабетом 2-го типа n = 30	2 группа Больные с пародонтитом n = 35
TNFα	МЦР десны	8,15±0,3	73,5±1,8***	98,75±2,5*** $p_1 < 0,01$
	Слюна	2,82±1,5	18,87±1,6***	25,68±2,41***
IL-17	МЦР десны	4,61±0,7	99,26±3,6***	103,23±2,6***
	Слюна	10,93±0,1	74,93±3,5***	88,4±2,3***
IFNγ	МЦР десны	15,31±0,3	133,9±2,13***	180,4±1,3*** $p_1 < 0,01$
	Слюна	12,41±1,5	223,9±3,3***	225,4±4,5***
IL-4	МЦР десны	6,34±0,6	60,5±2,14***	56,8±1,3***
	Слюна	1,13±0,12	55,2±2,3***	15,7±1,13*** $p_1 < 0,001$

Примечание. Статистическая достоверность различий с контрольной группой: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$; p1 – статистическая достоверность различий между группами пациентов.

ми 2 группы (55,2±2,3 пг/мл [1 группа], 15,7±1,13 пг/мл [2 группа], p1 < 0,001). Однако у пациентов с пародонтитом без сопутствующей патологии зарегистрировано более значимое повышение уровней TNFα и IFNγ. Существенных различий уровня IL-17 между группами установлено не было.

Заключение. Предполагаем, что более выраженное увеличение исследуемых показателей у группы больных без сопутствующей патологии, в отличие от группы пациентов с сахарным диабетом II типа, может быть связано с развитием микроангиопатии при сахарном диабете, проявляющейся угнетением продукции цитокинов и нарушением врожденного иммунитета. Полученные результаты исследования могут рассматриваться как перспективные маркеры для персонификации прогноза развития пародонтита при сахарном диабете II типа.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ СОЧЕТАНИЯ МИАСТЕНИИ И ПОЛИМИОЗИТ

Гончарова З.А., Милованова О.В.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Миастения – тяжелое хроническое заболевание, ведущим клиническим проявлением которого является мышечная слабость. Заболевание характеризуется непредсказуемостью течения и неблагоприятным прогнозом. Затрудняют диагностику полиморфный и преходящий характер жалоб, гетерогенность клинической картины, волнообразное течение заболевания. Согласно данным А.Г. Санадзе, Е.К. Сепп (2012), лишь 29,9% пациентам с миастенией при первичном обращении устанавливается правильный диагноз. Патогенез миастении сложен, опосредован выработкой аутоантител к ацетилхолиновым рецепторам на постсинаптических мембранах, снижением их числа и нарушением деполяризации постсинаптической мембраны. Как и большинство аутоиммунных заболеваний миастения может встречается в сочетании с другой нозологической формой («overlap синдром»), что также значительно затрудняет диагностику. У 11,3% больных с полимиозитом отмечается сочетание с миастенией (Лобзин С.В., 2015). Представляет интерес изучение каждого клинического случая сочетания таких двух достаточно редких аутоиммунных заболеваний, как миастения и полимиозит, имеющих общее ядро клинической картины (мышечная слабость в проксимальных отделах конечностей).

В августе 2016 г. в неврологическое отделение клиники РостГМУ поступила пациентка М., 25 лет. В неврологическом статусе отмечались бульбарный синдром, слабость мимической мускулатуры, генерализованная мышечная слабость, феномен патологической утомляемости. Из анамнеза установлено, что пациентка больна в течение года, когда впервые заметила преходящую слабость в ногах при длительной ходьбе. Течение заболевание было прогрессирующим, постепенно присоединились гнусавость голоса и нарушение глотания. Был установлен диагноз «Миастения, генерализованная форма (4В), с бульбарными нарушениями, декомпенсация на фоне приема антихолинэстеразных и глюкокортикотероидных препаратов», в соответствии с диагностическими критериями и клиническими проявлениями заболевания. Отмечалась хорошая реакция на прозериновую пробу. Также проводилось соматическое обследование (исключены паранеопластический синдром, системные заболевания соединительной ткани – С-реактивный белок, креатинфосфокиназа, АЛТ, АСТ, СОЭ – в норме). Пациентка осмотрена торакальным хирургом, рекомендовано плановое оперативное лечение по поводу новообразования вилочковой железы после курса лечения (плазмаферез, препараты калия, глюкокортикостероиды). С выраженной положительной динамикой, в виде уменьшения патологической утомляемости, пациентка выписана из стационара.

Через 2 месяца (в октябре 2016 г.) пациентка обратилась с резким ухудшением состояния (нарос бульбарный синдром, мышечная слабость, появилась дыхательная недостаточность, слабость мышц шеи). Больная была госпитализирована в отделение реанимации по экстренным показаниям с кризом смешанного характера. Проводилась стандартная терапия (отмена антихолинэстеразных препаратов, курс плазмафереза и глюкокортикостероидов). Отмечалась незначительная положительная динамика. Обращало внимание плохая реакция на прозерин; полное отсутствие суточного колебания выраженности симптомов, наблюдавшиеся ранее; отрицательные антитела к ацетилхолиновым рецепторам (по данным Санадзе А.Г. и соавт. [2012], в 20-10% случаев у пациентов с генерализованной миастенией не определяются данные антитела), мышечноспецифической тирозинкиназе.

Сохранялось крайне тяжелое состояние пациентки, несмотря на проводимую массивную терапию, включая плазмаферез, внутривенное введение иммуноглобулинов в адекватных дозах. Отмечалось полное отсутствие самостоятельных дыхательных движений, развилась быстро прогрессирующая потеря мышечной массы и атрофия конечностей. Присоединились пневмония, грибковый сепсис, ДВС-синдром, усугубившие состояние.

Было проведено повторное соматическое обследование, выявившее ускоренное СОЭ, лейкоцитоз, анемию, значительное повышение ревмопроб. Однако эти изменения у пациентки с системной воспалительной реакцией не могли иметь диагностического значения для дифференциальной диагностики миастении. Кроме того, у больной отсутствовали на этапах и во время госпитализации миалгический, полиартралгический синдром, патология почек, сердца, поражение кожи. Инверсия клинической картины миастенического синдрома (присоединение элементов миопатического синдрома) расценено, как стероидная миопатия у пациентки с тяжелой генерализованной миастенией на фоне приема глюкокортикостероидов. Были постепенно полностью отменены глюкокортикостероиды (по общепринятой схеме). Проведен курс цитостатической терапии (сандиммун в средне-терапевтических дозах). Несмотря на проводимые интенсивные терапевтические мероприятия стабилизации состояния не достигнуто, в феврале 2016 г. пациентка умерла.

Результаты патоморфологического исследования свидетельствовали о полимиозите с преимущественным поражением межреберных мышц и диафрагмы, системном васкулите с поражением почек.

Таким образом, присоединение второго аутоиммунного заболевания с преимущественным поражением мышц на фоне тяжелого течения основного заболевания, осложнившегося развитием пневмонии, грибковым сепсисом, ДВС синдромом, усугубило течение миастении и привело к летальному исходу, несмотря на проведение

интенсивной патогенетической терапии (общей для обоих заболеваний).

Прижизненная верификация диагноза «полимиозит» была невозможна из-за отсутствия типичных клинических проявлений заболевания (боли в мышцах и суставах, поражение сердца, кожи), нормальном уровне креатинфосфокиназы (как одного из ведущих лабораторных критериев), присоединения системной воспалительной реакции.

При отсутствии эффекта от патогенетической терапии, изменении клинической картины (инверсии симптомов) миастении целесообразно проводить биопсию мышц, для уточнения диагноза (полимиозит, стероидная миопатия).

Присоединение второго аутоиммунного заболевания значительно ухудшает прогноз пациентов с миастенией.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ У ДЕТЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А.

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Научно-исследовательский центр, Санкт-Петербург, Россия

Болезнь Крона (БК) – хроническое воспалительное рецидивирующее заболевание желудочно-кишечного тракта, в основе патогенеза которого лежит потеря толерантности к антигенам пищи. Выявление специфических аутоантител доказывает аутоиммунный характер заболевания. Повышенная проницаемость слизистой оболочки кишечника создает предпосылки для усиленной антигенной нагрузки и, как следствие, локального и системного высвобождения медиаторов воспаления.

Цель. Оценить особенности иммунного реагирования у детей, страдающих БК.

Материалы и методы. Обследовано 36 детей в возрасте от 9 до 17 лет с диагнозом БК. Проведено иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии (проточный цитометр Epics XL-MCL, Beckman Coulter) по безотмывочной технологии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE, PC-5 (Beckman Coulter), исследование уровня иммуноглобулинов A, M, G, E (реакция преципитации, ИФА – Алкор-Био, Россия), концентрации антител к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) IgA и IgG, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA) MPO и PR3, антинуклеарных антител ANA (ИФА – Orgentic, Германия).

Результаты. У детей с диагнозом БК ASCA отмечаются в 23,8% случаев. Антитела к MPO положительны у 9,5%, к PR3 – у 33,3% детей. Обнаружена прямая корреляция между ASCA IgG и антителами к MPO (r = 0,3), а также ASCA IgA и антителами к PR3 (r = 0,3). Высокая степень корреляции отмечена между ASCA IgG и ANA (r = 0,8), при этом уровень ANA у всех обследованных детей не превышает норму. Появление ASCA и ANCA антител при БК расценивается как прогностически неблагоприятный признак, сопровождающий осложненное течение заболевания с частыми эпизодами кишечной непроходимости.

У всех детей с БК выявлены изменения в гуморальном звене иммунной защиты, при этом дисиммуноглобулинемии различных типов отмечаются в 13,6% случаев. Гипериммуноглобулинемия M обнаружена в 68,2% случаев, G – у 27,3% пациентов, A – у 22,7% детей. «Иммуноглобулиновый взрыв» при этом выявлен в 9,1% случаев. Гипериммуноглобулинемия A умеренно коррелирует с ASCA IgA (r = 0,3). Реагиновые IgE диагностируются у 31,8%. Циркулирующие иммунные комплексы, как предиктор аутоиммунного воспаления, выявлены у 18,1% детей. Их уровень коррелирует с содержанием IgM (r = 0,5) и IgG (r = 0,3).

У 30% обследованных детей отмечается относительный Т-лимфоцитоз за счет повышения уровня $CD3^+CD4^+$ (в 50% случаев), $CD3^+CD8^+$ (у 20% обследованных), $CD3^+CD(16^+56)^+$ (у 10% детей). Иммунорегуляторный индекс снижен у 30% обследованных детей, что может являться признаком развития иммунодефицитного состояния, а у 15% пациентов индекс соотношения $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ повышен, т.е. заболевание протекает на фоне аутоиммунной агрессии. Относительный В-лимфоцитоз отмечается у 15% детей, В-лимфопения – у 20%. В 45% случаев относительный уровень $CD3^-CD(16^+56)^+$ снижен. Активированные NK-клетки, экспрессирующие CD8, у 30% обследованных снижены, у 25% – повышены. Уровень γδ-Т-клеток, свидетельствующих о хронической антигенной стимуляции на слизистых оболочках, повышен у 38,9% детей.

Выводы. Обнаружение аутоантител к антигенам цитоплазмы нейтрофилов и *Saccharomyces cerevisiae* позволяет судить об интенсивности иммунной реакции. Выявление гипериммунноглобулинемии свидетельствует об активности воспалительного хронического аутоиммунного процесса. При болезни Крона в результате антигенной стимуляции создаются предпосылки для клеточно-опосредованного ответа иммунной системы с чрезмерной активацией Т-хелперов. Снижение уровня натуральных киллеров обуславливает возможность развития сопутствующего вирус-ассоциированного воспалительного процесса в кишечнике. Иммунодиагностика при БК необходима для определения тяжести течения заболевания, прогноза, подбора индивидуальной иммунокоррекции.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ПЛАЗМАФЕРЕЗА ПРИ МИАСТЕНИЧЕСКИХ КРИЗАХ

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

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Миастения (MG) – аутоиммунное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся утомляемостью различных групп мышц, на фоне физической нагрузки, суточным колебанием симптоматики. Угрожающим состоянием при миастении является развитие криза, который характеризуется быстро нарастающим нарушением функции дыхания и глотания, витальных функций, усугублением неврологической симптоматики и требуют неотложных реанимационных мероприятий. Частота встречаемости кризов среди пациентов составляет 15-40% (Косачев В.Д., 2010), однако у пациентов старше 50 лет этот показатель составляет 50% (Агафонов Б.В., 2013; Chaudhuru, Behan, 2009). Различают миастенический, холинергический и смешанный кризы. Последний тип кризов наиболее часто встречается в практике.

Развитие криза требует проведение неотложных реанимационных мероприятий (мониторинг сердечно-со-

судистой функции, респираторная поддержка, ИВЛ). Терапия направлена на купирование дефекта нервно-мышечной передачи, проведение иммуносупресии. Одним из эффективных патогенетических методов лечения криза, является аппаратный плазмаферез. Однако, при существующих методиках и протоколах проведения процедуры афереза зачастую у пациентов развиваются кардиальные, тромботические осложнения, почечная недостаточность в 30% случаев (Mandawat A., 2010).

Цель. Усовершенствовать методику проведения плазмафереза для лечения кризовых состояний у пациентов с миастенией, добиться снижения показателя осложнений.

Материалы и методы. С 2013 года по 2015 год в отделении неврологии клиники Ростовского государственного медицинского университета находилось на лечении 75 пациентов с миастенией. У 69 диагностирована генерализованная форма, у 9 из них отмечалось развитие криза во время стационарного лечения. Для оценки тяжести состояния использовалась количественная шкала QMGS (Barohn R.J. et al., 1998), оценка лабораторных показателей крови (общий анализ крови, электролиты, общий белок, показатели свертываемости), проводился контроль жизненно важных функций. Все пациенты получали комбинированное лечение: искусственная вентиляция легких, глюкокортикостероиды (метипред 4 мг в дозировке 0,4-1 мг/кг), препараты калия, витамины группы В, калийсберегающие диуретики, а также аппаратный плазмаферез на фракционаторе крови MCS 3p HAEMONETICS по протоколам PPP (скорость центирифугирования 7000 об.мин$^{-1}$) Курс составлял 5-6 сеансов с интервалом в 3 дня в течение 14-20 дней, с объемом эксфузируемой плазмы за сеанс не менее 30-40% (ОЦП), целевая эксфузия плазмы за курс составляла не менее 1.8-2.0 объема циркулирующей плазмы.

Результаты. Из 9 пациентов у 1 развился миастенический, у 2-х холинергический, у 6-ти смешанных. Возраст пациентов составил от 25 до 68 лет (средний возраст 48 ±11,8) У всех пациентов во время криза быстро развивались грубые дыхательные и бульбарные нарушения. При оценке тяжести состояния по шкале QMGS показатель составил от 26 до 38 баллов (средний показатель 32±3,1б.). Пациентам проводилась комплексное лечение, ИВЛ и курс дискретного плазмафереза. На фоне терапии у 6 (67%) пациентов отмечался регресс симптоматики криза в течение первой недели лечения, у остальных пациентов улучшение состояния наступило к завершению курса плазмафереза. Показатель тяжести состояния по шкале QMGS на момент завершение лечения составил в среднем от 8 до 14 баллов. В среднем миастенический криз купировался в течение 3-5 дней. На фоне лечения плазмаферезом осложнения отмечались лишь у одного пациента старшей возрастной группы в виде развития нестабильной гемодинамики.

Выводы. При выполнении подобранной программы аппаратного плазмафереза отмечалась значительная положительная динамика в виде регресса дыхательных нарушений, генерализованной мышечной слабости, с сохранением стабильных показателей гемодинамики, основных витальных функций. Отмечался минимальный процент осложнений. Благодаря проведению дискретного плазмафереза получилось добиться регресса симптоматики криза в минимальные сроки.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ И УРОВНЯ МЕТАБОЛИТОВ АЗОТА В КРОВИ БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Дуросова П.А., Ильин М.В.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ярославль, Россия

Окислительный стресс лейкоцитов играет важную роль в развитии ряда ревматических заболеваний, в том числе системной красной волчанки (СКВ). Синтезирующиеся в процессе респираторного взрыва активные формы кислорода (АФК) являются мощным тканевым деструктором, модифицируют ДНК, активируют процессы апоптоза клеток, приводя к развертыванию спирали патологического процесса. Наряду с АФК нейтрофилы продуцируют оксид азота, который является индуктором продукции АФК.

Цель. Исследование изменения уровня продукции метаболитов азота нейтрофилами в группах с различной функциональной активностью (ФА) клеток у больных СКВ в зависимости от длительности, характера течения и активности заболевания.

Материалы и методы. Обследованы 50 женщин с СКВ в возрасте 18-73 лет (в среднем 39,9±11,3 лет), длительностью заболевания 1-32 лет (в среднем 8,2±7,4 лет). В контрольную группу включены 25 женщин в возрасте 18-53 лет (в среднем 44,2±9,7 года). Выделение нейтрофилов периферической крови проводили на двойном градиенте плотности фиколла-урографина. ФА нейтрофилов исследовали хемилюминесцентным методом. Количественное определение суммарного содержания метаболитов оксида азота (NO_3/NO_2) в среде инкубации нейтрофилов проводили с помощью реактива Грисса.

Результаты. Пациенты были разделены на три группы в зависимости от уровня ФА нейтрофилов. У пациентов со средним уровнем биоцидности нейтрофилов регистрировалось уменьшение синтеза оксида азота в сравнении с контрольными показателями. Вне зависимости от длительности заболевания пациенты со средней степенью кислородзависимого метаболизма нейтрофилов демонстрируют снижение концентрации NO_3/NO_2 в крови в сравнении с контролем. При подостром и хроническом течении заболевания в группе больных со средним уровнем биоцидности клеток обнаруживается снижение количества метаболитов азота. У пациентов со средней уровнем биоцидности клеток с активностью заболевания I и II отмечается снижение концентрации NO_3/NO_2.

Заключение. Нейтрофилы со средним уровнем кислородзависимого метаболизма вне зависимости от длительности, характера течения и активности заболевания демонстрируют снижение продукции метаболитов азота.

МЕТАБОЛИЗМ МОНОЦИТОВ И ЕГО СВЯЗЬ С ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЦИТОКИНАМИ ПРИ ДИСКОИДНОЙ И СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

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

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ярославль, Россия

Введение. Данные литературы относительно участия моноцитов в иммунопатогенезе красной волчанки и их

связи с цитокинами весьма немногочисленны. Исследования в этом направлении целесообразны как с точки зрения уточнения механизмов развития кожных и системных форм красной волчанки, так и в практическом отношении в плане дифференциации этих заболеваний.

Цель и задачи. Изучение кислородзависимых и кислороднезависимых функций моноцитов (Мн), а также их связей с провоспалительными цитокинами у больных ДКВ и СКВ.

Материалы и методы. Обследован 121 человек в возрасте от 20 до 60 лет (54 больных СКВ, 34 – ДКВ, 33 здоровых лица). Исследовали кислородзависимые функции Мн – спонтанную и индуцированную хемилюминесценцию (ХЛ), кислороднезависимый метаболизм – кислую фосфатазу (КФ) и катионные белки (КБ) спектрофотометрическими методами, активность лизосом с помощью лизосомального теста (ЛТ), уровень ДНК микроцитофлюориметрическим методом, провоспалительные сывороточные цитокины (IL-1β, IL-6, TNFα) иммуноферментным методом.

Результаты. Только при СКВ констатировано увеличение спонтанной продукции активных форм кислорода в сХЛ Мн (2,1±1,8 × 10^4 имп/мин, а при ДКВ и в контроле – соответственно 1,1±1,0 и 0,7±0,6 × 10^4 имп/мин) на фоне уменьшения индуцированной продукции (до 1,3±1,36 × 10^4 имп/мин) со снижением резервных функций Мн (0,8±0,8) по сравнению с данными больных ДКВ (2,5±4,8) и здоровых лиц (2,5±1,8). Установлено достоверное повышение ($p < 0,05$) спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции моноцитов при антифосфолипидном синдроме и у больных с кожным синдромом.

Уровень ДНК в Мн (5,56±2,45 mV) у больных СКВ был существенно снижен по сравнению с данными пациентов с ДКВ (8,36±1,55 Mv, $p < 0,05$) и доноров (8,85±2,42 mV). Содержание ДНК в Мн при ДКВ не отличалось от показателей группы контроля ($p > 0,05$). С нарастанием активности СКВ отмечено уменьшение содержания ДНК в Мн (с 5,28±1,67 до 4,25±2,2 mV, $p < 0,05$). Анализ взаимозависимостей исследованных показателей показал наличие прямой корреляционной связи между содержанием ДНК Мн и ХЛ Мн при СКВ.

Изменений кислороднезависимых функций циркулирующих моноцитов при ИКВ по данным определения уровней КФ (171±41,8 OD × 10^{-3}) и КБ (65,3±20,5 OD × 10^{-3}) в сравнении с данными группы контроля (КФ – 173,1±49,8 OD × 10^{-3}, КБ – 61,7±18,0 OD × 10^{-3}) не было установлено. У больных СКВ, в отличие от здоровых лиц и больных ИКВ, наблюдалось существенное увеличение в моноцитах спонтанной и индуцированной продукции КФ (227,7±89,9; 247,3±127,7 OD × 10^{-3}) и КБ (136,2±38,6; 167,3±112,5 OD × 10^{-3}; $p < 0,05$). Повышение продукции КБ в Мн ассоциировалось при СКВ с наличием у пациентов сосудистых поражений. Показатели лизосомального теста Мн у больных СКВ (4,12±1,06) и ДКВ (4,1±1,0) существенно не отличались от значений здоровых лиц (4,02±1,3; $p > 0,05$ при всех сравнениях).

У больных ДКВ по сравнению с данными здоровых лиц констатировано достоверное увеличение уровней IL-1β – (45,4±31,9 пкг/мл), у больных СКВ – IL-1β – (113,7±125,3 пкг/мл), IL-6 – (15,8±24,3 пкг/мл), TNFα – (88,9±122,9 пкг/мл), а в контроле, соответственно, IL-1β – (9,4±11,7 пкг/мл), IL-6 – (2,8±2,9 пкг/мл), TNFα – (5,5±8,4 пкг/мл, $p < 0,05$). При наличии у больных СКВ кожного синдрома, антифосфолипидного синдрома, синдрома Рейно выявлено существенное повышение содержания IL-1β, легочного синдрома – IL-4, антифосфолипидного синдрома – TNFα. Показана корреляционная связь при СКВ между IL-1β и TNFα.

Заключение. Выполненные исследования указывают на активацию как кислородзависимых, так и кислороднезависимых функций Мн на фоне снижения уровня ДНК фагоцитов и увеличения содержания всех сывороточных провоспалительных цитокинов исключительно при СКВ, тогда как у больных ДКВ констатировано лишь избирательное повышение IL-1β. Эти данные указывают на существенный вклад моноцитов в развитии системного процесса, определяя эти клетки в качестве мишени для терапевтического воздействия, а также на возможность использования определения указанных показателей в качестве дополнительных лабораторных тестов с целью дифференциации ДКВ и СКВ.

РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАК МАРКЕРОВ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Журавлева Ю.А.[1], Гусев Е.Ю.[1, 2]

[1] ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия
[2] Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

В настоящее время доказана существенная роль хронического системного воспаления (ХрСВ) в патогенезе ряда системных аутоиммунных заболеваний. Установлены основные составляющие этого типового патологического процесса (системная воспалительная реакция, системное микротромбообразование, дистресс-реакция нейроэндокринной системы, системная альтерация), а также разработан интегральный критерий его диагностики – шкала ХрСВ (Гусев Е.Ю. и соавт.). Однако ее использование в повседневной врачебной деятельности затруднено в связи с высокой стоимостью лабораторных диагностических тест-систем. Поэтому является актуальным поиск отдельных диагностических маркеров ХрСВ, эффективных при отдельных заболеваниях.

Цель. Оценка диагностической эффективности отдельных показателей ХрСВ при системной красной волчанке и ревматоидном артрите.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты с ревматоидным артритом (РА, n = 26) и системной красной волчанкой (СКВ, n = 49). Методом иммунохемилюминесценции (Immulite) в плазме крови определяли уровни интерлейкинов (IL)-6, 8, 10, фактора некроза опухоли α (TNFα), С-реактивного белка, кортизола, миоглобина, тропонина I, D-димеров. На основании этих показателей по оригинальной методике (шкала ХрСВ) высчитывался интегральный балл ХрСВ. В качестве дополнительных маркеров ХрСВ, не включенных в шкалу ХрСВ определялись уровни β2-микроглобулина, липополисахарид-связывающего белка и эозинофильного катионного белка. Определение активности заболеваний проводилось общепринятыми методами: по шкале DAS28 (РА) и SLEDAI (СКВ). Оценка диагностической эффективности (ДЭ) показателей проводилась с путем построения ROC-кривых с определением их площадей – AUC (SPSS). Критерием разделения пациентов на подгруппы служило наличие ХрСВ (более 3 баллов по шкале ХрСВ).

Результаты. ХрСВ было выявлено у 38,5% пациентов с РА и у 75,5% – с СКВ. Сопоставив диагностическую эффективность отдельных показателей в отношении развития ХрСВ путем сравнения площадей под ROC-кривыми (AUC), мы выявили, что она отличается при каждой нозологии (табл.). Так, отличной (AUC > 0,9) и очень хорошей (AUC > 0,8) ДЭ при РА обладали TNFα, кортизол и D-димеры, а при СКВ – IL-8, IL-6, TNFα. Следует отметить, что ДЭ С-реактивного белка, повышение которого выше нормальных значений зачастую рассматривается в качестве критерия системного воспаления, была невысокой. Среди дополнительных маркеров ХрСВ очень хорошей ДЭ при СКВ обладал липополисахарид-связывающий белок. ДЭ шкал DAS28 и SLEDAI в отношении развития ХрСВ оказалась низкой, что свидетельствует об их эффективности при оценке отдельных клинических проявлений заболеваний, но не системной патогенетической картины этих заболеваний.

ТАБЛИЦА. ЗНАЧЕНИЯ AUC ИССЛЕДУЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ (К ТЕЗИСАМ ЖУРАВЛЕВОЙ Ю.А. И ДР.)

Показатель	РА	СКВ
С-реактивный белок	0,678	0,652
IL-6	0,684	0,995
IL-8	0,791	0,986
TNFα	0,881	0,869
Миоглобин	0,650	0,477
Кортизол	0,825	0,470
D-димеры	0,825	0,715
Липополисахарид-связывающий белок	0,594	0,846
β2-микроглобулин	0,603	0,556
Эозинофильный катионный белок	0,611	-
DAS28/ SLEDAI	0,600	0,363

Заключение. Проявления ХрСВ не стабильны и зависят как от особенностей развития основного заболевания, так и от эффективности патогенетической терапии, что определяет целесообразность диагностики ХрСВ с помощью интегральной шкалы ХрСВ. Однако для мониторинга выраженности ХрСВ при каждой конкретной нозологии могут быть использованы отдельные показатели.

ГОРМОНАЛЬНАЯ И ЦИТОКИНОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА

Здор В.В., Маркелова Е.В., Гельцер Б.И.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, , Владивосток, Россия
Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Многие аспекты иммунопатогенеза аутоиммунного тиреоидита (АИТ) до сих пор требуют прояснения, т.к. лечение заболевания сводится к заместительной терапии тиреоидными гормонами (ТГ) при манифестации гипотиреоза (Ganesh B.B., 2011; Kristensen B., 2016).

Целью работы явилось изучение взаимосвязей ТТГ, тиреоидных гормонов (св.Т3, св.Т4) и Treg, Th1-, Th2-, Th17-, Th22-маркерных цитокинов, объема щитовидной железы (ЩЖ) у пациентов с АИТ и гипотиреозом разной степени тяжести.

Результаты исследования. У 103 пациентов (женщин, n = 67; мужчин, n = 35) с АИТ, подтвержденного гормонально, иммунологически, ультрасонографией и/или морфологически оценивались показатели сывороточного уровня цитокинов IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TGF-β1, TGF-β3, IFNγ TNFα и рецепторов TNFα sRI, TNFα sRII методом твердофазного ИФА с помощью диагностических наборов R&D Diagnostics Inc. исходно и через 3, 6 месяцев гормональной заместительной терапии левотироксином натрия (1,6-1,8 мкг/кг массы тела). Для проверки достоверности и специфичности изменений маркеров использовали ROC-анализ. У пациентов с АИТ в дебюте заболевания выявлена избыточная продукция Th1-, Th2- и Tregs маркерных цитокинов при дефиците TGF-β1 ($\rho < 0,05$), ассоциированных со степенью тяжести аутоиммунного гипотиреоза. Концентрации IL-1β до начала терапии ТГ нарастала в группах прямо пропорционально увеличению степени тяжести гипотиреоза и коррелировала с объемом ЩЖ ($r = 0,79$; $\rho < 0,01$). Высокое содержание в сыворотке крови IL-4 и IL-13 в дебюте АИТ было сопряжено с тяжестью патологического процесса, но при этом доли цитокинов в общем балансе цитокинов были достоверно снижены и при АИТ преобладал Th1-ответ. Установлена дисфункция Treg клеток в дебюте АИТ, что подтверждается относительной и абсолютной гиперпродукцией IL-2 и IFNγ ($\rho < 0,05$), но достоверным снижением баланса Treg / Th17 маркерных цитокинов в дебюте АИТ на фоне многократно повышенного IL-6 ($\rho < 0,01$), достоверно низкого TGF-β1 ($\rho < 0,05$), что способствовало преобладанию Th17-клеток и относительной гипофункции Treg. Повышение IFNγ (^{3} 38,5 пг/мл по данным ROC-анализа) и IL-2 (> 20 пг/мл) свидетельствует о высокой степени активности эффекторной фазы иммунного ответа при АИТ, и являются одними из основных факторов, определяющих возможное прогрессирование патологического процесса. Прямые сильные корреляции показателей IL-10 с ТТГ ($r = 0,76$; $\rho < 0,01$) и с объемом ЩЖ ($r = 0,94$; $\rho < 0,05$) предполагают негативную роль IL-10 в патогенезе АИТ, которая может заключаться в индукции дифференцировки Treg в Th17-клетки последующим снижением числа Treg (Козлов В.А., 2016). Это подтверждено корреляциями тяжести течения аутоиммунного гипотиреоза с системными уровнями IL-10 и IL-17. Высокое содержание TNFα и TNFα sRI, TNFα sRII прямо коррелировало с тяжестью течения АИТ ($r = 0,56$; $\rho < 0,05$), что согласуется с данными о негативной роли цитокина в патогенезе заболевания за счет подавления им активности T-reg клеток и активации апоптоза тиреоцитов. ROC-анализ установил критическое значение для TNFα (≥ 22 пг/мл), при этом точность маркера составила 0,988; прогностическая ценность – 1,0; чувствительность – 0,976; специфичность – 1,0, что позволяет рекомендовать данный маркер для оценки активности аутоиммунного процесса в дебюте АИТ. Показатели TGF-β1 обратно коррелировали с тяжестью течения АИТ и объемом ЩЖ ($r = - 0,61$; $\rho < 0,01$),

а между TGF-β1 и IL-22 обнаружена сильная прямая связь (r = 0,75; ρ < 0,01), что согласуется с данными о влиянии TGF-β1 на процессы фиброзирования ЩЖ. IL-22 был в 3 раза выше показателей группы контроля и его уровень прямо коррелировал с тяжестью течения АИТ (r = 0,51; ρ < 0,01) и обратно – с ТТГ (r = - 0,50; ρ < 0,05). Полученное при ROC-анализе критическое значение TGF-β1 (< 18 пг/мл) прогностически значимо (1,0), чувствительность маркера составила 1,0; специфичность 0,78, что с высокой вероятностью позволяет использовать значение TGF-β1 для прогноза прогрессирования фиброза тканей ЩЖ в дебюте АИТ. Высокий системный уровень IL-8 (по данным ROC-анализа ≥ 42 пг/мл, чувствительность 0,99; специфичность 1,0; прогностическая ценность 1,0) может являться дополнительным маркером сохранности функционирующего тиреоидного эпителия при АИТ, а динамическое снижение цитокина через 3 или 6 месяцев наблюдения было прогностически неблагоприятным фактором, ассоциированным с нарастанием гипофункции ЩЖ при манифестном и субклиническом течении АИТ (r = 0,55; ρ < 0,05). При анализе корреляций, между показателями сывороточных значений IL-8 и ТТГ в дебюте АИТ установлена средняя обратная связь (r = -0,585; r < 0,05), что логически согласуется с выше представленными данными.

Выводы. При АИТ параллельное нарастание показателей IL-6, IL-10, TNFα, TNFα sRI, TNFα sRII и IL-17 может служить критерием прогрессирования аутоиммунного воспаления ЩЖ и активации апоптоза тиреоцитов. Нарастающие в динамике уровни TNFα и его растворимых рецепторов при динамическом снижении исходно высокого уровня IL-8 и сохранении низкого TGF-β1 – прогностически неблагоприятный фактор течения АИТ, свидетельствующий о прогрессировании фиброза тканей ЩЖ с последующим нарастанием ее гипофункции. Это может служить предиктором старта гормональной заместительной терапии ТГ при субклиническом течении гипотиреоза, а также в случаях беременности при АИТ.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ, ИНДУЦИРУЕМЫЙ Т-КЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНАЦИЕЙ, У БОЛЬНЫХ С ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ ФОРМОЙ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Иванова И.П., Шишков А.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Установлено, что аутоиммунные Т-хелперные Th1- и Th17-клетки, специфичные к миелин-ассоциированным антигенам, играют ведущую роль в патогенезе рассеянного склероза (РС). Продукция аутоантиген-реактивными Т-клетками провоспалительных цитокинов (IFNγ, IL-2, TNFα) привлекает в очаг воспаления эффекторные цитотоксические клетки (макрофаги, $CD8^+$ Т-клетки и др.) и, таким образом, запускает в ЦНС воспалительный, миелин-деструктивный процесс. Очевидно, что иммунотропное лечение РС должно быть направлено на инактивацию аутоиммунных Т- и В-лимфоцитов и подавление, осуществляемой иммунокомпетентными клетками, продукции провоспалительных медиаторов. Одним из наиболее перспективных подходов к патогенетическому лечению РС базируется на иммунизации пациента аутоиммунными Т-лимфоцитами. Ранее показано, что Т-вакцинация способна индуцировать генерацию антиидиотипических $CD4^+$ и $CD8^+$Т-лимфоцитов, стимулировать функциональную активность регуляторных $CD4^+CD25^+$Т-клеток и индуцировать синтез антиидиотипических антител. **Целью** настоящего исследования стала оценка иммунологической эффективности метода поликлональной Т-клеточной вакцинации в лечении прогрессирующей формы РС.

Клинические и лабораторные исследования проводились в соответствии с протоколом, утвержденным Ученым советом и Этическим комитетом Института клинической иммунологии СО РАМН. От каждого больного, участвующего в исследовании, было получено информированное согласие. В исследование было включено 39 больных (10 мужчин и 29 женщин) с церебро-спинальной формой и вторично-прогрессирующим течением РС в возрасте от 23 до 54 лет. Способ приготовления индивидуальной Т-клеточной вакцины описан нами ранее. Схема иммунотерапевтического лечения Т-клеточной вакциной включала в себя 4 еженедельных подкожных вакцинации и последующие вакцинации с интервалом в 1 месяц в течение 2 лет. Для оценки антиген-индуцированного пролиферативного ответа МНК (на основной белок миелина) использовался стандартный метод по включению [^{3}H] тимидина. Количественное содержание цитокинов – IFNγ, IL-4, IL-10, IL-17 и IL-18 в образцах сыворотки крови оценивали иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-наборов компании «Вектор-Бест». Для оценки относительного количества цитокин-продуцирующих клеток памяти использовали меченные Per CP МА к CD4 и CD8 и конъюгированные с APC МА к CD45RO. IFNγ- и IL-4 – продуцирующие Т-клетки оценивали с помощью FITC МА к IFNγ и PE МА к IL-4 (все реактивы eBioscience, США). Процент позитивных от общего числа лимфоцитов клеток определяли на иммуноцитометре FACS Calibur.

В нашем исследовании проведение Т-клеточной вакцинации сопровождалось значительным, более чем двукратным снижением пролиферативного ответа мононуклеарных клеток периферической крови на миелиновый антиген (5416±965 имп/мин до и 2479± 614 имп/мин после лечения), что может свидетельствовать об уменьшении функциональной активности миелин-реактивных лимфоцитов у этих пациентов. Также через 2 года после начала лечения у вакцинированных пациентов регистрировалось снижение уровня IFNγ (до лечения 144,0±46,7 пг/мл; после 25,2±13,0** пг/мл) и подъем уровня IL-4 (до лечения 11,7±2,9 пг/мл; после 77,1±33,8** пг/мл) и IL-10 (до лечения 4,4±1,24; после 11,7±4,0* пг/мл) в сыворотке крови, тогда как содержание IL-17 и IL-18 оставались на исходных значениях. Кроме того, у пациентов с РС после проведенного лечения наблюдалось достоверное снижение (в 2 раза) числа IFNγ-продуцирующих $CD4^+$ (до лечения 8,6±3,64; после 3,72±1,23* (здесь и далее указан % от общего числа лимфоцитов) и $CD8^+$ (до лечения 11,1±4,23; после 5,87±1,84*) Т-клеток памяти, а также значительное снижение (в 6 раз) числа $CD4^+$Т-клеток памяти, способных продуцировать оба цитокина (до лечения 8,69±4,91; после 1,41±1,01**), что предполагает системную перестройку функции Т-клеток в сторону противовоспалительных иммунных реакций. Наши данные указывают на значительный иммунорегуляторный потенциал Т-клеточной вакцинации, которая в перспективе может найти широкое применение в лечении РС и других аутоиммунных заболеваний.

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ АУТОИММУНИТЕТА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ И СИНДРОМЕ СОЧЕТАНИЯ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Конищева А.Ю.[1], Гервазиева В.Б.[1], Оспельникова Т.П.[2]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
[2] ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии» им Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия

Хронические заболевания органов дыхания, такие как бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), представляют одну из значимых проблем здравоохранения в мире. Самостоятельный синдром сочетания БА и ХОБЛ (ACOS – англ.), впервые выделенный в версии GINA-пересмотра 2014, характеризуется стойким ограничением воздушного потока в сочетании с худшим прогнозом, более частыми и тяжелыми обострениями и высокой скоростью регресса легочной функции. Предпосылки существования патогенетической взаимосвязи между аутоиммунитетом и хроническими иммуноопосредованными заболеваниями респираторной системы подтверждаются данными исследований, свидетельствующими о наличии аутоАТ IgG классов к различным тканевым белкам у больных тяжелой формой астмы и ХОБЛ. Ранее в нашей лаборатории был разработан метод твердофазного ИФА для определения IgG-и IgE-антител к некоторым тканевым антигенам и выявлено их повышенное содержание в сыворотке крови при аллергической форме БА и атопическом дерматите.

Задачей данной работы явилось дальнейшее исследование IgE аутореактивности и оценка IgG4-аутоАТ в группах пациентов БА с установленным персистирующим ограничением воздушного потока и тяжелым течением заболевания. Были исследованы 48 пациентов с синдромом сочетания БА и ХОБЛ в сравнении с 83 больными БА различной степени тяжести (средний возраст 49±17 лет), ранжированными по полу, возрасту и параметрам ФВД. Группу контроля составили 30 условно здоровых лиц.

В сыворотке крови методом ИФА определяли содержание общего IgE, а также количественное содержание IgE- и IgG4-АТ к некоторым тканевым антигенам – эпителиальному кератину, коллагену III и VI типов, миозину и эластину с помощью конъюгатов моноклональных АТ и референс-реагентов IgE и IgG4 для калибровочной кривой («Полигност», Санкт-Петербург). Количественное содержание цитокинов IL-4, IL-6, IL-8, TGF-β1, TNFα и интерферонов IFNα, IFNγ определяли в образцах индуцированной мокроты и сыворотках крови с помощью ИФА наборов производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

Содержание общего IgE в сыворотках крови пациентов с БА составило 518 (90; 560) и 128 (6; 311) МЕ/мл у лиц при сочетанном синдроме (ACOS). Уровень IgE ответа ко всем исследуемым АГ достоверно возрастал у пациентов с БА с более чем 5-летним стажем заболевания в сравнении с группой пациентов, у которых диагноз БА был установлен в течение последних 6 месяцев ($p < 0,005$). Наибольшая частота выявления IgE-аутоАТ отмечена при БА тяжелого течения. Вклад IgE-АТ к исследуемым аутоАГ в поддержание аллергического воспаления у пациентов с БА подтверждается выявленными положительными корреляциями между уровнем общего IgE и содержанием IgE-аутоАТ к коллагену III типа ($r = +0,3$), эластину ($r = +0,43$) и миозину ($r = +0,39$). Следует отметить, что среди пациентов с сочетанным синдромом частота выявления IgE-аутоАТ к эндотелиальному антигену миозину была максимально высокой (69%), а их уровень был значимо выше (4,1±0,3 МЕ/мл), чем у пациентов с БА (2,3±0,053 МЕ/мл, $p < 0,005$). При этом было отмечено снижение содержания IgG4-АТ ко всем аутоАГ у пациентов с БА тяжелого течения [3750 (2960/5100) нг/мл], в сравнении с легким течением заболевания ($p < 0,02$), и которое было наиболее выражено среди лиц с сочетанием БА и ХОБЛ. Нами установлена прямая корреляция между уровнем IL-4 и IgE-аутоАТ к эластину ($r = +0,57$), коллагену III типа ($r = +0,6$), кератину ($r = +0,4$) и миозину ($r = +0,34$) в сыворотках крови больных БА персистирующего течения. Выявлена также обратная корреляция между IgE- и IgG4-аутоАТ ($r = -0,55$). Важно отметить, что содержание IgG4-аутоАТ находилось в прямой корреляции с сывороточным уровнем IL-10 ($r = +0,7$) у больных БА и ассоциировалось с избыточной спонтанной продукцией IL-8 при сочетанном ACOS синдроме. Далее было обнаружено, что в образцах индуцированной мокроты у пациентов с БА и повышенным содержанием IgG4-аутоАТ определяется достоверно более высокое содержание профиброгенного цитокина TGF-β1 [8,9 (6,7/21) пг/мл] и IL-4 [240 (115/580) пг/мл]. Было отмечено также, что у 11 пациентов с сочетанным синдромом (ACOS) повышенное содержание IgG4-аутоАТ ассоциировало с более низким уровнем спонтанной продукции IL-17 [18(52,3/3,4)] и сопровождалось увеличением спонтанной продукции IL-8 [3585(60/12500) пг/мл]. У 65% пациентов в этой группе отмечалось осложненное течение заболевания, сопровождающееся формированием легочной эмфиземы (согласно данным КТ органов грудной клетки) и характеризующееся преобладанием IgE-АТ к коллагену 3 типа и эластину ($p = 0,006$) и более низким уровнем IgG4-аутоАТ к указанным антигенам.

Таким образом, можно сделать выводы об участии аутореактивности в механизмах прогрессии БА и ХОБЛ. При этом детекция в сыворотке IgE и IgG4-АТ к кератину, коллагену, эластину и миозину может быть использована для клинико-иммунологического мониторинга течения БА, особенно при сочетанном фенотипе с ХОБЛ, осложненном легочной эмфиземой.

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ

Кудрявцев И.В.[1, 2], Баранова О.П.[1], Лазарева Н.М.[1], Серебрякова М.К.[2], Илькович М.М.[1], Сесь Т.П.[1]

[1] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им.акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Саркоидоз – полисистемное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся развитием иммунного воспаления с формированием эпителиоидноклеточных гранулем без некроза с исходом чаще в рассасывание и реже – в фиброз. Факторы, определяющие особенности клинического течения саркоидоза (разрешение гранулемы или прогрессирование фиброза) остаются не достаточно изученными. Предполагают, что ремиссия возникает при клиренсе антигена посредством выраженной Th1-клеточной

реакции и восстановления регуляторных Т-клеток, а также нарушения в гуморальном звене иммунитета. Для более полной характеристики особенностей иммунопатогенеза саркоидоза необходимо тщательное изучение механизмов и межклеточных взаимодействий. Анализ состава Т- и В-лимфоцитов в периферической крови был выполнен у больных саркоидозом (n = 40) и у условно здоровых добровольцев (n = 47), подбор группы сравнения осуществлялся с учетом возрастного и полового состава больных саркоидозом. Исследования выполнены с помощью метода многоцветной проточной цитометрии. Относительное содержание Т-хелперов (Th) в периферической крови достоверно не различалось между группами, однако абсолютное содержание Th у больных было снижено ($p < 0,001$) до 605 (483; 757) кл/мкл по сравнению с группой контроля 757 (670; 923) кл/мкл. Анализ уровня дифференцировки Th выявил снижение как относительного, так и абсолютного числа клеток памяти с фенотипами $CD27^+CD28^+CD45RA^-CD62L^+$ (с 40,04% (35,44; 47,36) до 28,81% (25,58; 35,16) и с 299 (257; 377) до 181 (128; 245) кл/мкл ($p < 0,001$) и клеток памяти с фенотипами $CD27^+CD28^+CD45RA^-CD62L^-$ (с 15,97% (12,22; 20,11) до 11,18% (8,70; 15,16) и с 119 (99; 165) до 62 (49; 101) кл/мкл ($p < 0,001$). Относительное и абсолютное число «наивных» Th было сопоставимо у больных саркоидозом и в группе сравнения, в то время как число зрелых эффекторных $CD27^-CD28^-$ Th у больных саркоидозом было достоверно выше ($p = 0,001$). Известно, что именно эти субпопуляции (клетки памяти $CD27^+CD28^+CD45RA^-CD62L^+$ и $CD27^+CD28^+CD45RA^-CD62L^-$) «патрулируют» периферические лимфоидные органы и способны мигрировать в воспаленные ткани соответственно. Таким образом, на фоне общей анергии Т-звена иммунного ответа на периферии, при более детальном анализе субпопуляций Т-лимфоцитов у больных саркоидозом выявлено существенное повышение числа Т-клеток-эффекторов, мигрирующих в очаги воспаления. При изучении регуляции гуморального ответа установлено снижение относительного числе «циркулирующих» фолликулярных Th (Tfh) с фенотипом $CD45RA^-CXCR5^+$ с 18,29% (14,48; 21,37) до 14,07% (10,32; 16,22) ($p < 0,001$) у больных саркоидозом. Существенные изменения выявлены и в субпопуляционном составе Tfh: у больных отмечено снижение $CXCR5^+CXCR3^+$ Tfh1 с 3,63% (2,43; 5,12) до 2,10% (1,42; 2,53) ($p < 0,001$) и $CXCR5^+CCR6^+$ Tfh17 с 3,63% (2,43; 5,12) до 1,31% (0,85; 1,65) ($p = 0,001$), при повышенном числе $CXCR5^+CCR4^+$ Tfh2 ($p = 0,001$). Изменение «баланса» между субпопуляциями «циркулирующих» фолликулярных Tfh (Tfh1 – с одной стороны и Tfh2 и Tfh17 – с другой) рассматривается в качестве важнейшего признака нарушения гуморального ответа, так как Tfh2 и Tfh17 играют ведущую роль в регуляции механизмов переключения классов синтезируемых иммуноглобулинов. При анализе общего числа В-лимфоцитов не было выявлено достоверных различий у больных саркоидозом (12,41%, 8,25; 16,42) – и в группе здоровых – 13,78% (9,71; 15,48) ($p = 0,675$). Однако более углубленный анализ В-лимфоцитов с учетом стадий их дифференцировки по интенсивности ко-экспрессии CD27 и IgD молекул показал, что 77,31% В-лимфоцитов периферической крови больных саркоидозом (66,79; 81,35) обладали «наивным» фенотипом IgD^+CD27^-, в группе контроля – 60,91% (54,15; 72,42) ($p < 0,001$). При этом у больных саркоидозом снижено число В-клеток памяти с фенотипом IgD^+CD27^+ (7,56% [5,07; 10,34] и 12,95% [9,37; 19,69] [$p < 0,001$]) и IgD^-CD27^+ (10,34% [7,06; 14,73] и 16,50% [13,00; 21,91] [$p < 0,001$]).Установлена достоверная корреляционная связь между числом Tfh17 и уровнем зрелых В-клеток памяти, в геноме которых произошло переключение с IgM на другие классы иммуноглобулинов ($r = 0,502$ при $p < 0,001$). Таким образом, при анализе субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом выявлены новые закономерности регуляции субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, как на уровне эффекторных клеток, так и на уровне клеток иммунологической памяти.

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ПУЛЬС-ТЕРАПИИ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМИ АРТРИТОМ

Курочкина Ю.Д., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Олейник Е.А., Сизиков А.Э., Чумасова О.А., Коненкова Л.П., Сулутьян А.Э., Останин А.А.

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

Введение. Дендритные клетки (ДК) играют важную роль в патогенезе ревматоидного артрита (РА), обладая способностью презентировать хрящевые гликопротеины, продуцировать провоспалительные цитокины и активировать Т-клетки к продукции Th1- и Th17-цитокинов. Наряду со стимулирующей активностью, ДК могут оказывать толерогенный эффект посредством индукции апоптоза/анергии Т-лимфоцитов и генерации регуляторных Т-клеток. Поскольку такие ДК являются негативными регуляторами аутореактивных Т-лимфоцитов, усиление толерогенного потенциала ДК рассматривается в качестве новой стратегии лечения РА. Ранее нами показано, что дексаметазон *in vitro* ингибирует созревание, продукцию провоспалительных цитокинов и аллостимуляторную активность ДК больных РА, генерируемых из моноцитов в присутствии GM-CSF и интерферона-α (IFN-ДК). Однако влияют ли глюкокортикоиды на способность INF-ДК больных активировать аутологичные Т-клетки и воспроизводится ли данный эффект *in vivo* на фоне пульс-терапии глюкокортикоидами, остается неисследованным.

Цель и задачи. Изучить влияния дексаметазона на способность ДК больных РА стимулировать пролиферацию аутологичных Т-клеток *in vitro* и оценить аутостимуляторную активность INF-ДК в динамике до и после пульс-терапии глюкокортикоидами *ex vivo*.

Материалы и методы. В исследование было включено 10 пациентов с РА с высокой и умеренной активностью заболевания (DAS 28 > 3,1). Генерацию ДК и оценку их свойств проводили до проведения пульс-терапии метилпреднизолоном 500 мг № 3 и после пульс-терапии. ДК генерировали путем культивирования моноцитов в течение 5 суток с GM-CSF и IFNα в отсутствие и присутствии декасаметазона, вносимого на 3 сутки. LPS в качестве дозревающего стимула вносили на 4 сутки. Функцию ДК оценивали по способности стимулировать пролиферацию аллогенных (алло-СКЛ) и аутологичных (ауто-СКЛ) мононуклеарных клеток (МНК).

Результаты. Генерированные в присутствии дексаметазона ДК больных обладали меньшей стимуляторной активностью как в алло-СКЛ ($p = 0,01$), так и в ауто-СКЛ ($p = 0,05$). Ингибирующий эффект дексаметазона на стимуляторную активность в алло-СКЛ составлял 49% (LQ-UQ 38-55%), в ауто-СКЛ – 57% (LQ-UQ 38-55 %). Сравнение стимуляторной активности ДК до и после

пульс-терапии метилпреднизолоном выявило снижение аллостимуляторной активности с 21037 (18614-21345) до 11531 (9494-20052) имп/мин, которое при индивидуальном анализе регистрировалось у 8 из 10 больных. В то же время снижение стимуляторной активности ДК в ауто-СКЛ после терапии регистрировалось только у 6 из 10 пациентов, тогда как в 4 случаях данный показатель возрастал (n = 3) или не менялся (n = 1). Соответственно, достоверного снижения ответа в ауто-СКЛ после пульс-терапии в целом по группе не наблюдалось (Me 10126 против 12247 имп/мин). Сравнение пациентов, ответивших (группа 1) и не ответивших (группа 2) на терапию снижением стимуляторной активности ДК в ауто-СКЛ, не выявило различий в исходной активности заболевания и чувствительности к действию дексаметазона *in vitro*. При этом терапия у пациентов группы 1 сопровождалась более интенсивным снижением СОЭ, чем у пациентов группы 2 (35 против 23%).

Заключение. ДК больных РА сохраняют чувствительность к толерогенному действию дексаметазона, который подавляет способность ДК стимулировать пролиферацию не только аллогенных, но и аутологичных Т-лимфоцитов. Несмотря на подавление *in vitro* аллостимуляторной активности ДК у всех пациентов, ингибирующий эффект пульс-терапии метилпреднизолоном *in vivo* регистрируется только у 60% больных РА. Дальнейшие исследования стимуляторной активности ДК могут представлять интерес в качестве поиска предикторов эффективности терапии при РА.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ CD38, ICAM-1, Fas И IL-2rα, В КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Кхедри Ф.[1], Курников Г.Ю.[2], Фомина С.Г.[1], Новиков В.В.[1]

[1] Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
[2] Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

Введение. Псориаз является хроническим воспалительным заболеванием кожи, характеризующимся высоким уровнем пролиферации кератиноцитов, а также инфильтрацией в дермис клеток как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. Передача сигналов в клетки иммунной системы осуществляется многими поверхностными рецепторами. Среди них мембранные молекулы CD38, ICAM-1, Fas и IL-2rα, участвующие в межклеточных взаимодействиях, активации клеток и инициации апоптоза. Характер экспрессии этих генов, определяемый по уровню их мРНК, может быть информативным показателем состояния иммунитета и течения иммуно-опосредованных заболеваний, в том числе псориаза.

Цель. Определение уровня мРНК CD38, ICAM-1, Fas и IL-2rα в цельной периферической крови больных псориазом.

Материалы и методы. Исследовали 80 образцов периферической крови больных псориазом, проходивших лечение в Нижегородской городской больнице № 13, а также 50 образцов периферической крови здоровых доноров, полученных из Нижегородского областного центра переливания крови. Выделение нуклеиновых кислот проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Определение уровней мРНК осуществляли методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Относительные уровни исследуемых мРНК оценивали методом сравнения пороговых циклов (ΔΔCt). Больные по степени тяжести заболевания (PASI) были разделены на две группы: «от 10 до 30» и «от 30 и до 72». Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы Statistica 10.0. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты. Полученные результаты показали статистически значимое увеличение уровня мРНК молекул IL-2rα в периферической крови больных псориазом как у первой группы (PASI от 10 до 30), так и у второй (PASI от 30 и до 72) в 9 и 12 раз, соответственно, по сравнению с донорами. Уровень мРНК молекул Fas в крови больных псориазом также был статистически значимо выше, чем в норме. У больных первой группы (PASI от 10 до 30) он повышался в 1,8 раза, а у больных второй группы – в 1,6 раза (PASI от 30 и до 72). В то же время уровень мРНК молекул адгезии CD38 и ICAM-1 у больных псориазом в обеих группах оставался в пределах нормы. Обращала на себя внимание лишь тенденция к увеличению уровня мРНК CD38 молекул у больных первой группы (PASI от 10 до 30).

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о повышении экспрессии генов, кодирующих α-цепь рецептора интерлейкина-2 и молекулы Fas (CD95) в суммарной фракции клеток крови. Обе молекулы являются маркерами активации клеток иммунной системы, при этом последняя участвует в инициации апоптоза по Fas-зависимому пути. Наиболее выраженное повышение уровня экспрессии обнаруживалось для гена IL-2rα.

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ TLRs И ПОЛИМОРФИЗМА ИХ ГЕНОВ В РАЗВИТИИ СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Левкович М.А., Галкина Г.А., Крукиер И.И., Воропай А.А., Григорянц А.А.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Сахарный диабет является важной медико-социальной проблемой современной медицины, что обусловлено увеличением его распространенности и тяжестью течения. В последние годы активно обсуждается роль иммунных механизмов, в частности, хронического воспаления, в развитии, как сахарного диабета, так и его сосудистых осложнений. Медиаторами воспалительного ответа, играющего важную роль в формировании микроангиопатии являются молекулы врожденного иммунитета – TLRs. Триггером активации TLRs при гипергликемии могут являться насыщенные жирные кислоты.

В этой связи **целью** исследования явилось определение роли экспрессии TLR-2, TLR-4 и полиморфизма их генов в формировании микроангиопатии при сахарном диабете (СД1) у подростков.

В исследование был включены 66 подростков в возрасте от 14 до 18 лет, с декомпенсацией СД1 и дислипидемией, которые были подразделены на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия микроангиопатий. В I группу вошли 38 пациентов с различными микроангиопатиями, во II группу – 28 пациентов без признаков микроциркуляторных нарушений. Группу контроля сформировали 18 «условно здоровых» подростков. Определение экспрессии TLR-2 ($CD14^+CD282^+$) и TLR-4 ($CD14^+CD284^+$) рецепторов на

моноцитах периферической крови проводилось методом двухцветной проточной цитофлуориметрии с использованием диагностических наборов HyCultbiotechnology (Нидерланды). Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили с использованием лизирующего раствора OptiLiseC фирмы Immunotex (Франция). Результаты учитывали на проточном цитофлюориметре BECKMAN COULTER EPICS XL-II (США), используя стандартные протоколы. Определение аллельных вариантов генов проводили методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом тест-системами ГосНИИгенетика (Москва). Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.

Было установлено, что у пациентов I и II групп по сравнению с контрольной группой отмечались выраженные изменения показателей врожденного иммунитета в виде статистически значимого повышения экспрессии $CD14^+CD282^+$ на моноцитах (72,4±8,1% и 60,8±4,4% против 30,7±10,8% соответственно, $p < 0,05$). При анализе частоты полиморфизма генов TLR-2 обнаружено, что в I группе по сравнению с контрольной и II группой частота генотипа Arg/Arg встречалась достоверно чаще (68,7% против 25,6 и 24,5% соответственно, $p < 0,05$), следовательно, у носителей аллеля Arg гена TLR-2 риск развития микроангиопатии при сахарном диабете выше, а генотип Arg753Gly, вероятно, имеет протективный эффект.

Таким образом, увеличение экспрессии TLR-2, наличие полиморфизма кодирующих генов, могут приводить к каскаду внутриклеточных сигнальных событий, с последующей стимуляцией транскрипции многих провоспалительных регуляторных субстанций, которые, в свою очередь, способствуют развитию диабетической микроангиопатии.

ВЫЯВЛЕНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЦЕЛИАКИИ ПРИ РАЗНЫХ ГЕНОТИПАХ

Малкова А.М., Будкова А.И.

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Целиакия – хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся поражением эпителия тонкой кишки в результате иммунного ответа организма на дезаминированный глиадин. Согласно рекомендациям ESPGHAN 2012 диагноз целиакия подтверждается с помощью серологической диагностики специфичных антител, гистологического исследования тонкой кишки, выявления HLA DQ2/ DQ8 генотипов.

Цель. Определить достоверность встречаемости серологических маркеров целиакии при разных генотипах.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовались образцы венозной крови 105 обследуемых лиц. Антитела к человеческой тканевой трансглутаминазе 2 типа и дезаминированному пептиду глиадину IgG определялись методом ИФА, антитела к эндомизию IgA методом нРИФ.

Для определения генотипа HLA DQ2/DQ8 обследуемых применялся метод ПЦР real time.

Результаты. Из 105 обследуемых у 56 % (59/105) были выявлены специфичные для целиакии HLA- DQ генотипы. Среди них преобладают аллельные формы HLA-DQ2.5; HLA-DQ2.2 – 25% (13/59). Частота генотипа HLA-DQ2.5, как и HLA-DQ8 составила 23,1% (12/59), HLA-DQ8;HLA-DQ2.2 9,6% (5/59). Повышенные титры специфичных антител чаще всего наблюдаются при генотипе HLA-DQ2.5 – 25% (3/12).

Достоверно встречаемость повышенных титров специфичных антител выше у лиц с положительным генотипом.

Заключение. Исследование показало, что наиболее часто встречаемыми генотипами среди обследуемых являются аллельные формы HLA-DQ2.5; HLA-DQ2.2 , HLA-DQ8 и HLA-DQ2.5. При этом у лиц с генотипом HLA-DQ2.5 серологические маркеры целиакии выявляются чаще всего.

Поскольку была выявлена статистически значимая разница при анализе результатов серологической диагностики на антитела к тканевой трансглютаминазе, эндомизию и генотипирования, можно говорить об оправданности использования тестов на выявление повышенных титров именно этих антител для диагностики целиакии.

ЭКСПРЕССИЯ АКТИВАЦИОННЫХ МАРКЕРОВ Т-ХЕЛПЕРАМИ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ Т-КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ МИТОГЕНОМ *IN VITRO*

Пашнина И.А.

Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург, Россия
Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Исследование экспрессии маркеров активации лимфоцитов широко используется для оценки функционального состояния этих клеток. При этом стимуляция митогенами *in vitro* позволяет исследовать общую реактивность той или иной клеточной популяции. Наиболее удобными объектами исследования при стимуляции являются рецепторы лимфоцитов, экспрессия которых увеличивается за короткий промежуток времени, в частности CD25, CD38, CD69. Увеличение экспрессии этих молекул можно зафиксировать с помощью проточной цитометрии уже через 4-24 часа после индукции. **Целью** настоящей работы явилось исследование спонтанной и стимулированной экспрессии CD25, CD38, CD69 у детей с аутоиммунными (ревматическими) заболеваниями соединительной ткани.

Обследованы дети 6-17 лет с ревматическими заболеваниями в стадии активности: ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, n = 75), ювенильной склеродермией (ЮСД, n = 16), системной красной волчанкой (СКВ, n = 15), а также условно здоровые дети (контроль, n = 32). Образцы цельной периферической крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия) в соотношении 1:9 и инкубировали при 37 °C, 5% CO_2 в течение 4-х часов (оценка экспрессии CD69) или 4-х часов (оценка экспрессии CD25, CD38) без стимулятора

и при стимуляции фитогемагглютинином (ФГА, Sigma) в конечной концентрации 20 мкг/мл. Подсчет количества CD25, CD38- и CD69-позитивных Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) и цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) проведен методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA). Для статистического анализа данных использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

Выявлено, что после инкубации без стимулятора количество CD69-позитивных Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток у детей с аутоиммунной патологией не отличалось от условно здоровых детей. При индукции ФГА доля клеток, экспрессировавших CD69, во всех субпопуляциях при всех заболеваниях была ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Количество CD38-позитивных клеток среди $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ у всех детей с ревматическими заболеваниями было снижено по сравнению с контролем, как в спонтанном варианте, так и при стимуляции митогеном ($p < 0,05$). Количество цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессировавших CD25, в группах больных не отличалось от контрольного уровня при обоих вариантах инкубации. Спонтанное и стимулированное количество $CD3^+CD25^+$ и $CD3^+CD4^+CD25^+$ у больных с ЮИА и ЮСД было значительно ниже, чем у условно здоровых детей ($p < 0,05$), у больных с СКВ различия наблюдались на уровне тенденции ($p < 0,1$).

Таким образом, количество $CD3^+CD4^+CD25^+$ и $CD3^+CD8^+CD25^+$ при воздействии мутагена изменялось несхожим образом. Следует отметить, что большинство CD25-позитивных Т-хелперов составляют популяцию регуляторных Т-клеток, обладающих супрессорными свойствами (Sakaguchi S., 2011), тогда как $CD3^+CD8^+CD25^+$ могут быть в большей степени представлены активированными эффекторами. Ранее нами было показано, что изменение количества регуляторных Т-клеток $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$ и активированных Т-хелперов $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^+$, в совокупности составляющих субпопуляцию CD25-позитивных Т-хелперов, подчиняется различным закономерностям (Пашнина И.А., 2014). Учитывая функциональную разнородность субпопуляции $CD3^+CD25^+$, представляется целесообразным оценивать экспрессию CD25 отдельно на Т-хелперах (с разделением на регуляторные Т-клетки и активированные Т-хелперы) и цитотоксических Т-клетках. При этом общие закономерности изменения экспрессии CD38 и CD69 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках совпадали, что может указывать на возможность определения совокупной экспрессии этих маркеров на Т-лимфоцитах при стимуляции *in vitro* у детей с аутоиммунной патологией соединительной ткани. Однако для подтверждения этого заключения необходимо понимание функциональной роли CD38- и CD69-позитивных Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, которая, несмотря на многочисленные публикации по этой теме, остается пока спорной.

Автор выражает искреннюю благодарность врачам Областной детской клинической больницы № 1 Козловой Е.С. и Скоробогатовой О.В. за подбор пациентов для исследования.

РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПРОГНОЗЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ВЗК У ДЕТЕЙ

Петричук С.В.[1], Мирошкина Л.В.[1], Курбатова О.В.[2], Закиров Р.Ш.[1], Радыгина Т.В.[1], Самохина И.В.[1], Цимбалова Е.Г.[1]

[1] ФГБНУ «Научный центр здоровья детей», Москва, Россия
[2] ФГБНУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[3] ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет» им. Н.Н. Пирогова, Москва, Россия

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – хронические, рецидивирующие не инфекционные заболевания ЖКТ, приводящие к необратимому нарушению его структуры и функции. Развитие хронического воспаления при ВЗК происходит в результате срыва толерантности иммунной системы к микробиоте кишечника под действием триггерных факторов. Выявление высоких концентрации TNFα в биоптатах кишечника пациентов с ВЗК позволило разработать патогенетическую стратегию лечения – биологическую терапию (БТ), включающую применение моноклональных антител, блокирующих TNFα. Применение БТ при ВЗК позволило увеличить долю пациентов, достигающих стабильной ремиссии, однако, в виду потери ответа к препарату у трети пациентов не наблюдается стойкого эффекта от БТ. Показано, что эффективность БТ определяется исходным уровнем TNFα в плазме крови, а также содержанием Th17-лимфоцитов (Th17-лф), активированных Т-хелперов (act-Th) и регуляторных Т-клеток (Treg). Известно, что эффекторные функции лимфоцитов (пролиферация, дифференцировка) напрямую зависят от интенсивности их метаболизма.

Цель. Оценить диагностическую значимость показателей метаболической активности популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности инфликсимаба.

Материалы и методы. Обследовано 136 детей в возрасте 10-18 лет с ВЗК (БК-87 пациентов, ЯК-49 пациентов). Пациенты наблюдались в динамике заболевания: до назначения БТ и через 1 год БТ. В зависимости от эффективности БТ пациенты были распределены на 2 группы: со стойким положительным эффектом (группа 1, $n = 44$) и с нестойким эффектом БТ (группа 2, $n = 92$). Интенсивность энергообмена популяций лф оценивали по активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – фермента цикла Кребса и II этапа дыхательной цепи митохондрий. Определение активности СДГ в основных и малых популяциях лимфоцитов периферической крови проводили на проточном цитометре CYTOMICS FC500 иммуноцитохимическим методом. Статистическая обработка выполнена с помощью пакета Statistica 6.0, ROC-анализ выполнялся с использованием программы SPSS 16.0

Результаты. До назначения БТ активность СДГ в популяциях Т-лф, Т-хелперах, В-лф и Treg у пациентов в группе 1 была достоверно выше, чем в группе 2, причем наибольшие отличия наблюдались в популяции Treg (AUC = 0,820). Через год БТ у пациентов группы 1 высокая активность СДГ сохранялась только в популяциях Т-хелперов и в Treg. ROC-анализ данных выявил, что активность СДГ в популяциях Treg-лф, Т-хелперах и В1-

лф, а также исходное содержания Th17-лф являются наиболее информативными показателями для прогнозирования эффекта БТ. Численность Th17-лф превышающая 18,6% от $CD3^+CD4^+$ и снижение активности СДГ в популяции Treg ниже, чем на 15% относительно референсных значений позволяют прогнозировать нестойкий терапевтический ответ на БТ. Длительное течение заболевания (более 5 лет) до начала БТ сопровождается выраженным уменьшением активности СДГ в популяциях Т-хелперов, что снижает эффективность БТ.

Выводы. Иммуноцитохимическое исследование и иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови у пациентов с ВЗК имеют прогностическую значимость и позволяют с высокой вероятностью прогнозировать эффект лечения блокаторами TNFα. Полученные результаты обосновывают раннее назначение БТ для получения стойкого терапевтического эффекта. Детям с ВЗК показано динамическое определение метаболической активности лимфоцитов и своевременная коррекция выявленных изменений, в том числе препаратами, улучшающими энергетический обмен клетки.

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ КОМОРБИДНОСТИ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА II (СД2) И ХОБЛ В ПЕРИОД ПЕРИМЕНОПАУЗЫ

Попкова А.С.

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

Введение. Основой прогрессирования СД2 при коморбидности с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) является хроническое воспаление – комплексный иммунопатологический процесс, включающий реакции врожденного и адаптивного иммунитета. Значимая роль в этих процессах принадлежит провоспалительным цитокинам. Изменение их баланса приводит к нарушениям не только в зоне воспаления, но и на системном уровне. У этих больных наблюдается подавление фагоцитарной активности нейтрофилов, дисбаланс различных субпопуляций Т-лимфоцитов, снижение содержания В-лимфоцитов. В развитии коморбидности СД2 с ХОБЛ нельзя исключить также влияние половых гормонов, особенно в старшем возрасте. Изменения их физиологических концентраций вызывают раннюю инволюцию тимуса и селезенки и, как следствие, нарушения клеточного и гуморального иммунитета. Однако данные о состоянии гуморального звена врожденного и адаптивного иммунитета при коморбидности СД2 с ХОБЛ, протекающих на фоне гормональных расстройств в период перименопаузы, практически отсутствуют.

Цель. Исследовать влияние гормонального дисбаланса у пациенток с СД2, протекающего на фоне ХОБЛ и климактерического синдрома, на содержание провоспалительных цитокинов и иммуноглобулинов в биологических жидкостях.

Материалы и методы. Было обследовано 100 женщин с СД2 на фоне стабильно протекающей ХОБЛ 2 степени тяжести по GOLD (2011) (среднетяжелой) и климактерического синдрома либо без такового (группа сравнения) в возрасте 43-55 лет. Содержание цитокинов проводили в бронхо-альвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) и сыворотке крови больных методом проточной цитофлуорометрии (Beckman Coulter FC500, США) с использованием наборов реактивов для мультикомплексного определения цитокинов (BMS810FF) человека в соответствии с инструкциями производителя. Анализ полученных данных проводили лицензированной программой разработчика FlowCytomix Prover. 3.0. Содержание IgM, IgG, IgA определяли в сыворотке крови больных с помощью иммуноферментного анализа (R&D Systems, США). Статистическую обработку проводили с помощью критерия (t) Стьюдента.

Результаты. Сравнительный анализ содержания цитокинов в БАЛЖ и сыворотке крови больных СД2, отягощенного ХОБЛ и климактерическим синдромом, выявил достоверное увеличение концентраций IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα и IFNγ, по сравнению с группой сравнения, что свидетельствует о наличии как местного, так и системного воспаления. Оценка содержания IgM, IgG и IgA в сыворотке крови этих больных показала, что их уровень достоверно ниже нормы практически здоровых женщин. Из полученных данных следует, что коморбидность СД2 с ХОБЛ, протекающих в период перименопаузы, приводит к истощению иммунной системы и развитию иммунодефицита В-клеточного звена иммунитета.

Заключение. Таким образом, установлено неблагоприятное влияние гормональных нарушений у женщин в период перименопаузы на течение СД2 при его коморбидности с ХОБЛ. Повышение концентрации провоспалительных цитокинов с одной стороны и снижение содержания иммуноглобулинов с другой стороны способствуют поддержанию местного и системного хронического воспалительного процесса.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-ЛИМФОЦИТЫ И СУБПОПУЛЯЦИИ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Семакова П.Н.[1], Олейник Е.К.[1], Жулай Г.А.[1], Чуров А.В.[1], Олейник В.М.[1], Барышева О.Ю.[2], Марусенко И.М.[2]

[1] ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, Петрозаводск, Россия
[2] ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

Введение. Регуляторные Т-клетки (Tregs) играют существенную роль в контроле иммунного ответа и представляют собой одну из важных мишеней в иммунотерапии аутоиммунитета. Ревматоидный артрит (РА) – это аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, связано с нарушением Т-клеточной толерантности в организме. Количественные и/или качественные изменения в Treg-клетках могут приводить к развитию РА. Вместе с тем остается открытым вопрос о том, как поддерживается численность и функциональная активность Tregs при РА. В литературе накапливаются данные о важной роли Т-клеток памяти с фенотипом $CD4^+CD45RO^+$ в развитии аутоиммунных заболеваний. Показано, что на стадии обострения у больных рассеянным склерозом количе-

ство этих клеток возрастает. Есть данные о тесной TCR клональной гомологии между Tregs и $CD4^+$Т-клетками памяти, что может указывать на то, что популяции Tregs пополняются из пула Т-клеток памяти. Это особенно интересно при аутоиммунных процессах, когда антигенные стимулы к образованию Т-клеток памяти могут быть регулярными. Целью исследования стало изучение популяций Tregs и Т-клеток памяти по уровню экспрессии молекулярных маркеров (CD4, CD25, FoxP3, CD45RO) на лимфоцитах периферической крови больных РА.

Материалы и методы. Обследовано всего 23 образца периферической крови больных ревматоидным артритом в возрасте от 33 до 72 лет. Контрольную группу составили 17 образцов крови здоровых доноров в возрасте от 25 до 67 лет. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Для оценки экспрессии молекул использовали моноклональные антитела CD4-FITC, CD25-PC5, CD45RO-PC7 (Beckman Coulter, Франция), а также FoxP3-PE (eBioscience, США). Для оценки внутриклеточных маркеров выполняли пермеабилизацию с использованием коммерческих наборов и согласно инструкции производителя. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0, достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна–Уитни, для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент корреляции Спирмена. Данные представлены в виде M±SD.

Результаты. В работе было проанализировано содержание Treg-клеток с фенотипами $CD4^+FoxP3^+$, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, $CD4^+FoxP3^+CD45RO^+$ в периферической крови больных РА (n = 27) и здоровых доноров (n = 17). Было отмечено, что у больных РА количество $CD4^+FoxP3^+$ (9,8±3,0) и $CD4^+FoxP3^+CD45RO^+$Т-лимфоцитов (8,1±2,4) было повышено по сравнению с донорами (7,1±1,6; 6,0±1,3 соответственно, $p < 0,05$). Интересно отметить, что у этих больных содержание лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD45RO^+$ (73,2±13,1) также отличалось от показателей в контрольной группе (62,5±10,5, $p < 0,05$). При этом число $CD4^+CD25^+FoxP3^+$Treg-клеток у больных было на уровне контроля.

Также в группе больных обнаружена положительная корреляция между уровнем $CD4^+FoxP3^+CD45RO^+$ клеток и с Treg-ассоциированными фенотипами: $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, $CD4^+FoxP3^+$ ($r = 0,54$, $p < 0,02$; $r = 0,7$, $p < 0,01$ соответственно).

Заключение. Повышенное содержание клеток памяти, вероятно, может указывать на антигенспецифическую экспансию клеток в ответ на повторяющиеся, системные воздействия антигена у больных РА. Обнаружена четкая положительная корреляция между клетками памяти и фенотипами, ассоциированными с Tregs. Возможно, Т-клетки памяти при РА характеризуются хроническим состоянием активации и представляют собой постоянный источник конверсии в Treg, что позволяет считать эти клетки перспективной мишенью для иммунотерапии.

Финансирование проекта осуществлялось на средства федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0040 и при поддержке гранта РФФИ_а № 16-04-00567.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА IL-1 У БОЛЬНЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Сташкевич Д.С.[1], Петрова Е.О.[1], Василенко А.Г.[2], Суслова Т.А.[3], Бурмистрова А.Л.[1]

[1] ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия
[2] ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск, Россия
[3] ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», Челябинск, Россия

Введение. Неспецифический язвенный колит (НЯК) – хроническое мультифакторное заболевание толстой кишки, характеризующееся иммунным воспалением ее слизистой оболочки и повышенной экспрессией основных провоспалительных цитокинов TNFα, IL-1, IL-6 (Lakatos P.L., 2006). Генами-кандидатами НЯК могут выступать гены про/противовоспалительных цитокинов, прежде всего гены семейства IL-1 (Воробьев Г.И., 2008). Однако результаты геном-ассоциированных исследований, посвященных оценке генетической составляющей НЯК носят противоречивый характер (Nemetz A., 1999; Воробьев Г.И., 2008; Lopez-Hernandez R., 2015). В связи с вышеизложенным, **целью** исследования явился сравнительный анализ распределения частот встречаемости аллельных вариантов, генотипов и гаплотипов полиморфизма генов IL-1β +3953C/T и IL-1ra VNTR у больных неспецифическим язвенным колитом и здоровых лиц русской популяции Челябинской области.

Материалы и методы. Группа больных НЯК – пациенты ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» (139 человек). Группа сравнения – потенциальные доноры стволовой клетки крови русской популяции (213 человек) ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови». Принадлежность к популяционной группе определялась по данным генеалогического анамнеза до третьего поколения (согласно рекомендациям Международного Симпозиума, 1980 г., Лос-Анджелес). Методы исследования: выделение ДНК из образцов периферической крови с использованием реагентов PROTRANS DNA Box 500. Прямая ПЦР-амплификация для VNTR во втором интроне гена IL-1ra (реактивы ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск), аллель-специфическая ПЦР для SNP в полиморфном сайте +3953C/T IL-1β (реактивы ООО НПФ «Литех», Москва), с последующей УФ-детекцией результатов в 3% агарозном геле. Статистическая обработка. Критерии для анализа: частота аллеля, генотипа, частоты гаплотипов (H) и параметры неравновесного сцепления (D, p). Подсчет частот гаплотипов проводился в программе Arlequin 3.5 (Excoffier L., 2010). Достоверность различий оценивалась с помощью критерия Пирсона (χ^2), точного двустороннего критерия Фишера. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \le 0,05$.

Результаты. Наблюдаемые в исследовании частоты аллелей и генотипов в выборках больных НЯК и условно здоровых лиц соответствуют ожидаемым согласно закону Харди–Вайнберга.

На первом этапе был проведен анализ распределения частот встречаемости аллелей и генотипов генов IL-1β, IL-1ra. В группе больных НЯК отмечено незначительное снижение частоты встречаемости аллеля с заменой +3953*T IL-1β (20% *vs* 24% p = 0,27) за счет снижения носителей гомозиготного генотипа (2,8% *vs* 6,6% p = 0,096, тенденция). Распределение частот аллелей и генотипов IL-1ra не разли-

чалось между исследуемыми группами. В группе больных представлены носители аллелей с 4-кратным, 2-кратным, 5-кратным повторами, но не встречались носители редкого аллеля с 3-кратным повтором, тогда как частота этого аллеля в контроле составила 0,5 %.

На втором этапе был проведен анализ распределения гаплотипов +3953 IL-1β – VNTR IL-1ra и параметров сцепления. В группе больных НЯК было выявлено 6 гаплотипов, в группе сравнения – 8. Согласно параметрам сцепления аллель с заменой +3953*T IL-1β сцеплен с аллелем 4r IL-1ra (в группе НЯК D = 0,046; χ^2 = 17,6; p < < 0,01; в группе сравнения D = 0,039; χ^2 = 16,7; p < < 0,01), а предковый аллель +3953*C IL-1β – с мутантным аллелем 2r IL-1ra (в группе НЯК D = 0,043; χ^2 = 15,4; p < < 0,01; в группе сравнения D = 0,039; χ^2 = 17,5; p < < 0,01). В обоих группах наиболее часто встречающимися были гаплотипы +3953*C – 2r (в группе НЯК H = 0,25; в группе сравнения H = 0,21), +3953*C – 4r (в группе НЯК H = 0,52; в группе сравнения H = 0,53), +3953*T – 4r (в группе НЯК H = 0,19; в группе сравнения H = 0,18). Отмечено незначительное снижение частоты встречаемости гаплотипа +3953*T – 2r в группе больных НЯК, не имеющее прогностической значимости для восприимчивости к НЯК (H = 0,022 *vs* H = 0,06; p = 0,14). В группе больных НЯК не было отмечено носителей редкого гаплотипа +3953*C – 3r.

Заключение. Проведенное исследование позволяет считать, что формирование предрасположенности/устойчивости к неспецифическому язвенному колиту у русских Челябинской области, вероятно, не связано с исследуемыми генами.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА, ВЫЗВАННОГО Fc-ФРАГМЕНТАМИ IgG, НЕСУЩИМИ АНТИГЕННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ДЛЯ РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА

Столярова Е.Ю., Сидоров А.Ю., Падерина Л.А., Чалый И.А.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Введение. В недавно проведенных нами исследованиях, нацеленных на выяснение механизмов регуляции аутореактивных лимфоцитов был выявлен новый, ранее не известный, фактор негативной регуляции аутореактивности, препятствующий развитию экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний. Было показано, что данный фактор представляет собой антиидиотипические антитела к лимфоцитам против антигенов-индукторов экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний и в тоже время обладает специфичностью к неоантигенным детерминантам на Fc-фрагментах гомологичного IgG. Способность взаимодействовать с Fc-фрагментами IgG позволила отнести антиидиотипические антитела с регуляторными свойствами к ревматоидному фактору, который получил название регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) (Beduleva, 2017). Было показано, что иммунизация Fc-фрагментами гомологичного IgG, стимулирующая продукцию регРФ, редуцирует симптомы артрита, подавляет продукцию аутоантител к коллагену в модели коллаген-индуцированного артрита крыс (Beduleva, 2017; Menshikov, 2015), что, в свою очередь, позволяет рассматривать Fc-фрагменты IgG, несущие антигенные детерминанты для регРФ, как основу принципиально новой перспективной вакцины для лечения артрита. Для разработки схемы иммунизации вакциной важно знать механизм активации лимфоцитов, продуцирующих регРФ, Fc-фрагментами IgG. Исследование кинетики продукции регРФ является подходом, позволяющим частично раскрыть механизм активации В-лимфоцитов, продуцирующих регРФ, предположить роль Т-хелперов в активации регРФ-продуцирующих лимфоцитов, вызываемой Fc-фрагментами IgG.

Цель и задачи. Провести сравнительный анализ кинетики регРФ в ответ на введение Fc-фрагментов IgG, несущих неоантигенные детерминанты для регРФ, и антител к аутологичным и гетерологичным Т-зависимым антигенам.

Материалы и методы. Кинетику продукции регРФ у крыс, вызванную Fc-фрагментами IgG крыс, сравнивали с кинетикой продукции антител к гетерологичным антигенам и аутоантигенам. Крыс Wistar иммунизировали Fc-фрагментами IgG, несущими антигенные детерминанты для регРФ, в дозе 300 мкг, бычьим коллагеном II типа в дозе 400 мкг, основным белком миелина морской свинки в дозе 25 мкг, человеческим сывороточным альбумином в дозе 200 мкг, IgG человека в дозе 150 мкг. Все белки вводили внутрикожно, в составе эмульсии содержащей неполный адъювант Фрейнда (НАФ), кроме ОБМ, который вводили в составе полного адъюванта Фрейнда. Мышей иммунизировали аутоэритроцитами ($4,5 \times 10^8$ клеток/мышь) внутрибрюшинно. РегРФ определяли методом агглютинации танизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов. Антитела к белкам определяли методом иммуноферментного анализа. Аутонтитела к эритроцитам мыши определяли в реакции Кумбса.

Результаты. Обнаружено, что при иммунизации крыс Fc-фрагментами IgG крыс, несущими антигенные детерминанты для регРФ, титр регРФ достигает максимума на 7 день после иммунизации, на 14 день снижается до исходного уровня. Титр антител к гетерологичным белковым антигенам (бычий коллаген II типа, основный белок миелина морской свинки, человеческий сывороточный альбумин, IgG человека) достигает максимума на 21-35 дни. Все исследованные антигены являются Т-зависимыми антигенами, что объясняет достижение максимума продукции антител против антигенов к 21-35 дню после иммунизации. Поскольку Fc-фрагменты IgG, несущие неоантигенные детерминанты для регРФ, могут рассматриваться как аутоантиген, была исследована также скорость нарастания аутоантител в крови мышей в ответ на введение аутоэритроцитов. Титр аутоантител мыши к аутоэритроцитам достигал максимума на 15 день. В отличие от всех исследованных антигенов Fc-фрагменты, несущие антигенные детерминанты для регРФ, индуцируют быстрый и короткий иммунный ответ, что позволяет предполагать, что Fc-фрагменты, несущие антигенные детерминанты для регРФ, являются Т-независимым антигеном и активируют регуляторные, продуцирующие ревматоидный фактор В-лимфоциты без участия Т-хелперов.

Заключение. Продукция регРФ в ответ на введение Fc-фрагментов IgG, несущих антигенные детерминанты для регРФ, носит транзиторный характер с максимумом продукции на 7 день после иммунизации, что позволяет

предполагать Т-независимый характер активации регРФ-продуцирующих лимфоцитов Fc-фрагментами IgG.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-60164 мол_а_дк.

ЭФФЕКТЫ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА АКТИВАЦИЮ И РЕПЛИКАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ CD4⁺Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Тодосенко Н.М., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Литвинова Л.С.

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Введение. Ревматоидный артрит (РА) – аутоиммунное заболевание (АИЗ), патогенез которого опосредован аутореактивными синовиально-подобными $CD4^+CD45RO^+$Т-клетками (VanderBorght A. et al., 2001; Spreafico et al., 2016). До настоящего времени патогенетической терапии РА не разработано; основным методом лечения РА является противовоспалительная терапия синтетическими глюкокортикоидами (ГК), использование которых сопровождается развитием побочных эффектов, в т.ч. со стороны иммунной системы.

Цель. Оценка влияния дексаметазона (Dex) на функциональную активность $CD4^+CD45RO^+$Т-клеток больных РА в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом исследования служили мононуклеарные лейкоциты (МНК), выделенные из венозной гепаринизированной крови, полученной от 20 условно здоровых доноров (10 женщин и 10 мужчин, средний возраст 35,3±8,9 лет) и 50 больных РА (38 женщин и 12 мужчин, средний возраст 36,4±7,2 лет). МНК получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографин (1,077 г/см^3) (Pharmacia, Швеция). Выделенные методом сепарации (MiltenyiBiotec, Germany) $CD3^+CD4^+CD45RO^+CD14^-CD19^-$ лимфоциты (далее, $CD4^+CD45RO^+$ клетки) ($1,0 \times 10^6$ кл/мл) инкубировали в бессывороточной среде Искова без/в присутствии Т-клеточного активатора (T-Cell Activation/ ExpansionKithuman, Ac/Exp) (MiltenyiBiotec, Germany) и разных концентраций Dex (Orion Pharma, Россия) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 в течение 48 ч. Варианты культивирования: 1) интактная проба (без добавления Ac/Exp и синтетических ГК); 2) проба с добавлением Ac/Exp; 3) пробы с добавлением Ac/Exp и разных концентраций Dex (2; 8; 16; 32; 64 мг). Оценку числа клеток, несущих поверхностные маркеры (CD28, CD25, CD71) проводили методом проточной цитофлюориметрии с помощью моноклональных антител, меченных флуоресцентными метками: ViaBlue, FITC, PE, PECy7 и PerCy5 (eBioscience, *США*) на приборе «MACSQuantAnalyzer» (MiltenyiBiotec, Германия). Исследование уровня экспрессии гена *hTERT* проводили методом ПЦР. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и протоколы амплификации описаны ранее (Шуплецова В.В., 2015). Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20.

Результаты. В интактных культурах лимфоцитов здоровых доноров число клеток, несущих поверхностные молекулы CD28, CD25 и CD71 достоверно превышало аналогичные показатели в интактных культурах больных РА. Действие Ac/Exp на исследуемые $CD4^+CD45RO^+$ культуры сопровождалось увеличением числа $CD4^+$Т-клеток, экспрессирующих молекулы CD28, CD25, CD71 (по сравнению с интактными пробами), при этом уровень транскрипции мРНК гена *hTERT* в Т-клетках, косвенно характеризующий репликативный потенциал, оказался сниженным как в культурах здоровых доноров, так и у больных РА. Сочетанное действие Ac/Exp и Dex на исследуемую культуру лимфоцитов здоровых доноров приводило к дозозависимому снижению числа лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации CD25 ($r^2 = 0,675$, $p < 0,001$) и пролиферации CD71 ($r^2 = 0, 621$, $p < 0,001$); экспрессия корецептора CD28 и транскрипция мРНК гена *hTERT* снижались только при действии высоких концентраций ГК ($p < 0,05$).

Действие комбинации Ac/Exp + Dex на Т-клетки больных РА сопровождалось дозозависимым уменьшением числа $CD4^+CD28^+$Т-клеток ($r^2 = 0,700$, $p < 0,001$) и уровня транскрипции мРНК гена *hTERT* ($r^2 = 0,894$, $p < 0,05$); снижение содержания $CD4^+CD25^+/CD71^+$Т-клеток имело равномерный супрессивный характер и не зависело от действующей концентрации Dex.

Заключение. Таким образом, влияние Dex (в системе *in vitro*) на процессы активации и пролиферации TCR-стимулированных $CD4^+CD45RO^+$Т-клеток, полученных у здоровых доноров и больных РА, ассоциированные с экспрессией молекул – CD25, CD28 и CD71, имеет однонаправленный характер, но разную степень выраженности. Выявленное нами уменьшение числа $CD4^+CD45RO^+$Т-клеток, несущих мембранные молекулы коактивации (CD25 и CD28) и пролиферации (CD71) с одновременным подавлением экспрессии гена *hTERT* в $CD45RO^+$Т-лимфоцитах свидетельствует об угнетении репликативного потенциала этих клеток и их терминальной дифференцировке и созревании в эффекторные лимфоциты под действием синтетических ГК.

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ И КЛИНИЧЕСКИХ СИМПТОМОВ ОСТЕОАРТРИТА В СОЧЕТАНИИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Трифонова Е.П., Сазонова О.В., Зонова Е.В.

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия

Введение. Воспалительные процессы, происходящие при остеоартрите (ОА), связаны с изменениями профиля цитокинов в сыворотке крови, которые могут быть ассоциированы с параметрами тяжести течения данного заболевания. Известно, что сахарный диабет 2 типа (СД2) может способствовать поддержанию хронического воспаления и приводить к ускоренной прогрессии коморбидной патологии, в том числе ОА в сочетании с СД2.

Цель и задачи. Изучение уровня провоспалительных цитокинов и маркеров деградации внутриклеточного матрикса (ВКМ) хрящевой ткани в сыворотке крови, с последующей оценкой взаимосвязи с клиническими особенностями у пациентов с ОА коленных суставов в сочетании с СД2.

Материалы и методы. В исследовании приняло участие 98 человек с ОА коленных суставов, удовлетворяющим кри-

териям ACR (2000). У пятидесяти двух пациентов был верифицирован диагноз СД2, который был установлен за год и более до развития клинико-рентгенологических проявлений ОА. Группу пациентов с ОА и СД2 (n = 52) составили 10 мужчин и 42 женщины, средний возраст которых был 64±0,9 лет, длительность заболевания – 10,5±1,1 лет (ОА) и 5±0,5 лет (СД2). В группе сравнения обследованы больные с ОА без СД2 (n = 46) сопоставимые с основной группой по полу (7 мужчин и 39 женщин), возрасту (средний возраст 61±1,1) и длительности ОА (6,7±0,6 лет). Проведено определение уровня IL-6, IL-18, адипонектина, Acol2Ab, AGC в сыворотке крови с использованием ИФА. Функциональный статус и влияние ОА на уровень боли, общее состояние здоровья оценивались по шкалам KOOS,WOMAC Knee, VAS. Проведен анализ уровня депрессивных расстройств по индексу PHQ-9 и параметров качества жизни (КЖ) по шкале SF-36.

Результаты. При сравнении групп пациентов выявлены достоверные различия содержания в сыворотке крови IL-6 – p = 0,0006, IL-18 – p = 0,0012, Acol2Ab – p = 0,004, AGC – p = 0,005. В группе больных ОА и СД2 показана достоверная корреляционная взаимосвязь между сывороточным уровнем IL-6 и значениями болевого синдрома (VAS r = 0,3, p = 0,002), функционального статуса (KOOS ADL r = -0,2, p = 0,004; SF-PF r = -0,3, p = 0,01), параметрами КЖ (SF-VT r = -0,3, p = 0,01; SF-SF r = -0,2, p = 0,04), также между такими показателями как Acol2Ab и общим самочувствием по VAS (r = 0,5, p = 0,003). Среди пациентов с ОА, без СД2 найдены статистически значимые взаимосвязи между уровнем Acol2Ab в сыворотке крови и значениями болевого синдрома (SF-BP r = 0,5, p = 0,002) функционального статуса (WOMAC total r = -0,3, p = 0,004; KOOS sports r = 0,4, p = 0,002; SF-PH r = 0,5, p = 0,004) и параметрами качества жизни (SF-RP r = 0,4, p = 0,003). По другим изучаемым показателям в данных выборках статистически значимых взаимосвязей найдено не было.

Заключение. У больных ОА с СД2 и без выявлены достоверные различия уровня провоспалительных цитокинов и маркеров деградации ВКМ хрящевой ткани (IL-6, IL-18, Acol2Ab, AGC) в сыворотке крови. Тяжесть коморбидной патологии проявляется в выраженных функциональных нарушениях, ускоренной прогрессии, ухудшении КЖ, наличии деструктивных форм ОА, что подтерждается высоким уровнем данных иммунологических показателей.

ИММУНОФЕНОТИП В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ СЕРОНЕГАТИВНОМ ВАРИАНТЕ ТЕЧЕНИЯ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ ФОРМЫ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Харитонова М.В., Сизякина Л.П.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», Ростов-на-Дону, Россия

Ревматоидный артрит (РА) – аутоиммунное системное заболевание, проявляющееся различными формами и вариантами течения заболевания (Насонов Е.Л., 2012). РА с системными появлениями – это высокоактивная, генерализованная форма болезни с клиническими проявлениями, такими как нейропатия, перикардит, плеврит, васкулит, поражение глаз (Насонов Е.Л., 2013). Несмотря на значительный прогресс в понимании иммунопатогенеза РА с внесуставными проявлениями и участия в нем множества клеток иммунной системы, остается в настоящее время дискуссионным вопрос об участии В-лимфоцитов с разными иммунофенотипами и процессов костимуляторного взаимодействия Т и В-лимфоцитов в патогенезе данного заболевания. В связи с этим **целью** работы является изучение иммунофенотипа В-клеток и процессов межклеточной кооперации при системных проявлениях РА.

Материалы и методы. Обследовано 10 пациентов с серонегативным вариантом висцеральной формы РА, в стадии обострения, 2-3 степень активности. Контрольную группу составили 10 практически здоровых доноров в возрасте 30-40 лет.

Иммунофенотип В-лимфоцитов изучали по экспрессии следующих мембранных антигенов на данных клетках: $CD19^+CD45RA^+CD27^-CD45^+$, $CD19^+CD45RA^-CD27^+CD45^+$, $CD19^+CD23^+CD45$, $CD19^+CD25^+CD45^+$, $CD19^+$HLA DR^+CD45^+, $CD19^+CD40^+CD45$, $CD19^+CD95^+CD45^+$, в реакции непрямой иммунофлюоресценции, с учетом результатов на проточном лазерном цитофлуориметре. Уровень сывороточных иммуноглобулинов классов A,M,G оценивали в реакции радиальной иммунодифффузии в геле по Манчини. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) методом селективной преципитации в полиэтиленгликоле 6000 (ПЭГ). Для математической обработки полученных данных использовали программу Statistica 7.0. Достоверность различий в группах оценивали с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Вилкоксона. Достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Анализ относительного количества зрелых В-клеток, у пациентов с внесуставными проявлениями РА, по сравнению с группой контроля выявил статистически достоверное их увеличение $CD19^+CD3^-CD45^+$ (11,1±1,0 и 8,0±0,45% соответственно), однако при этом отмечается увеличение наивных В-лимфоцитов $CD19^+CD45RA^+CD27^-CD45^+$ (8,18±0,68 и 5,6±0,46%), тогда как В-клетки памяти $CD19^+CD45RA^-CD27^+$ $CD45^+$ не отличались от референтных значений. Отмечено увеличение экспрессии молекулы HLA DR (9,78±0,38 и 7,39±0,41%) на мембране $CD19^+CD3^-CD45^+$ клеток.

Анализ показателей межклеточной кооперации выявил, что у пациентов с внесуставными появлениями РА было выявлено статистически значимое увеличение экспрессии костимулирующей молекулы $CD19^+CD40^+CD45^+$ (9,59±0,65 и 7,02±0,42%) на В-лимфоцитах и CD40L лиганда на Т- хелперах $CD3^+CD4^+CD45^+$ (0,66±0,15 % и 0,29±0,05%). При изучении функциональной активности В-клеток выявлено усиление экспрессии маркеров ранней активации $CD19^+CD23^+CD45$ (2,72±0,18 и 0,91±0,14%), $CD19^+CD25^+CD45^+$ (0,31±0,01 и 0,05±0,01%), тогда как процессы элиминации активированных клеток характеризовались увеличением экспрессии рецептора $CD19^+CD95^+CD45^+$ готовности к апоптозу (0,66±0,12 и 0,33 ±0,03% соответственно).

В гуморальном звене иммунной системы наблюдается статистически достоверное повышение содержания сывороточных иммуноглобулинов классов трех классов IgA (1,99±0,1 и 1,13±0,01 г/л), IgM (1,5 ±0,07 и 1,07±0,02 г/л), IgG (11,29±0,24 и 10,35±0,26 соответственно), что свидетельствует об интенсификации синтеза иммуноглобулинов.

Таким образом, у пациентов с висцеральным вариантом течения серонегативного РА выявлено увеличение наивных В-клеток и клеток с иммунофенотипом зрелых В-лимфоцитов, усилением экспрессии на них маркеров ранней активации и готовности к апоптозу. Анализ интенсивности процессов межклеточной кооперации выявил повышение экспрессии костимулирующей молекулы CD40L на Т-хелперах и CD40 на В- клетках, что обеспечивает усиление передачи сигнала через образовавшийся комплекс, что обуславливает более агрессивный характер течения серонегативного РА с системными проявлениями.

ТАБЛИЦА. ДЕЙСТВИЕ ГИДРАЛАЗИНА, SAM И ГЕНИСТЕИНА НА ИНВАЗИЮ И МИГРАЦИЮ ФСК БОЛЬНЫХ РА *IN VITRO* (К ТЕЗИСАМ ШНАЙДЕР М.А. И ДР.)

Контроль		Миграция	P	Инвазия	P
		45,21 (4,63)		**38,34 (7,37)**	
SAMe	25 мкг	39,15 (1,84)	< 0,001	21,03 (4,2)	< 0,001
	100 мкг	38,79 (3,02)	< 0,001	23,72 (4,51)	< 0,001
Гидралазин	5 ммоль	38,88 (1,78)	< 0,001	21,7 (3,67)	< 0,001
	20 ммоль	38,8 (1,72)	< 0,001	22,34 (4,39)	< 0,001
Генистеин	5 мкг	37,58 (1,6)	< 0,001	16,88 (8,01)	< 0,001
	20 мкг	38,36 (1,7)	< 0,001	21,94 (6,42)	< 0,001

Примечание. Представлены средняя и стандартная ошибка средней процента мигрировавших клеток.

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА МИГРАЦИОННУЮ И ИНВАЗИВНУЮ СПОСОБНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИАЛЬНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ *IN VITRO*

Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Ширинский И.В., Калиновская Н.Ю.

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

Введение. Одним из ключевых свойств фибробластоподобных синовиальных клеток (ФСК) больных ревматоидным артритом (РА) является способность к миграции и инвазии. Предполагается, что стабильно активированный деструктивный фенотип ФСК при РА обусловлен эпигенетическими изменениями, включая изменения в метилировании ДНК. Следовательно, перспективной терапевтической стратегией в лечении РА может быть использование модуляторов метилирования ДНК. В настоящее время существует недостаток данных, оценивающих влияние известных природных и синтетических модуляторов метилирования ДНК на миграцию и инвазию ФСК больных РА. Мы выдвинули гипотезу, что противоположно направленные модуляторы метилирования ДНК могут либо увеличить, либо уменьшить миграционную и инвазивную способность ФСК больных РА.

Цель. Оценить влияние гиперметилирующих (S-Аденозил-L-метионина, генистеина) и гипометилирующих (гидралазина) агентов на миграционную и инвазивную способность ФСК больных РА *in vitro*.

Материалы и методы. ФСК были выделены из синовиальной ткани, полученной в ходе операции по замене сустава от 9 пациентов больных РА. Синовиоциты культивировали в присутствии хемоаттрактанта (5% эмбриональной телячьей сыворотки) и модуляторов метилирования ДНК: SAM (25, 100 мкг / мл), генистеина (5, 20 мкг / мл) или гидралазина (5, 20 ммоль / мл). Оценку миграционной и инвазивной способности проводили с использованием Transwell 96 – луночных планшетов (модифицированные камеры Бойдена).

Результаты. В таблице представлены данные о влиянии гидралазина, SAM и генистеина на показатели инвазии и миграции ФСК больных РА. Все исследуемые модуляторы метилирования ДНК статистически значимо уменьшали показатель инвазии клеток на 55%, а показатель миграции клеток на 15%. Дозозависимого эффекта не отмечено.

Заключение. Таким образом, SAMe, гидралазин и генистеин уменьшают миграционную и инвазивную способность ФСК больных РА, вне зависимости от их модуляционных свойств ДНК. Вероятным объяснением этих эффектов является плейотропное действие этих соединений.

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

ИММУНОЛОГИЯ ИНФЕКЦИЙ

ОЦЕНКА СИСТЕМЫ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ПРИ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Байбарина Е.В., Чепурнова Н.С., Невежкина Т.А., Бирко О.Н., Кныш С.В.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, Россия

Введение. Система металлопротеиназ (ММП) – это совокупность острофазных белков, вырабатываемых преимущественно индуцибельно (за исключением ММП-2) при физиологических и патологических процессах и состояниях. Представлены данные о регуляции экспрессии ММП цитокинами и факторами роста (Рогова Л.Н. и соавт., 2011). Однако отсутствует единое мнение о роли системы металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов (ТИМП) при герпетической инфекции.

Цель. Проанализировать уровень ММП-2, ММП-8, ММП-9 и их тканевых ингибиторов ТИМП-1, ТИМП-2 и ТИМП-3 при рецидивирующем герпесе разной степени тяжести.

Материалы и методы. Обследовано 79 пациенток с клиническими проявлениями рецидивирующей герпетической инфекции (основная группа): из них 29 чел. с легким течением; 27 чел. – с рецидивами средней тяжести и 23 чел. – с тяжелой герпетической инфекцией. Группой сравнения служили пациентки с латентной герпетической инфекцией (26 чел.) и здоровые женщины без клинико-лабораторных проявлений герпеса (20 чел.). Обследование пациенток основной группы проводили в период обострения инфекции (1-2 сутки). Металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы в сыворотке крови определяли методом сендвич-варианта ИФА с применением специфических реактивов R&D Diagnostic Inc. (США). Статистическую обработку результатов проводили параметрическими методами с использованием программы SPSS v.16.

Результаты. Выявлено увеличение ММП-2, ММП-8, ММП-9 и дефицит ТИМП-3 в сыворотке крови женщин при тяжелом течении герпетической инфекции. При герпетической инфекции средней степени тяжести ММП-2 была повышена у 40%, ММП-9 – у 70% обследованных, тогда как содержание ТИМП-1 и ТИМП-2 было снижено. При легкой степени тяжести герпетической инфекции определена относительная недостаточность ТИМП-1 и повышение ММП-9. Аналогичные изменения в системе протеиназ получены при латентной инфекции.

Заключение. Выявлены нарушения в системе металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов, сопровождающиеся тяжестью течения рецидивирующей герпетической инфекцией. Это подтверждает их роль в патогенезе заболевания. Установлены особенности в уровне и векторе изменений ММП-2, ММП-8, ММП-9 и их тканевых ингибиторов 1, 2 и 3 типов в зависимости от степени тяжести болезни, что позволяет разработать дополнительные диагностические критерии.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ С *H. PYLORI*-АССОЦИИРОВАННЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ЖЕЛУДКА И 12-ПЕРСТНОЙ КИШКИ

Гвоздев И.И.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

В ответ на повреждение штаммами *H. pylori* эпителия желудка развивается воспалительный процесс различной степени активности, низкая фагоцитарная активность не дает возможности полностью элиминировать микроорганизм.

Цель. Определение было определение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови у детей с *H. pylori*-ассоциированным поражением желудка и 12-перстной кишки

Объектами исследования служили нейтрофильные гранулоциты и моноциты крови, выделенные у 26 лиц с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки в возрасте от 11 до 18 лет и 25 практически здоровых лиц, у которых было исключено эрозивно-язвенное поражение желудка и 12-перстной кишки в аналогичном возрастном диапазоне. Исследование кислородозависимого фагоцитоза моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов крови в норме и при эрозивно-язвенных поражениях желудка и 12-перстной кишки проводили хемилюминесцентным методом.

Сравнительное изучение респираторной активности общей фракции нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови у больных с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки показало увеличение интенсивности в люминол-зависимом спонтанном и зимозан-индуцированном процессе, достоверно повышен у нейтофильных гранулоцитов, при этом площадь под кривой снижена относительно общей фракции моноцитов крови. Исследование люцигенин-зависимого процесса показало достоверное повышение активности общей популяции нейтрофильных гранулоцитов (интенсивность и площадь под кривой) как при спонтанной реакции, так и в зимозан-индуцированном процессе относительно моноцитов крови. При этом повышен индекс активации в нейтрофилах. Обнаружено, что в спонтанном процессе и при индукции «респираторного взрыва» активность НАДФН-оксидазы увеличивается в нейтро-

филах и снижается в моноцитах. Также в нейтрофилах увеличивается величина индекса активации в люцигенин-зависимой хемилюминесценции, которая характеризует уровень метаболических резервов для синтеза соответствующих активных форм кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 16-44-240668 и Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

ИММУННЫЙ СТАТУС, СИСТЕМА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, ФАКТОРЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У БОЛЬНЫХ С РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Гизингер О.А., Зиганшин О.Р., Шеметова М.А.

ФГОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия

Введение. До 26-28% пациентов страдают рецидивирующими формами герпесвирусной инфекции, у 30-33% из них инфекция протекает в субклинической и латентной формах. Окислительный стресс – важный патогенетический фактор заболеваний, вызванных герпесвирусами, поэтому в изучении механизмов формирования хронической инфекционной патологии, в том числе герпесвирусной инфекции важная роль отводится выраженности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состоянию антиоксидантной защиты организма.

Цель. Изучить состояние факторов врожденного иммунитета, процессы свободнорадикального окисления и состояния антиоксидантной системы при рецидивирующей герпесвирусной инфекции у женщин репродуктивного возраста.

Задачи. Изучить состояние функционально-метаболического статуса нейтрофильных гранулоцитов периферической крови женщин с генитальным герпесом, выявить особенности протекания свободнорадикальных процессов состояния антиоксидантной системы при рецидивирующей герпес-вирусной инфекции у женщин репродуктивного возраста.

Материалы и методы. проведено исследование 55 женщин с герпесвирусной инфекцией мочеполовой системы. Критериями включения в исследование являлись: наличие ВПГ-2, подтверждённое методом ПЦР, наличие в анамнезе герпетического поражения половых органов; клиническая картина рекуррентного герпеса половых органов в периоде продромы или обострения, при этом не более 48 часов от момента появления высыпаний, частота рецидивов от 6 до 8 в год, репродуктивный возраст, согласие пациенток на участие в исследовании. межрецидивный период – 2-3 мес. Исследование иммунного статуса включало подсчёт с помощью проточной цитометрии качественного и количественного состава лейкоцитов крови, их фагоцитарной активности, кислородзависимый метаболизм в НСТ-тесте, определение содержания IL-2 Состояние ПОЛ определяли по уровню малонового диальдегида (МДА) в плазме крови. Состояние антиоксидантной системы определяли по содержанию церулоплазмина в плазме крови и активности каталазы эритроцитов. Кровь больных обследовали в период обострения герпетической инфекции, угасания клинической симптоматики и ремиссии. Полученные данные обработаны с помощью компьютерных программ Microsoft и Excel Statistica с применением метода вариационной статистики

Результаты. Изучение функционально-метаболического статуса нейтрофилов по анализу показателей спонтанного НСТ-теста показало: у больных герпесвирусной инфекцией выявлено повышение значений НСТ-теста лейкоцитов в плазме крови. В период клинического улучшения общего состояния параллельно с положительной клинической динамикой наблюдалось снижение показателей НСТ-теста, активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов периферической крови, снижение концентрации интерлейкина-2. У пациентов с генитальным герпесом зарегистрировано повышение малонового диальдегида, что может служить показателем усиления процессов пероксидации липидов. Отмечено повышение концентрации церулоплазмина у всех обследуемых больных. При изучении активности внутриклеточного антиоксиданта каталазы эритроцитов у больных с герпесвирусными инфекциями отмечено ее достоверное повышение.

Заключение. При герпесвирусной инфекции обнаружено усиление процессов свободнорадикального окисления липидов, повышение функциональной активности нейтрофилов, нарушению концентрации интерлейкина-2, дисбалансу антиоксидантной системы крови.

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ИМУННОМ ОТВЕТЕ ПРИ ГРИППЕ У ДЕТЕЙ

Головачёва Е.Г., Афанасьева В.С., Осидак Л.В., Афанасьева О.И.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Известно, что при гриппе при адекватном иммунном ответе в основном происходит активация Тх1-типа иммунного ответа (ИО), что соответствует заболеванию средней степени тяжести и способствует более быстрому выздоровлению. Однако одним из факторов тяжелого течения гриппа может стать активация Тх2-типа иммунного ответа.

Цель. Изучить особенности цитокинового профиля у детей при гриппе в зависимости от типа иммунного ответа с оценкой его влияния на характер течения заболевания для обоснования терапии препаратами интерферона и его индукторами.

Материалы и методы. В течение нескольких эпидсезонов обследовано 1230 пациентов в возрасте от 1 до 17 лет с верификацией вируса гриппа методами ПЦР и ИФЛ в соскобах из носовых ходов. Также были обследованы 97 здоровых детей. У пациентов в сыворотке крови (метод ИФА, наборы ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) при поступлении и в период реконвалесценции определяли содержание общего IgE и цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8, IL-1ra, а IFNγ, IL-4 и IL-10 еще на 3-й день заболевания. Тип иммунного ответа определяли по предложенным авторами (2014 г.) коэффициентам поляризации (КП), полученными при расчете КП1 = IL-4/IFNγ и КП2 = IL-10/IFNγ.

Результаты и обсуждение. Показано, что у детей при гриппе средней тяжести в сыворотке крови содержание цитокинов IL-1β, IL-4, IL-10 было повышено на фоне снижения IFNγ. При величине КП1 и КП2 меньше 2 определялся Тх1-тип ИО в 64% случаев, от 2 до 3 – смешанный Тх1/Тх2-тип в 13,4% случаев, а при КП больше 3 – Тх2-тип в 22,6% случаев. Выявлено, что у детей младшего возраста до 6 лет при гриппе с более выраженной интоксикацией, а также при развитии бронхолегочных

осложнений в 57,5% случаев определялся Тх2-тип ИО на фоне повышения содержания общего IgE в сыворотке крови. У пациентов с Тх2-типом ИО при наличии фоновой аллергопатологии, особенно у детей младшего возраста, при умеренном повышении изученных цитокинов в 34% случаев развивался синдром крупа или вирусиндуцированной бронхообструкции. В 87% случаев при увеличении КП1 и КП2 более чем в 3-4 раза на 3-й день заболевания по сравнению с первым исследованием синдромы как крупа, так и бронхообструкции после купирования могли развиться повторно на 5-6 день, что позволяет использовать данные показатели для прогнозирования рецидива при гриппе. При Тх2-типе ИО было отмечено повышение содержания IL-1β ≥ 70 пг/мл и его рецепторного антагониста IL-1ra ≥ 300 пг/мл при уровне у здоровых детей 15,8±2,4 и 132,3±13,7 пг/мл соответственно. При развитии синдромов обструкции и/или бактериальных осложнений отмечалось статистически значимое увеличение содержания цитокинов IL-6 и IL-8 по сравнению с Тх1-типом ИО независимо от возраста. У детей, получавших с первых дней заболевания гриппом препараты рекомбинантного интерферона α2β (Генферон Лайт и Гриппферон капли в нос) и индуктор интерферона (Кагоцел с 3-х лет) показана хорошая клиническая эффективность, а также значимое снижение содержания IL-4, IL-10, IL-6, IL-8 на фоне незначительного роста содержания IFNγ и рецепторного антагониста IL-1ra.

Выводы. Полученные данные более быстрого восстановления дисбаланса цитокинового профиля у пациентов, получавших изученные препараты, свидетельствовали о преимущественной активации клеточного Тх1 типа ИО и завершении воспалительных реакций за счет противовирусного и иммуномодулирующего действия интерферонов. Клинически это соответствовало более быстрому выздоровлению с уменьшением риска развития синдромов обструкции и бактериальных осложнений, что позволяет рекомендовать раннее применение препаратов интерферона и индуктора интерферона для коррекции типа иммунного ответа при гриппе у детей.

СЕПТИЧЕСКИЙ ШОК: ДВЕ СТРАТЕГИИ ЦИТОКИНОВОГО ОТВЕТА

Зотова Н.В.[1, 2], Гусев Е.Ю.[1, 2]

[1] Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия
[2] ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Вот уже четверть века патогенез сепсиса рассматривается с позиции системной воспалительной реакции (СВР) и «цитокинового шторма». Это предопределяет учет фазности продукции провоспалительных (например, IL-6, IL-8, TNFα) и антивоспалительных цитокинов (например, IL-10). Концепция компартментализации предполагает «мозаичность» продукции цитокинов и других медиаторов воспаления во времени и пространстве организма. Такую мозаичность мы рассматриваем в зависимости от критических стадий клеточного стресса, а именно: гиперэргической (стратегия резистентности на действие повреждающего фактора) и депрессивной (стратегия толерантности). Обе стадии характеризуются дисфункцией клеток микрососудов и развитием микроциркуляторных расстройств, но вторая фаза, кроме того, и неспособностью генерировать как провоспалительный, так и антивоспалительный цитокиновый ответ. С наибольшей очевидностью эти закономерности проявляются при развитии септического шока (СШ).

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ ЗОТОВОЙ Н.В. И ДР.)

Медиаторы	ТПСШ	ОСШ
IL-6	**410,06±1376,55**	**4168, 86±5289,08**
	75,10/59,60÷99,00	**2583,50/ 341,00÷4074,00**
IL-8	**140,46±157,23**	**698,57±690,14**
	65,90/48,10÷185,00	**493,00/ 149,00÷999,00**
IL-10	**11,25±10,35**	**116,51±95,40**
	7,80/4,90÷11,90	**93,20/ 47,60÷176,00**
TNFα	17,99±7,01	258,28±616,42
	17,80/15,50÷20,00	**45,50/ 26,00÷141,00**
СРБ	206,23±205,68	253,43±164,39
	111,00/85,00÷251,00	282,50/ 108,00÷340,00

Примечание. В верхних строках по каждому медиатору указаны M±σ, в нижних – Me/25%-75% процентили. Жирным наклонным шрифтом выделены показатели, по которым группы отличаются статистически значимо: непараметрический метод по Манну–Уитни для сравнения медиан (U-тест, $p < 0,005$) и параметрический t-тест для сравнения средних ($p < 0,05$).

Цель. Выявить отличительные особенности цитокинового ответа при двух вариантах септического шока – остром и подостром/затяжном его течении.

Методы. Концентрацию цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, TNFα) и С-реактивного белка, в плазме крови определяли иммунохемилюминесцентным методом с использованием системы Immulite (Siemens Medical Solutions Diagnostics, USA). В группе доноров крови (контроль, средний возраст (M±σ) – 34,1±10,4, n = 50) концентрации интерлейкинов и СРБ не превышали нормальных значений (IL-6, IL-10 < 5 пг/мл; IL-8 < 10 пг/мл, СРБ < 10 мг/л), TNFα > 8 пг/мл в 2% случаев. Группы обследованных в работе пациентов: острый септический шок (ОСШ), 1-2-е сут. от момента госпитализации, наличие гипотензии, не купируемой вазопрессорами, n = 14, возраст – 54,9±16,4 года, 28-суточная летальность – 71,43%; третичный перитонит, затяжное и подострое течение септического процесса – более 14 сут. от момента госпитализации, СШ (ТПСШ), n = 17, средний возраст – 50,2±5,6 года, летальность – 94,12%. Статистический анализ проводили с применением программы Statistica 6,0 (Stat Soft, Inc., USA).

Результаты. В обеих группах пациентов с СШ определяли превышение уровня всех исследуемых медиаторов в сотни и тысячи раз от уровня контроля (табл.). Уровень цитокинемии при ОСШ многократно и значимо выше, чем при ТПОШ, при этом кратность различий снижается в ряду: IL-6 > IL-10 > IL-8 > TNFα. Отличия по показателю острофазного ответа (СРБ) – не достоверны. Установлены корреляционные связи (r-Спирмана ≥ 0,5, $p < 0.05$) уровня IL-10 со всеми цитокинами в группе ОСШ (3 связи), в группе ТПСШ – только с уровнями IL-6 и СРБ (2 связи).

Заключение. Септический шок при затяжном и подостром течении сепсиса в сравнении с ОСШ характеризуется сравнимо высокой летальностью пациентов, существенно меньшим уровнем цитокинемии как в отношении провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, TNFα), так и антивос-

палительного цитокина (IL-10), при снижении корреляционных связей между IL-10 с другими цитокинами. В этом случае, патогенез критического состояния можно характеризовать с позиции возрастания роли депрессивной фазы системного клеточного стресса: преобладание стратегии толерантности над стратегией резистентности клеточного ответа на действие системных повреждающих факторов. При этом СШ при подостром и затяжном течении сепсиса отличается крайней степенью критичности состояния пациентов (летальные исходы у 16 из 17 пациентов). Считаем, что стадийность патогенетических изменений при СШ нецелесообразно рассматривать с позиции иммуносупрессии как фазоспецифичного феномена. При описании патогенеза СШ шока корректней применять термин «дисфункция иммунной системы», которая определяется, в том числе, и эффектами поликлональной активации лимфоцитов. В свою очередь, несостоятельность антимикробной защиты организма при СШ определяется не только состоянием лимфоидной ткани, но и нарушением микроциркуляции, барьерных и гомеостатических функций многих органных систем, связанных с развитием системного провоспалительного клеточного стресса в ответ на системный характер действия повреждающих факторов.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В19 ПРИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Зыкова Т.А., Шевякова Е.А., Лысенко И.Б., Кузнецов С.А.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Парвовирусная инфекция В19 (ПВИ) является одним из серьезнейших факторов риска возникновения осложнений для лиц со злокачественными гематологическими заболеваниями: инфицирование данным возбудителем зачастую происходит при гемотрансфузиях и при терапии препаратами иммуноглобулинов, вызывая в итоге тяжелые анемии, панцитопении и апластические кризы. В литературе активно обсуждается необходимость мониторинга таких пациентов на наличие острой формы ПВИ, однако на территории РФ сведения о ее распространенности в онкогематологии на данный момент весьма разрозненны и малочисленны.

Цель. Определение уровня серопревалентности к парвовирусу В19 (ПВ В19) и частоты проявления острых форм ПВИ среди онкогематологических больных, проходивших стационарное лечение и обследование в ФГБУ «РНИОИ» Министерства здравоохранения РФ в 2016-2017 гг.

Материалы и методы. Определяли уровень IgM и IgG к ПВ В19 в сыворотках крови методом твердофазного ИФА. Образцы цельной крови, а также пунктаты костного мозга 21 человека из данной выборки были дополнительно тестированы на наличие ДНК ПВ В19 методом ПЦР в режиме реального времени. Всего в исследование были включены 70 человек.

Результаты. Их общего числа больных 50 было с лимфомами, 15 с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), 5 с множественной миеломой (ММ). Детей было 17, средний возраст 9 лет, взрослых – 53, средний возраст 50 лет. Уровень серопозитивности по ПВ В19 среди онкогематологических больных составил 66%, максимальным он оказался в группе больных ММ – 80%, при лимфомах он составил 76%, и при различных формах лейкозов – лишь 27%. При этом уровень IgG в целом колебался в пределах 24,9-443,1 Ед/мл, составив в среднем 167,7 Ед/мл. Уровень инфицированности различался по возрастам: среди детей он составил 29%, взрослых – 75%.

О наличии острой формы заболевания (реактивации или первичного инфицирования) судили по присутствию у пациента IgM к ПВ В19 и/или ДНК возбудителя. Данные маркеры были выявлены у 26% больных (56,2 Ед/мл), во всех случаях – на фоне наличия IgG, что свидетельствует о процессах реактивации, а не первичной инфекции. При этом у 21% обследованных была обнаружена ДНК ПВ В19, а IgM были выявлены лишь у 6%, из чего следует необходимость не только серологического, но и ПЦР-анализа при мониторинге онкогематологических больных. У детей маркеры острой ПВИ обнаружены не были, у взрослых они наблюдались в 34% случаев. Из 21 больного, обследованного на наличие ДНК ПВ В19 параллельно в крови и в пункциях костного мозга, в абсолютном большинстве случаев возбудитель выявлялся в пунктатах (67%), тогда как в крови – лишь в 5% случаев; одновременно в крови и в костном мозге – также у 5%. Это свидетельствует о необходимости исследования всех возможных видов биологического материала. Необходимо отметить, что наибольшая частота выявления маркеров острого заболевания наблюдалась у пациентов с лимфомами (36%), при ММ – у 20% больных, при лейкозах IgM и/или ДНК ПВ В19 в данном исследовании обнаружены не были.

Заключение. Был определен уровень серопревалантности к ПВ В19 среди онкогематологических больных: в среднем он составил 66%, у детей 29%, у взрослых 75%. Маркеры острого заболевания чаще наблюдались при лимфомах (36%). Были получены данные, демонстрирующие необходимость мониторинга больных с гемобластозами как серологическими, так и молекулярно-биологическими методами, причем не только в крови, но и в костном мозге для своевременного выявления острых форм ПВИ.

ОСОБЕННОСТИ МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ КОКСИЕЛЛЕЗА

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

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

Развитие очагов воспаления в паренхиматозных органах и аллергическая перестройка организма являются особенностью патогенеза коксиеллеза. Изменения миграционной активности лейкоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с экстрактами органов позволяют выявить тканевую аутосенсибилизацию.

Цель. Изучить особенности миграционной активности лейкоцитов при различных формах коксиеллеза.

Задачи: исследовать органную гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) по динамике миграционной активности лейкоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов с печеночным и легочным экстрактами при коксиеллезе в зависимости от формы заболевания.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 326 пациентов со среднетяжелым течением коксиеллеза в возрасте от 18 до 72 лет. Средний возраст больных соста-

вил 40,9±0,7 лет. Диагноз коксиеллеза был подтвержден иммуноферментным анализом (Coxiella burnetii Elisa IgG, IgM, Vircell, Испания) и полимеразной цепной реакцией («АмплиСенс Coxiella burnetii-FL» ФБУН «ЦНИИЭ», Россия). Все больные получали комплексную терапию, включающую этиотропное (доксициклин в первый день по 0,2 г, затем по 0,1 г однократно в течение 8,0±0,1 дней), патогенетическое и симптоматическое лечение. Обследование больных проводилось в динамике заболевания: в период разгара и в период ранней реконвалесценции. Для изучения особенностей формирования органной ГЗТ у больных коксиеллезом проводили РТМЛ с печеночным экстрактом (ПЭ) и легочным экстрактом (ЛЭ) по методу I. Clausen в агаровой среде (1971). Контроль – 100 здоровых лиц. Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программ Microsoft Exel и BioStat. Определяли среднюю арифметическую (M), стандартную ошибку средней арифметической (m) – формат (M±m), процентное выражение ряда данных (%).

Результаты. Как показали наши исследования, у здоровых лиц индексы миграции (ИМ) составили в РТМЛ с ПЭ 93,5±0,1%, а в РТМЛ с ЛЭ 93,5±1,1%. Больные поступали в стационар на 6,2±0,2 день болезни. У 288 пациентов регистрировалась острая форма коксиеллеза, а у 38 больных отмечалась подострая (затяжная) форма заболевания. Возраст пациентов с подострой формой коксиеллеза в 1,2 раза превышал возраст больных с острой формой (47,1±1,8 лет против 39,9±0,8 лет, $p < 0,001$). У больных с подострой формой коксиеллеза чаще, чем у пациентов с острой формой, выявлялись гепатомегалия (68,4±7,5% против 47,6± ,9% случаев, $p < 0,05$), желтуха (44,7±8,1% против 17,9±2,3% случаев, $p < 0,01$) и снижение аппетита (71,0±7,4% против 38,5±2,3% случаев, $p < 0,001$). Было выявлено, что в разгар болезни изменение миграционной активности лейкоцитов наблюдалось у всех больных с подострой формой коксиеллеза и у большинства больных с острой формой болезни. Причем у пациентов с подострой формой коксиеллеза в 1,3 раза чаще, чем у больных с острой формой, происходили изменения миграционной активности лейкоцитов в РТМЛ с ПЭ (100% против 78,3±4,2%, $p < 0,001$). При этом у больных с подострой формой ИМ при торможении миграции лейкоцитов оказался в 1,3 раза ниже, чем у пациентов с острой формой болезни (43,3±3,9% против 56,1±2,8%, $p < 0,05$). Оказалось, что в разгар болезни у пациентов с острой формой болезни изменение миграционной активности лейкоцитов в РТМЛ с ЛЭ развивалось в 1,2 раза реже, чем у больных с подострой формой коксиеллеза (100% против 82,0±4,2%, $p < 0,001$). В разгар болезни у больных с подострой формой коксиеллеза уровень ИМ при ускорении миграции лейкоцитов оказался в 1,5 раза выше, чем у пациентов с острой формой болезни (227,5±4,8% против 156,0±2,3%, $p < 0,01$). В период ранней реконвалесценции изменение миграционной активности лейкоцитов отмечалось у большинства пациентов в РТМЛ с ПЭ и с ЛЭ. В этот период болезни различия в частоте выявления этих изменений и величине ИМ в зависимости от формы коксиеллеза выявлены не были.

Заключение. Таким образом, у больных подострой формой коксиеллеза в разгар болезни наблюдаются более выраженные, чем у пациентов при острой форме болезни, реакции гиперчувствительности замедленного типа. Это позволяет предположить, что аллергический компонент играет определенную роль при формировании затяжного течения коксиеллеза.

СПЕЦИФИКА ФАГОЦИТОЗА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ β-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА (*STAPHYLOCOCCUS AUREUS, KLEBSIELLA PNEUMONIAE, PSEUDOMONAS AERUGINOSA*)

Коленчукова О.А.[1, 2], Сарматова Н.И.[2]

[1] Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия
[2] Институт биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета Министерства образования и науки РФ, Красноярск, Россия

Исследование посвящено изучению фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов при воздействии антибиотикорезистентных штаммов бактерий *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae,* относящихся к β-лактамазам расширенного спектра (БЛРС).

Объектами исследования служили нейтрофильные гранулоциты крови, выделенные у 25 практически здоровых людей в возрасте от 25 до 45 лет, и устойчивые и чувствительные штаммы *P. aeruginosa и K. pneumoniae*; штаммы *S.aureus* устойчивые к действию оксациллина (метициллина) (MRSA). В качестве контроля использовались штаммы *P. aeruginosa, S. aureus, K. pneumoniae* чувствительные к действию антибиотиков в аналогичной концентрации. Функции фагоцитоза оценивали с помощью FITC меченых бактериями в концентрации 10^6 КОЕ/мл. Анализ проводили в цельной периферической крови на проточном цитофлюориметре FC-500 с использованием метода прямой иммунофлюоресценции моноклональными антителами, меченными CD14-PE/CD45-PC7/CD16-PC5 (Beckman Coulter, USA).

Анализируя результаты исследования, можно отметить различия, полученные при индукции нейтрофильных гранулоцитов устойчивыми и чувствительными штаммами БЛРС. Так, в ответ на MRSA процент нейтрофилов, вступивших в фагоцитоз и среднее число бактерий, находящихся внутриклеточно, увеличивается относительно чувствительных штаммов. В ответ на резистентные штаммы *K. pneumoniae* происходит снижение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов. Различия в фагоцитарном ответе могут быть связаны с особенностями строения и жизнедеятельности бактерий. Бактерия *P. aeruginosa* относится к патогенной микрофлоре, в норме не заселяющей слизистые оболочки макроорганизма. В связи с чем при воздействии резистентными и чувствительными штаммами синегнойной палочки не получено существенных различий в фагоцитарном ответе. Таким образом, в результате приобретения резистентности к антибиотикам изменяется рецепторный аппарат бактерий вследствие модификации клеточной стенки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 16-44-240668 и Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОАДЕНОПАТИЯХ У ДЕТЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Мирсаяпова И.А., Хайруллина Р.М., Хаматдинова З.Р., Мавзютов А.Р.

ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Уфа, Россия
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия

Одно из ведущих мест в структуре обращаемости к врачу педиатру-иммунологу в Республиканской детской клинической больнице г. Уфы занимают доброкачественные лимфоаденопатии. По данным авторов, изучавших патологию лимфоузлов в Республике Башкортостан, установлена доминирующая роль ЦМВ-инфекции у детей, выявлены маркеры дисбаланса клеточного и гуморального звеньев системы иммунитета с формированием вторичного иммунодефицита у взрослых пациентов (Терегулова Л.М., 2006).

Цель. Установить особенности иммунологической реактивности у детей при лифаденитах, ассоциированных с ЦМВ-инфекцией.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели были изучены показатели гуморального и клеточного иммунитета 37 детей: в первую группу вошли 19 детей в возрасте от 1-11 лет, находившихся на стационарном лечении в РДКБ г. Уфы с диагнозом «серозный подчелюстной лимфаденит, ассоциированный ЦМВ инфекцией», во вторую – 12 детей в возрасте от 1-11 лет, находившихся на стационарном лечении с диагнозом «серозный подчелюстной лимфаденит, бактериальной этиологии» и в третью – 6 практически здоровых детей, не имеющих в анамнезе лимфоаденопатии и ЦМВИ. Для определения популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов проводили иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител фирмы BectonDickinson, методом проточной цитометрии (BDFACSConton). Гуморальная система иммунитета оценивалась по содержанию иммуноглобулинов классов A, M, G и уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови. Для обнаружения специфических антител класса IgG и IgM к ЦМВ проводился иммунохемилюминесцентный анализ (ИХА), а также ПЦР-исследование крови и мазка из зева. Клинико – лабораторное обследование включало также определение лейкоцитограммы, бактериологическое исследование мазка из зева и носа на флору, также уровня антистрептолизина – О в сыворотке крови. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0. Для сравнения данных использовали параметрический критерий Стьюдента.

Результаты. По данным лейкограммы у детей с подчелюстным лимфаденитом, ассоциированным с ЦМВИ, по сравнению со второй и третьей группами отмечался лимфоцитоз (62,26±2,79, $p \le 0,05$) и моноцитоз (11,67±1,23, $p \le 0,05$). По результатам бактериологического обследования бактериальная инфекция была детектирована только у второй группы пациентов. Уровень А-стрептолизина–О находился в пределах референсных значений у первой группы пациентов, тогда как во второй группе этот показатель был статистически значимо выше (337,08±44,62, $p \le 0,05$) по сравнению с первой и третьей группами. По данным иммунологического обследования уровни сывороточных иммуноглобулинов класса A, M, G первой группы достоверно не отличались от показателей здоровых детей и детей с проявлениями серозного подчелюстного лимфаденита, бактериальной этиологии. По данным иммунофенотипирования лимфоцитов методом проточной цитометрии в первой группе детей отмечалась Т-клеточная недостаточность в виде: снижения общих Т-лифоцитов ($CD3^+$) (58,89±3,23) и статистически значимого подавления цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$) (18,95±2,75,$p < 0,05$) и Т-лимфоцитов – хелперов ($CD4^+$) (30,2±2,13$p \le 0,05$) на фоне повышения естественных киллерных клеток ($CD16^+$) (14,15±1,84, $p > 0,05$). Причем выраженная Т-хелперная недостаточность (26,2±2,41) была установлена у 8 детей первой группы, которых по данным ПЦР была обнаружена ДНК ЦМВ в крови. Следует отметить, что уровень В-лимфоцитов ($CD19^+$) находился на нижней границе референсных значений (10,15±1,84). Во второй группе детей было выявлено повышение общих Т-лимфоцитов (67,96±1,65, $p \le 0,05$), Т-хелперов (48,89±1,37, $p \le 0,05$) и В-лимфоцитоза (22,5±1,23, $p \le 0,05$) в сравнении с третьей группой обследуемых.

Заключение. Таким образом, у детей с ЦМВ-ассоциированными лимфоаденопатиями установлен избирательный дефицит Т-клеточного звена иммунитета: общие Т-лимфоциты ($CD3^+$), цитотоксические Т-лимфоциты ($CD8^+$) и Т-хелперы-индукторы ($CD4^+$), что в целом согласуется с концепцией прямого избирательного действия ЦМВ на эти клетки. Кроме того, депрессия Т-лимфоцитов – хелперов может служить фоном, на котором происходит инфицирование. Выявлены различия степени выраженности Т-клеточной недостаточности в зависимости от наличия вирусемии по данным ПЦР-исследования в виде значительного подавления Т-хелперной активности клеток. Результаты предварительного этапа исследований, по нашему мнению, являются неоспоримым доказательством целесообразности проведения комплексного диагностического тестирования, включающего определение специфических антител к ЦМВ и ПЦР. Кроме того, для оценки эффективности противовирусной терапии необходимо осуществление иммунологического мониторинга, а именно проточной цитометрии.

УРОВЕНЬ IL-8, IL-13 У ЖЕНЩИН С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Невежкина Т.А., Кныш С.В., Чагина Е.А.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, Россия

Введение. Папилломавирусная инфекция (ПВИ) является одним из самых распространенных заболеваний, передающимся половым путем (Роик Е.Е., Баранов А.Н., 2015). ПВИ способствует не только развитию рака шейки матки, но и существенно влияет на репродуктивную функцию женщины. Состояние иммунной системы является решающим фактором, определяющим тяжесть и продолжительность воспалительных заболеваний, особенностей течения «медленных» вирусных инфекций, в том числе и ПВИ (Барановская Е.А., Кустова М.А., 2012). При ПВИ наблюдается снижение клеточного иммунитета, а так же дефицит местного и общего интерферона. Присутствие цитокинов играет важную роль и в

модулировании иммунного ответа к инфекциям, и в установлении и подержании беременности.

Цель и задачи. Оценить уровень IL-8 и IL-13 у женщин с ранними клиническими проявлениями ПВИ.

Материалы и методы. Определение уровня IL-8 и IL-13 в сыворотке крови методом ИФА (R&D Systems, USA) у 32 пациенток с ПВИ, в возрасте от 25 до 44 лет. Пациентки разделены на группы: I – пациентки, с кондиломатозными поражениями шейки матки; II – с цервицитом без кондиломатозных изменений шейки матки; III – контрольная группа здоровых женщин. Статистический анализ проводился с помощью ранжирования вариационного ряда методом Турки. Результаты выражали в пг/мл.

Результаты. Определено повышение уровня IL-13 в сыворотке крови в I и II группе по сравнению с группой контроля в 7 раз (IL-13 в I группе – 73,17 [49,3; 76,2] пг/мл; во II группе – 76,28 [73,17; 90,82] пг/мл, в сравнении с группой контроля – 9,14 [2,0; 13,24] пг/мл). Уровень IL-8 в I группе – 4,2 (1,67; 14,27) пг/мл; во II группе – 21,93 (14,27; 23,19) пг/мл; в сравнении с группой контроля – 3,23 (2,8; 8,41) пг/мл. Не выявлено существенных изменений уровня IL-8 в I группе. Это свидетельствует об отсутствии активации нейтрофилов у этой категории пациенток. Однако повышение IL-8 во II группе свидетельствует о прогрессировании воспалительного процесса с активацией нейтрофилов, которые вырабатывают провоспалительные медиаторы. Последние играют двоякую роль: локальной защиты шейки матки, но при гиперпродукции способны повреждать ткани и усиливать воспаление. Для подтверждения данных требуется провести дополнительные исследования.

Заключение. Увеличение содержания в сыворотке крови противовоспалительного цитокина IL-13 свидетельствует о преобладании Th2-типа иммунного ответа при ПВИ. Не установлено изменения уровня IL-8 в группе с кондиломатозом шейки матки. Определено увеличение IL-8 в крови пациенток с ПВИ цервицитом, что отражает активацию нейтрофилов у этой категории больных.

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ БОЛЬНЫХ ЛЕПТОСПИРОЗОМ

Петрова О.А.[1, 2], Любимова Н.Е.[1], Арсентьева Н.А.[1], Стоянова Н.А.[1], Токаревич Н.К.[1], Тотолян Арег А.[1, 2]

[1]ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лептоспироз является одной из наиболее широко распространённых и социально значимых зооантропонозных инфекций. Возбудителями являются бактерии рода лептоспир (*Leptospira*). В настоящее время идентифицировано более 250 сероваринтов патогенных лептоспир.

В ряде случаев лептоспироз у человека протекает в лёгкой форме, сопровождаясь неспецифическими симптомами, однако у 10-15% больных развивается тяжёлая форма, которая часто быстро прогрессирует и может привести к летальному исходу. Летальность в случае развития тяжёлых форм лептоспироза достигает 20%, а в случае развития лёгочного геморрагического синдрома превышает 50%. Предполагается, что тяжесть и исход заболевания зависит от вида продуцируемых цитокинов и от их концентрации.

Цель. Изучение роли про- и противовоспалительных цитокинов для углубления знаний об иммунопатогенезе лептоспирозов.

Материалы и методы. Объектом исследования послужили сыворотки крови от больных лептоспирозом (n = 147). В качестве контрольной группы – сыворотки от практически здоровых лиц. Для экспериментальной части работы был взят штамм из коллекции лаборатории зооантропонозных инфекций НИИ Пастера – *Leptospirainterrogans*. Данным штаммом проводилась 24 часовая стимуляция цельной крови здорового донора с дальнейшим отбором супернатантов. Определение цитокинов в биоматериалах (сыворотки и супернатанты) проводилось на анализаторе MagPix (Millipore, США) с использованием стандартной панели из 9 аналитов: TNFα, MCP-1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1ra, IL-12(p70), IFNγ. Математическую обработку данных осуществляли с применением программы GraphPadPrizm6 (GraphPadSoftware, США).

Результаты. При изучении цитокинов *in vivo* в группе больных лептоспирозом по сравнению с контрольной группой выявлены достоверно повышенные уровни IL-8, IL-10, MCP-1, TNFα ($p < 0,05$). Выявлены корреляционные связи между TNFα и MCP-1, TNFα и IL-1rα ($r = 0,51$; $r = 0,49$ соответственно), такие же связи были обнаружены и в группе контроля (но более сильные: $r = 0,69$ для обоих случаев). Выявлена корреляционная связь между IL-12(p70) и IFNγ ($r = 0,55$) в опытной группе нехарактерная для группы контроля. Установлено, что увеличение уровня провоспалительных цитокинов к 3 неделе болезни на фоне низких концентраций противовоспалительных цитокинов играет важную роль в развитии поздних осложнений при лептоспирозе.

В части *in vitro* впервые было показано, что пик стимуляции для большинства цитокинов приходится на 2-3 час стимуляции (IFNγ, IL-12p(70), IL-1ra, IL-4 (причём для двух последних цитокинов после достижения пика, продукция цитокинов выходит на плато). Непохожую на остальные цитокины динамику дали IL-8 и TNFα, которые имеют пики стимуляции приходящиеся на 6 ч.

Выводы. Необходимо проводить новые, обширные исследования о взаимодействии цитокинов и их роли в иммунопатогенезе лептоспирозов.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ

Полушина Л.Г., Светлакова Е.А., Мандра Ю.В. Базарный В.В.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

В настоящее время болезни пародонта имеют широкую распространенность, отличаются тяжелым течением, негативным влиянием на здоровье человека и качество его жизни. Несмотря на определенные достижения в разработке методов профилактики и лечения данного заболевания, еще существует проблема в поиске объективных

способов диагностики пародонтита, оценки активности процесса и прогноза прогрессирования заболевания.

Цель. Выявить клинико-иммунологические особенности больных хроническим пародонтитом.

Материалы и методы. Работа основана на исследовании 101 человек, которые на основе ретроспективного анализа были распределены на две группы. Основная группа – 69 больных с пародонтитом средней и тяжелой степени. Клиническое обследование на ряду со стандартным стоматологическим осмотром включало дополнительные методы: подсчет индекса интенсивности кариеса зубов (КПУ), определение значения упрощенного индекса гигиены (OHS) и папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса (PMA). Контрольная группа – 32 практически здоровых добровольцев.

Содержание в ротовой жидкости (РЖ) интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4) интерлейкина-17 (IL-17) и лактоферрина (Лф) определяли методом твердофазного гетерогенного ИФА с использованием тест систем «Вектор-Бест» и регистрацией на фотометре Multiscan.

Статистическая обработка результатов проводилась на основании принципов вариационной статистики с использованием программы Gretl. Переменные с непараметрическим распределением сравнивались при помощи критерия Манна–Уитни. Для оценки диагностической эффективности лабораторных тестов проводили ROC-анализ.

Результаты и обсуждение. Объективными клиническими показателями состояния полости рта являются стоматологические индексы. Их значительное повышение указывает на поражение тканей полости рта, особенно – индекс PMA, отражающий тяжесть поражения пародонта.

У больных пародонтитом концентрация IL-2 в РЖ повышалась на 31,1% ($p = 0,05$). У этих же пациентов наблюдалось значительно возрастание уровня IL-4 в 26 раз ($p = 0,001$) в сравнении с контрольной группой. Это дает основание предположить, что цитокиновый баланс при пародонтите характеризуется преобладанием Th-2 продуцируемых факторов, то есть при пародонтите активируются «противовоспалительные» иммуноопосредованные механизмы. Концентрация IL-17 у пациентов обеих групп существенно не различалась.

Среди параметров врожденного иммунитета оценивали содержание ЛФ, которое возрастало при пародонтите как отражение активности воспалительного процесса.

Для оценки диагностических характеристик изучаемых показателей использован ROC анализ с определением площади под ROC кривой (AUC – Area Under Curve). Он позволил установить, что наиболее высокую диагностическую эффективность имеет уровень IL-4 в РЖ при пародонтите: диагностическая чувствительность – 88%, диагностическая специфичность – 99%, AUC = 0,95.

В ходе исследования нами разработаны новые подходы к традиционному цитологическому исследованию буккального эпителия. Подсчет цитограммы показал, что у пациентов с пародонтитом значительно чаще выявляются кариологические аномалии (микроядра, пикноз и др.), что позволило оценить реактивность слизистой оболочки полости рта при воспалительном процессе.

Заключение. На основании результатов данного исследования мы пришли к заключению, что определение иммунологических показателей в РЖ (в частности IL-4 и Лф), а также микроядерный тест с буккальным эпителием могут рассматриваться в качестве дополнительного инструмента лабораторной диагностики воспалительных заболеваний полости рта, в частности пародонтита. Поэтому сегодня вполне обосновано включение обсуждаемых показателей в алгоритмы диагностики заболеваний полости рта в комплексе с другими методами.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВАКЦИН ИММУНОВАК ВП-4 И СТАФИЛОВАК

Серова Т.А.[1], Краснопрошина Л.И.[1], Феофанова Т.В.[2], Бишева И.В.[1], Фошина Е.П.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
[2] ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия

В течение последних десятилетий наблюдается значительный рост рецидивирующих инфекционно-воспалительных заболеваний, сопровождающихся нарушениями у больных как системного, так и местного иммунитета. Такие пациенты нуждаются в проведении иммуномодулирующей терапии, и наиболее перспективными для этой цели являются терапевтические бактериальные вакцины. Первыми отечественными препаратами такого рода являются Иммуновак ВП-4, содержащий компоненты 4-х условно-патогенных микроорганизмов (для взрослого контингента применяются две схемы введения: инъекционное и назально-оральное), и моновакцина Стафиловак.

Цель. Выявление особенностей динамики иммунологических показателей при трех различных способах иммунотерапии: инъекционном и назально-оральном применении Иммуновак ВП-4 и инъекционном применении вакцины Стафиловак.

Материалы и методы. Больные в возрасте 18-50 лет с хроническими воспалительными заболеваниями кожи и ЛОР-органов были распределены в три группы: первая (1) – 11 чел. – получала Иммуновак ВП-4 назально-орально, вторая (2) – 9 чел. – инъекционно, и третья (3) – 8 чел. – получала инъекционно вакцину Стафиловак. До и через 0,5-1,5 месяца после последнего приема препарата у больных определяли параметры системного иммунитета (субпопуляционный состав лимфоцитов и общие иммуноглобулины) и уровень специфических антител к антигенам *S. aureus* и *Kl. pneumoniae* разных изотипов в сыворотке крови, слюне и назальном секрете методом твердофазного ИФА. Для сравнения показателей в трех группах до и после лечения использовали критерий множественного сравнения – медианный тест с уровнем статистической значимости $p_{МТ} < 0,05$. Для оценки однородности групп по полу применяли критерий χ^2 Пирсона с уровнем статистической значимости $p_{ХИ} < 0,05$. Для парного сравнения использовали критерий Манн–Уитни с поправкой Бонферрони ($p_{MU\text{-}B} < 0,0167$). Значение величины p для поправки Бонферрони было найдено по формуле $p_{MU\text{-}B} = p_{MU}/k$, где k – число сравнений между группами (в нашем случае $k = 3$), а $p_{MU} = 0,05$. Результаты расчетов представлены медианой (Me) и размахом (min-max).

Результаты. Группы были однородны по полу ($p_{ХИ} = 0,25$) и возрасту ($p_{МТ} = 0,14$), исследуемые показа-

тели в трёх группах до лечения не различались ($p_{МТ} > 0,05$). После проведенного лечения между тремя группами были выявлены статистически значимые различия по четырем показателям: 1) уровню специфических антител А-изотипа в сыворотке к стафилококку ($p_{МТ} = 0,0336$) и 2) к клебсиелле ($p_{МТ} = 0,0374$), 3) уровню специфических антител А-изотипа к стафилококку в слюне ($p_{МТ} = 0,0357$) и 4) относительному значению NK-клеток $CD16^+$ фенотипа ($p_{МТ} = 0,0281$). Для этих четырёх показателей дополнительно провели парные сравнения по критерию Манн–Уитни с поправкой Бонферрони. Статистически значимые различия по показателю 1 после проведенного лечения ($p_{MU-B} = 0,0123$) были выявлены между группой 1 [Me = 809,5 (448,0-3650,0)] и 2 [Me = 4147,0 (959,0-15344,0)]; между группой 1 и 3 [Me = 3200,0 (624,0-4907,0)] имелась только тенденция к отличию ($p_{MU-B} = 0,0205$). По показателю 2 значимо ($p_{MU-B} = 0,0066$) отличались только группа 1 [Me = 70,5 (5,0-141,0)] и 2 [Me = 277,0 (112,0-1523,0)], а по показателю 3 имелась только тенденция к отличию ($p_{MU-B} = 0,0276$) между группами 1 [Me = 26,0 (2,0-251,0)] и 3 [Me = 73,0 (66,0-400,0)]. Значение показателя 4 в группе 3 [Me = 18,0 (15,0-32,0)] имело тенденцию к отличию от такового в группе 1 [Me = 10,0 (7,0-25,0)] с $p_{MU-B} = 0,0396$ и 2 [Me = 12,0 (4,0-21,0)] с $p_{MU-B} = 0,0497$.

Заключение. Применение критерия множественного сравнения для анализа результатов динамического исследования в трех группах дало возможность обнаружить на малых выборках наиболее сильные эффекты воздействия на показатели иммунного статуса при использовании трех различных методов иммунотерапии бактериальными вакцинами.

ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛЕКТИВНОГО ИММУНИТЕТА К ПАНДЕМИЧЕСКИМ ВИРУСАМ ГРИППА A(H1N1)pdm СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Сычев И.А.[1], Смолоногина Т.А.[1], Лернер А.А.[1], Кучинская М.М.[1], Краббе Н.В.[1], Дешева Ю.А.[1, 2]

[1] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБОУВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Пандемия гриппа 2009 г., вызванная вирусом A(H1N1)pdm, дала стимул к исследованиям перекрестно-реагирующих антител к нейраминидазе (NA) подтипа N1. Антитела, направленные против основного антигена вируса гриппа – гемагглютинина (HA) – являются вируснейтрализующими, однако не защищают от инфекции при появлении в циркуляции вирусов с новым подтипом HA. В этом случае наличие у части людей перекрестно-реагирующих анти-NA антител, приобретенных вследствие контактов с ранее циркулирующими вирусами гриппа, может стать решающим в снижении заболеваемости и смертности. В связи с этим в настоящее время целый ряд исследований посвящен изучению формирования и защитной функции антител к NA при инфекции вирусами гриппа и иммунизации гриппозными вакцинами.

Цель. Оценка коллективного иммунитета к HA и NA вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и его дрейфового варианта в течение эпидемического сезона 2015-2016 гг. среди пациентов МНЦ ФГБНУ «ИЭМ». Для этого потребовалась разработка нового диагностического вируса гриппа, содержащего NA вируса гриппа A/Южная Африка/3626/2013(H1N1).

Материалы и методы. В исследовании изучались сыворотки крови 134 пациентов МНЦ ФГБНУ «ИЭМ» в возрасте от 24 до 84 лет, собранные в январе-марте 2016 г. согласно протоколу Локального Этического комитета при ФГБНУ «ИЭМ» № 2/16 от 12 мая 2016 г. Для определения антител к NA в твердофазной реакции ингибирования нейраминидазной активности (РИНА) (Смолоногина Т.А. и соавт., 2011) использовались следующие реассортантные вирусы гриппа: A(H7N1), содержащий NA вируса A/Калифорния/07/2009(H1N1) pdm [H1N1pdm] и A(H6N1), содержащий NA вируса A/Южная Африка/3626/2013(H1N1). Вирусы H1N1pdm, A/Южная Африка/3626/2013(H1N1) и A/Новая Каледония/20/1999(H1N1) использовали в качестве антигенов в реакции торможения агглютинации (РТГА).

Результаты. Выявлено статистически значимое повышение средних титров антигемагглютинирующих антител к пандемическим вирусам гриппа среди лиц, перенесших ОРЗ в текущем эпидемическом сезоне, по сравнению с лицами, не имеющими ОРЗ в анамнезе ($P < 0,05$). В группе пациентов 24-45 лет доли лиц с защитными уровнями антигемагглютинирующих антител (≥ 1:40) к вирусу A(H1N1)pdm и эпидемическому вирусу A/Новая Каледония/20/1999(H1N1), вышедшему из циркуляции в 2009 г., были значительно выше по сравнению с лицами старшего возраста (табл.). Это может свидетельствовать о наиболее частом инфицировании указанными вирусами в данной возрастной группе. Среди участников молодого и среднего возраста доля лиц с защитными титрами антител к HA дрейфового варианта A/Южная Африка/3626/13(H1N1) была выше по сравнению со участ-

ТАБЛИЦА. УРОВНИ КОЛЛЕКТИВНОГО ИММУНИТЕТА К ПОВЕРХНОСТНЫМ АНТИГЕНАМ ВИРУСОВ ГРИППА A(H1N1) СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ, ОБСЛЕДОВАННЫХ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2015-2016 гг. (К ТЕЗИСАМ СЫЧЕВА И.А.И ДР.)

Возраст	Число в группе	% лиц с титрами антител ≥ 1:40				
		Антитела к HA (РТГА)			Антитела к NA (РИНА)	
		ЮАР/2013	H1N1pdm	Новая Каледония/1999	ЮАР/2013	H1N1pdm
24-45	24	8,3[a]	16,7	33,3[b,c]	0	17,7[d]
46-64	48	6,3	10,4	2,1[b]	2,8	8,3[e]
65-84	62	3,2[a]	6,5	4,8[c]	3,2	50,0[d,e]

Примечание. [a] – P = 0,049; [b] – P = 0,045; [c] – P = 0,001; [d] – P = 0,01; [e] – P < 0,001.

никами 65-84 лет, что также может указывать на более частое инфицирование. В то же время в группе до 45 лет не выявлено защитных уровней анти-NA антител к вирусу A/Южная Африка/3626/13(H1N1). Наивысшая доля лиц с защитными титрами антител к NA вируса H1N1pdm (50%) выявлена среди лиц старше 65 лет, в то время как титры антител ≥ 1:40 к HA пандемических вирусов среди этой возрастной группы встречались значительно реже в сравнении с лицами 24-45 лет. Эти данные свидетельствуют, что высокий уровень коллективного иммунитета к NA вируса H1N1pdm среди участников старше 65 лет не связан с перенесенными инфекциями пандемическими вирусами 2009 года, а опосредован перекрестно-реагирующими антителами, приобретенными, возможно, вследствие предшествующих контактов с циркулирующими до 1957 г. эпидемическими вирусами A(H1N1).

Заключение. Данные серологического обследования показали, что дрейфовый вариант вируса пандемического гриппа, подобный A/Южная Африка/3626/13(H1N1), циркулировал в 2015-2016 гг. на территории Санкт-Петербурга. Уровни коллективного иммунитета к HA дрейфового варианта H1N1pdm среди лиц разного возраста свидетельствует, что наиболее часто инфицированию могли подвергаться лица молодого и среднего возраста. Низкий уровень коллективного иммунитета к NA дрейфового варианта пандемического штамма может свидетельствовать о повышенной уязвимости лиц молодого и среднего возраста перед этим вирусом и указывать на необходимость проведения вакцинации.

ОЦЕНКА Т-КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА В ФОРМИРОВАНИИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Федорова И.М., Устинова М.А., Комбарова С.Ю., Котелева С.В., Капустин И.В., Рамазанова З.К., Скирда Т.А., Мартыненко И.Г.

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

В России профилактика менингококкового менингита предполагает вакцинацию групп риска прежде всего против менингококков серогрупп A и C. В состав отечественных или зарубежных вакцин входят полисахариды *N. meningitidis,* иммунный ответ на которые может реализоваться как Т-независимый. Однако поскольку достигнутый иммунный ответ не отличается значительной длительностью, возрастает интерес к конъюгированным вакцинам, вызывающим более выраженный Т-клеточный иммунный ответ.

Цель. Отработка оптимальной процедуры оценки специфического клеточного иммунитета на А-полисахарид (АП) *N. meningitidis* (дозы антигена для активации лимфоцитов, сроков взятия крови у привитых) для последующего мониторинга формирования клеточного иммунитета у лиц, привитых полисахаридной или конъюгированной менингококковой вакцинами.

Методом антигенной стимуляции выделенных из крови лимфоцитов было их культивирование (37 °C, 5% CO_2) в присутствии АП, источником которого служила менингококковая группы А полисахаридная вакцина (производство НПО «Микроген», Россия). К 2×10^5 лимфоцитов добавляли 100 мкл раствора АП, с концентрацией от 5 до 25 мкг/мл. Стимуляция клеток длилась 20 часов, после чего культуральные супернатанты отбирали для определения в них концентрации IFNγ, а в пуле лимфоцитов методом проточной цитометрии выявляли Т-клетки, экспрессирующие маркер ранней активации CD69. Повышение количества таких клеток, как и повышение продукции ими IFNγ, является признаком антигенной активации Т-лимфоцитов. Показатели уровня антигенной стимуляции лимфоцитов сопоставляли с титром антител к *N. meningitidis*, который оценивали методом РНГА.

Результаты. Определение оптимальной дозы для стимуляции проводили на основе сравнения реакции на АП лимфоцитов непривитых людей и лимфоцитов лиц, привитых за 1-2 года до настоящего исследования вакциной Менцевакс ACWY (GlaxoSmithKline Biologicals, Бельгия).

Исследование исходного фона привитых и непривитых показало следующее. В группе из 16 привитых активация лимфоцитов 25 мкг/мл АП вызывала увеличение количества $CD4^+CD69^+$Т-клеток у 38% и $CD8^+CD69^+$Т-клеток – у 88%, дозой 10 мкг/мл АП, – соответственно, у 25 и у 30%, дозой 5 мкг/мл АП – у 0 и у 21%. В группе из 8 непривитых стимуляция лимфоцитов АП была отмечена только у 2 человек, в сыворотке которых уже исходно определялись антитела к *N. meningitidis* в титре 1:20. Концентрация АП 10 мкг/мл была признана оптимальной и в дальнейшем использовалась для оценки поствакцинальной динамики Т-клеточного иммунитета.

Через 1 месяц после введения Менцевакс у 71% обследованных отмечалось 4-кратное и более увеличение титров антител к АП. В таблице можно видеть, что при этом в группе ревакцинированных становится в 1,5-2 раза больше лиц, Т-лимфоциты которых активируются в присутствии 10 мкг/мл АП. В группе первично привитых от менингококковой инфекции те или иные

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ ФЕДОРОВОЙ И.М. И ДР.)

Признаки наличия в крови антигенспецифических Т-клеток, первично привитых		% людей с наличием признака среди	
		ревакцинированных	
Повышение при стимуляции АП количества клеток с фенотипом	$CD3^+CD4^+CD69^+$	88	46
	$CD3^+CD4^+CD69^+$	100	69
Повышение продукции IFNγ лимфоцитами при их стимуляции АП		88	62

Заключение. Отработанный метод может служить для оценки клеточного иммунитета к менингококковому полисахариду.

признаки наличия в крови антигенспецифических Т-клеток начинали выявляться у всех людей.

ИНТЕРЛЕЙКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ И КОНЦЕНТРАЦИЯ НИТРАТ-НИТРИТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ПАРОДОНТАЛЬНЫХ КАРМАНАХ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ

Хараева З.Ф., Молова Л.Б.

ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик, КБР, Россия

Введение. Иммунологические сдвиги при пародонтите характеризуются нарушениями во взаимодействии факторов неспецифической резистентности организма, угнетением клеточного и гуморального иммунитета, а также подавлением относительно автономной системы местного иммунитета с дисбалансом показателей цитокинов. Оценка состояния больного пародонтитом в современных условиях предполагает комплексное обследование, включающее в себя помимо традиционных клинических методов, микробиологические и иммунологические исследования, которые позволяют объективизировать состояние больного пародонтитом, прогнозировать течение болезни и анализировать эффективность лечебных мероприятий.

Цель. Изучить показатели IL-1β, IL-6, IL-10 и концентрацию нитрат-нитритов в сыворотке крови и содержимом пародонтальных карманов пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением находились 45 пациентов 38-60 лет с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести. Лечение включало обучение гигиене, проведение профессиональной гигиены (удаление над- и поддесневых зубных отложений, полирование поверхности зубов). В зависимости от глубины пародонтальных карманов проводили соответствующее хирургическое лечение (кюретаж, открытый кюретаж). Предоперационная подготовка больных пародонтитом включала лечение зубов и замену некачественных пломб. Местное медикаментозное противовоспалительное лечение включало обильное промывание пародонтальных карманов 0,06% раствором хлоргексидина биглюконата. В послеоперационном периоде назначали нестероидные противовоспалительные препараты, десенсибилизирующую, антибактериальную терапию. Местно применяли раствор хлоргексидина для полоскания. Повторное обследование проводили в динамике – на 7,14,45 сутки с момента начала терапии.

В качестве биоматериала использовали содержимое пародонтальных карманов (ПК) и периферическую кровь. В сыворотке крови и содержимом пародонтальных карманов исследовали IL-1β, IL-6, IL-10 (тест-системы BenderMedsystem, USA) концентрацию нитрат-нитритов (реактив Гриса). В качестве группы контроля исследовали 25 доноров (Республиканская станция переливания крови, МЗ КБР). Статистическую обработку проводили с использованием пакета программы Statistica for Windows. Достоверным считали отличие при $p < 0,05$.

Результаты. До начала терапии уровень IL-1β в сыворотке крови у больных ХГП превышал таковой у доноров на 70,6%, а в содержимом пародонтальных карманов на 78,4%. Уровень IL-6 в сыворотке крови у больных на 67,7% был выше, чем в группе здоровых доноров, а в содержимом пародонтальных карманов на 68,4%. На фоне традиционной терапии уровни медиаторов снижались ($p < 0,05$). Спустя 45 суток после терапии концентрации IL-1β в крови больных ХГП уменьшились на 50% по сравнению с исходными значениями,в содержимом пародонтальных кармановна 48,6%. Уровень IL-6 на 41,9 % в плазме крови, а в содержимом пародонтальных карманов на 36,8%. На фоне проводимой стандартной терапии происходит постепенное увеличение концентрации IL-10. На 45 сутки уровень IL-10 в пародонтальных карманах, несмотря на положительную динамику, остается ниже показателей здоровых доноров в течение всего периода исследования.

Уровень нитрат-нитритов в сыворотке крови и пародонтальных карманах до начала терапии выше показателей здоровых на 35,6 и 89,6% соответственно. На фоне проводимой терапии показатели крови имеют положительную динамику, но остаются на 45 сутки от начал терапии достоверно выше показателей здоровых ($p < 0,05$).

Заключение. Традиционная терапия пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом не приводит к нормализации показателей иммуноцитокинов и нитрат-нитритов, что доказывает необходимость инновационных подходов в терапии пациентов данной категории. Исследованные показатели могут быть использованы в качестве критериев для оценки эффективности проводимой терапии больных с поражением пародонта разной степени тяжести.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РЕОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Шапошников А.В.[1], Зыкова Т.А.[1], Шевякова Е.А.[1], Колпаков С.А.[2]

[1]ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия
[2]ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. В последние десятилетия отмечается возрастающая роль вирусов в инфекционной патологии человека. К числу вирусов, способных одновременно поражать органы дыхания, ЖКТ, головной мозг, лимфоидную и сердечно-сосудистую системы, помимо прочих относятся и реовирусы.

Цель. Изучить распространенность, клиническую значимость и возможность серологической диагностики реовирусной инфекции.

Материалы и методы. Исследовали сыворотки крови детей до 14 лет и взрослых. Для определения вирусспецифических антител (АТ) использовали диагностикум эритроцитарный реовирусный иммуноглобулиновый жидкий для реакции торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА). Было исследовано 169 одиночных и 121 парная сыворотка крови от детей, 469 одиночных и 170 парных сывороток от взрослых.

Результаты. Антитела к реовирусам имели 48,7% здоровых детей и 60,6% взрослых. Средняя геометрическая титра АТ у детей составила 6,0 $\log_2$, у взрослых – 5,4 $\log_2$.

При исследовании парных сывороток диагностическое (в 4 раза и более) нарастание титра АТ у детей наблюдалось в 10,8% случаев, у взрослых – в 13,5% случаев. В 69,5% случаев реовирусная инфекция регистрировалась на фоне отсутствия АТ в начале заболевания, в т.ч. у детей – в 65,5%, у взрослых – в 73,9%. Диагностическое нарастание титра АТ у детей в 92,3% случаев регистрировалось при установленном клиническом диагнозе грипп,

ОРВИ, в 7,7% – менингит. У взрослых диагнозы грипп, ОРВИ составили 52,2%, лихорадка неясного генеза – 21,6%, корь – 13,1%, пневмония, бронхит – 8,7%, менингит – 4,4%.

При однократном исследовании сывороток крови детей с диагнозами длительная лихорадка неясной этиологии, пневмония, бронхит, менингит уровень серопозитивных был ниже, чем среди здоровых детей (34,3%), а средняя геометрическая титра АТ не отличалась (6,1 $\log_2$). В группе однократно обследованных взрослых больных АТ к реовирусам в РТНГА имели 53,1%, а средняя геометрическая титра АТ составила 5,9 $\log_2$.

Среди пациентов с различной патологией печени количество иммунных к реовирусу было таким же, как в соответствующих возрастных группах здоровых (48,2% у детей и 62,8% у взрослых). В то же время средняя геометрическая титра АТ у детей с патологией печени была на порядок выше (6,9 $\log_2$), чем у здоровых (5,9 $\log_2$). У взрослых с патологией печени явных отличий не наблюдалось. Средняя геометрическая титра АТ у этих больных составила 5,9 $\log_2$ против 5,4 $\log_2$ у здоровых. В особую группу были выделены взрослые со ЗНО гепатобилиарной системы. Количество серопозитивных среди них составило 51,7%, а средняя геометрическая титра АТ 6,5 $\log_2$.

Заключение. Установлено широкое распространение реовирусной инфекции, число серопозитивных среди здоровых детей составило 45,7%, взрослых – 60,6%. Учитывая это, для серологической диагностики реовирусной инфекции необходимо использовать метод парных сывороток. Подтверждение этиологической значимости реовируса чаще было отмечено при клиническом диагнозе грипп, ОРВИ. В случаях однократного исследования сывороток крови наиболее высокий показатель средней геометрической титра антител отмечен в группе детей до 14 лет с патологией печени – 6,9 $\log_2$ и взрослых с онкопатологией – 6,5 $\log_2$.

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

ИММУНОЛОГИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРЛОЗОНА У ПАЦИЕНТОВ С МЛУ/ШЛУ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Беляева Е.Н., Старшинова А.А., Маничева О.А., Догонадзе М.З., Зубрий О.Н., Соловьева Н.С., Сапожникова Н.В., Вишневский Б.И.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
СПб ГБУЗ «Городская туберкулезная больница № 2», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Рост числа случаев заболевания туберкулёза с МЛУ/ШЛУ возбудителя требует персонифицированного подхода к его терапии. Туберкулостатическая проба или бактериостатическая активность крови (ТСП/БАК) – это оценка *ex vivo* активности комплекса вводимых пациенту препаратов (на пике их концентрации в крови) в отношении выделяемого пациентом штамма МБТ (аутоштамма). Ранее было показано, что высокие значения ТСП/БАК (полученные пробирочным методом) соотносятся с клиническими параметрами эффективного лечения.

Цель и задачи. Определить эффективность перхлозона в отношении выделяемого пациентом штамма МБТ. Разработка объективного приборного способа регистрации результатов ТСП для лабораторного обоснования персонифицированной химиотерапии у пациентов с МЛУ/ШЛУ и ее коррекции.

Материалы и методы. На базе СПб НИИФ и ГБУЗ «ГТБ № 2» в 2016 г было обследовано 20 пациентов с МЛУ/ШЛУ МБТ. Мужчины – 55,0% (11), женщины – 45,0% (9). Возраст 26-45 лет 65,0% (13); от 18-25 лет 25,0% (5); 46-60 лет 10,0% (2). Структура клинических форм: фиброзно-кавернозный 70,0% (14); инфильтративный у 20,0% (4), диссеминированный в 10,0% (2). Пробирочный метод определения ТСП/БАК перевели в формат метода микроразведений в 96-луночном планшете FLUOstarOptima. Кровь собирали на пике концентраций каждого из вводимых препаратов, подбор проводили в соответствии со спектром устойчивости аутоштамма, через неделю к терапии добавляли перхлозон и повторно проводили ТСП. Результат регистрировали визуально и в ридере, определяя точку задержки роста графически после статобработки с помощью программы MS Excel.

Результаты. На фоне проводимого лечения с включением перхлозона абациллирование к 2-м месяцам лечения наступило у 25,0 (5)%; к 4 месяцам у 50,0% (10,0); к 6-ти месяцам у 60,5% (12), к 8 – месяцам у 66,0 (13)% пациентов. Закрытие полости распада к 4 месяцам у 5,0% (1); к 6-ти месяцам – у 10,0% (2), к 8 – месяцам у 15,0% (3). В 40,0% (8) случаев имеющиеся деструктивные изменения уменьшились в размерах в 2 раза, также отмечена значительная динамика рассасывания инфильтративных изменений в легочной ткани. Визуальная и графическая оценка ТСП отличались, отмечали расхождения параметров как в большую, так и в меньшую стороны. Равные или большие 5 значения ТСП, которые по полученным ранее данным соотносятся с клиническими показателями эффективности лечения, были зарегистрированы с помощью флуоресцентного ридера в 36,8+21,3% случаев, добавление перхлозона выявило тенденцию к увеличению этого показателя до 56,3+23,9%, при визуальной оценке теста – соответственно, 53,3+24,9% и 60,0+24,4 %. У 11 из 16 пациентов (68,7%) выявлена потенцирующая активность перхлозона, который усиливал действие противотуберкулезных препаратов в 2-64 раза, при визуальной оценке – у 46,7%. В среднем величина ТСП до и после введения перхлозона составила 4,4+0,9 и 6,4+1,4 ($p = 0,001$), при визуальной оценке – соответственно, 5,2+1,4 и 6,0+1,4 ($p = 0,324$).

Заключение. Препарат перхлозон обладает способностью у 68,7% пациентов с МЛУ/ШЛУ туберкулезом усиливать действие противотуберкулезных препаратов в 2-64 раза. Использование планшетного флуоресцентного ридера для регистрации интенсивности роста МБТ с помощью индикатора роста резазурина, позволяет избежать субъективности при проведении теста ТСП визуальным пробирочным или планшетным способом, объективно оценить *ex vivo*: активность комплекса вводимых препаратов, необходимость усиления химиотерапии.

ПОПУЛЯЦИЯ γδТ-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Бердюгина О.В., Ершова А.В.

ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

Введение. Изучение γδТ-клеток началось сравнительно недавно, их роль в иммунных процессах остается до конца не выясненной, однако многие исследователи отводят этим клеткам весьма существенную роль в обеспечении резистентности организма к микроорганизмам, в частности, к *M. tuberculosis*. Это обусловлено тем, что клетки имеют Т-клеточный рецептор, представленный гамма- и дельта-цепями, распознающий микробный фосфолипидный антиген (3-формил-1-бутил пирофосфат), расположенный на *M. tuberculosis*, в результате чего клетки могут напрямую связываться с патогеном. **Целью** данного исследования стало изучение популяции γδТ-клеток периферической крови при разных формах туберкулеза легких.

Материалы и методы. Исследованы иммунологические показатели крови больных, имевших один из трех вариантов туберкулезного воспалительного процесса: туберкулез легких с формированием ограничения специфического процесса – туберкулемы (31 человек, из них: 16 пациентов с туберкулемой в активной фазе, 15 больных – в фазе стихающей и умеренной активности), инфильтративный туберкулез легких (44 человека, из них: 29 обследованных с распространенностью процесса в пределах 1-3 сегментов доли легкого, 15 пациентов с распространенностью процесса более 3 сегментов, возбудитель имел множественную лекарственную устойчивость – МЛУ), фиброзно-кавернозный туберкулез легких (24 больных, возбудитель имел МЛУ), контрольная группа (25 практически здоровых людей). Больные инфильтративным туберкулезом распространенностью процесса 1-3 сегмента легкого были представлены 12 пациентами, у которых туберкулез был вызван лекарственночувствительными *M. tuberculosis* и 17 больными, у которых туберкулез вызван *M. tuberculosis* с МЛУ. Все обследованные не имели клинико-лабораторных данных наличия вирусных гепатитов В, С и ВИЧ 1, 2 типа. Исследования выполнены методом проточной цитофлюориметрии на приборе COULTER Epics XL (Beckman Coulter, USA), с использованием реагентов того же производителя. Определены количество Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+$) и γδТ-лимфоцитов ($CD3^{bright}CD4^-$). Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программ Microsoft Office Excel 2007» и «Statistica for Windows v. 6.1.

Результаты. Установлено, что в изученных группах пациентов изменения в количестве этих клеток были различны и весьма существенны. Разброс значений был очень большим даже в контрольной группе и составлял от 0,008 до $0{,}203 \times 10^9$/литр (0,4-9,4%). При отграниченных формах туберкулеза (туберкулемы) абсолютное количество этих клеток увеличивалось почти в полтора раза (на 45,5%), относительное – на 36,4%. При двух других формах заболевания этот показатель заметно снижался: абсолютное число клеток в обеих группах снижалось более чем в 1,5 раза, относительное – на 27,3% при инфильтративном туберкулезе и на 39,4% при фиброзно-кавернозном туберкулезе в сравнении с группой здоровых лиц. Установлено также, что абсолютное количество этих клеток при туберкулемах в 2,3 раза превышало этот показатель при инфильтративном туберкулезе и в 2,5 раза – при фиброзно-кавернозном туберкулезе. У больных с лекарственночувствительным возбудителем снижение было наименьшим и составляло 18,2% в сравнении с контрольной группой. Наличие возбудителя с МЛУ сопровождалось понижением числа γδТ-клеток в 1,9 раза в сравнении с группой здоровых добровольцев. Также выявлено, что туберкулез 1-3 сегментов легкого сопровождался снижением числа клеток на 57,1%, а 4 и более сегментов – уже на 69,2%. Изучение количества клеток у больных с туберкулемами в разных фазах активности показало следующее. При активных туберкулемах количество этих клеток незначительно снижалось – на 12,1% – в сравнении с контрольными показателями. В подгруппе больных с туберкулемами в фазе стихающей активности число γδТ-клеток возрастало: в 2 раза в сравнении с группой доноров и в 2,3 раза в сравнении с подгруппой больных, имеющими туберкулемы в активной фазе.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить, что: во-первых, γδТ-клетки играют существенную роль в развитии туберкулезного процесса, их повышенное количество способствует усилению сопротивляемости организма пациента инфекции и отграничению туберкулезного процесса, а недостаточное количество – содействует активации патологического процесса; во-вторых, при противостоянии лекарственночувствительным *M. tuberculosis* небольшое снижение количества γδТ-клеток не является критичным, а значимое понижение числа этих клеток у больного является одним из прогностических критериев заболевания его туберкулезом, вызванным возбудителем с МЛУ; в-третьих, появление γδТ-клеток снижает вероятность развития распространенного (с поражением 4 и более сегментов легкого) патологического процесса.

РАЗРАБОТКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ АКТИВНОСТИ ТУБЕРКУЛЕМЫ

Бердюгина О.В., Ершова А.В.

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

Введение. Известны сложности определения фазы активности туберкулемы на этапе ее предполагаемой резекции. Лабораторные показатели периферической крови, отражающие реакцию иммунной системы на динамику туберкулезного процесса, являются перспективным инструментом для решения этой задачи. **Целью** исследования стало изучение иммунологических показателей периферической крови у больных с туберкулемами в активной фазе и фазе стихающей и умеренной активности для определения иммунологических критериев оценки активности туберкулемы.

Материалы и методы. Выполнено однократное исследование лабораторных показателей периферической крови, отражающих состояние основных звеньев иммунной системы 92 человек обоего пола в возрасте от 18 до 55 лет. Три группы обследованы: контрольная – 25 практически здоровых людей, опытная – 31 больной туберкулезом легких с формированием ограничения специфического процесса – туберкулемы, тестовая, для проверки статистических гипотез – 36 человек, сопоставимая с контрольной и опытной по полу и возрасту. Все тестируемые не имели клинико-лабораторных признаков наличия вирусных гепатитов В, С и ВИЧ 1 и 2 типа. Больные с туберкулемами были дифференцированы на две подгруппы в зависимости от фазы активности процесса: с туберкулемой в активной фазе (1 подгруппа, 16 человек), с туберкулемой в фазе стихающей и умеренной активности (2 подгруппа, 15 человек). Поглотительные и функционально-метаболические особенности фагоцитов оценивали методом проточной цитофлюориметрии на приборе COULTER Epics XL (Beckman Coulter, USA), использовали наборы Phagotest и Bursttest (Glycotope Biotechnology, Germany). На фагоцитах определяли экспрессию маркеров CD11b, CD11c, HLA-DR. Выполняли подсчет количества Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+$), В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+$) и NK-клеток ($CD45^+CD3^-CD16^+56^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD8^+$), γδТ-лимфоцитов ($CD3^{bright}CD4^-$), NKT-клеток ($CD3^+CD16^+56^+$), Т-регуляторных клеток ($CD3^+CD4^+CD127^-CD25^+$), клеток, экспрессирующих CD25, HLA-DR и $CD95^+$. Концентрацию IL-1β, IL-2, IL-4, IFNγ, TNFα, MIF определяли методом твердофазного ИФА (реагенты eBioscience, Austria и RayBiotech Inc., USA). Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 и Statistica for Windows v. 6.1.

Результаты. Изучение показало, что особенности иммунологических реакций при активных туберкулемах связаны со снижением фагоцитарной и функционально-метаболической активности моноцитов ($p < 0,05$), повышением экспрессии на них CD11b и HLA-DR ($p < 0,05$), увеличением количества гранулоцитов с усилением их фагоцитарной активности, повышением экспрессии CD11b и CD11c ($p < 0,05$). Клеточный иммунитет у больных с активной туберкулемой характеризовался увеличением популяции лимфоцитов в периферической крови ($p < 0,05$), повышением экспрессии CD25 и HLA-DR на Т-лимфоцитах, CD95 – на Т-хелперах, снижением числа NK-, γδТ-клеток. Т-лимфоцитов. Активность туберкулемы сопряжена с увеличением количества NKT-лимфоцитов ($p < 0,05$) и Treg-клеток ($p < 0,05$). Гуморальный иммунитет в этой подгруппе отличался подъемом концентрации IL-4, MIF и снижением уровня TNFα ($p < 0,05$).

Туберкулема в фазе стихающей и умеренной активности сопровождалась снижением фагоцитарной и функционально-метаболической активности моноцитов ($p < 0,05$) с понижением экспрессии HLA-DR, увеличением экспрессии CD25 и CD95 на Т-лимфоцитах и Т-хелперах ($p < 0,05$), а также снижением экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах ($p < 0,05$). У этих пациентов выявлено значительное снижение количества NK-клеток и увеличение γδТ-клеток ($p < 0,05$), сопровождаемое повышением количества Treg-клеток и индекса $CD4^+/CD8^+$ ($p < 0,05$). Цитокиновый профиль отличался увеличением концентрации IL-1β, MIF ($p < 0,05$), IL-2 (более чем в 600 раз в сравнении с контролем, в 2,9 раза в сравнении с данными пациентов, имеющих активные туберкулемы, $p < 0,05$), снижением IFNγ и TNFα ($p < 0,05$).

Заключение. С учетом выявленных изменений иммунологических показателей разработаны критерии определения активной туберкулемы легкого – увеличение экспрессии CD11b, HLA-DR на моноцитах, CD11b – на нейтрофилах, туберкулемы в фазе умеренной или стихающей активности – увеличение экспрессии CD25 на Т-хелперах, снижение HLA-DR на Т-лимфоцитах и понижение продукции O_2^{2-} гранулоцитами. Применение множественного регрессионного анализа позволило установить зависимость, позволяющую оценить фазу активности туберкулемы на основании уравнения, включающего оценку количества CD3-, CD4-, CD19-лимфоцитов, NK-клеток, а также экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах.

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Дьякова М.Е., Эсмедляева Д.С, Перова Т.Л.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Оксид азота (NO) участвует в регуляции разнообразных метаболических реакций, обеспечивающих жизнеспособность и функциональную активность клеток. Оксид азота может выступать также и как модулятор иммунного ответа.

Цель. Изучить взаимосвязь уровня NO с продукцией цитокинов у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ).

Материалы и методы. У 29 больных ФКТ в мононуклеарах (мн) и нейтрофилах (нф) крови изучали генерацию стабильных метаболитов NO – по концентрации общего (NO_2^-/NO_3^-) и эндогенного (NO_2^-) нитрита с помощью набора Total NO/Nitrite/Nitrate (R&D Systems, Канада). Уровень индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) – набором Human iNOS Immunoassay (USCN, КНР). Концентрацию цитокинов (IL-10, IL-17, IL-18), IFNγ, TNFα – в цельной крови, индуцированных PPD и не стимулированных, определяли с использованием тест-системы производства «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Результаты. У больных ФКТ выявлено снижение генерации общего и эндогенного нитрита мононуклеарами и нейтрофилами ($p = 0,000...$). Уровень экспрессии iNOS этими клетками определялся в пределах референсного диапазона.

Интенсивность базальной продукции цитокинов была разнонаправленной: повышение IL-18 ($p = 0,0015$), снижение TNFα ($p = 0,04$) и сохранение в пределах референсного диапазона продукции IL-10, IL-17 и IFNγ. Интенсивность секреции цитокинов, индуцированных специфическим антигеном PPD, была также разнонаправленной: рост IFNγ ($p = 0,001$) и IL-18 ($p = 0,0001$) наряду со снижением уровней TNFα ($p = 0,048$) и IL-10 ($p = 0,0028$). При этом уровень секреции IL-17 не отличался от референсного.

Выявлена ассоциированность между показателями нитрозилирующего стресса и продукцией цитокинов: прямая зависимость между экспрессией iNOSн и продукцией IL-10 ($r = 0,80$; $p = 0,01$), обратная – с уровнем IL-17_PPD ($r = -0,91$; $p = 0,0015$); обратная корреляция между экспрессией iNOS мн и продукцией IL-17 ($r = -0,80$; $p = 0,03$), TNFα ($r = -0,94$; $p = 0,005$), IL-17_PPD ($r = -0,78$; $p = 0,04$) и прямая между экспрессией iNOS мн и уровнем IFNγ ($r = 0,79$; $p = 0,02$); обратная связь между генерацией NO_2^-мн и продукцией IL-17 ($r = -0,84$; $p = 0,004$). Между базальной продукцией IFNγ и TNFα выявлена обратная корреляция ($r = -0,80$; $p = 0,03$).

Заключение. Отсутствие синергизма между базальной продукцией IFNγ и TNFα отражает их несостоятельность в индуцировании цитотоксического уровня NO. IFNγ один может индуцировать только нецитотоксические концентрации NO. Обнаруженный дефицит продукции TNFα может отражать функциональную инертность иммуноцитов и, как следствие, хронизацию и прогрессирование туберкулезного процесса. Выявленные ассоциации между продукцией цитокинов и показателями нитрозилирующего стресса отражают их важную роль в иммунопатогенезе гиперхронического специфического процесса. Отмеченное у больных ФКТ снижение продукции эндогенного и общего нитрита может свидетельствовать об активации Th2, при которых ингибируется экспрессия iNOS и возрастает активность аргиназы, катаболизирующей субстрат для синтеза NO.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Истомина Е.В., Старшинова А.А., Чернохаева И.В., Назаренко М.М., Ланда С.Б., Филатов М.В., Яблонский П.К.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Поиск дополнительных критериев определения активности туберкулезной инфекции является важным для возможности прогноза течения и развития

заболевания. Формирование эффективного противотуберкулезного иммунного ответа сопряжено с формированием иммунных комплексов, содержащих исключительно IgG3. Наличие иммунных комплексов, состоящих в основном из IgE, могут способствовать прогрессированию болезни.

Цель. Определение уровня и изотипа иммуноглобулинов IgG и IgE у больных туберкулезом легких.

Материалы и методы. За период с 2015-2016 гг. на базе ФГБУ «СПбНИИФ» Министерства здравоохранения РФ обследовано 50 больных туберкулезом легких с бактериовыделением. Комплекс диагностики включал оценку клинической симптоматики, рентгенологические и бактериологические методы. Определение иммунных комплексов, содержащих IgE, IgG3, IgG1, IgG1 + IgG3, IgG1 + IgE (с помощью метода динамического светорассеяния). Обработка материала проводилась с использованием программы Statistica 7.0. Мы применили критерий хи-квадрат (χ^2). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Иммунные комплексы определялись у всех пациентов в рассеивании 7,25±0,34%, так же как IgG1 – 4,3±0,25% и IgE – 3,48%, в 98% (49/50) были IgG3 – 3,2%±0,37%. Фракции иммуноглобулинов G и E имели место в 88,0% (44\50) IgG1 + IgG3 – 3,76% и несколько реже в 74,0% (37/50) IgG1 + E – 5,71%, тогда как имели место только в 30,0% (15/50) IgG3 + IgE – 2,09.

Заключение. Определение в одинаковом проценте случаев IgG1 и IgG3 (100%), также как IgE (100%) может свидетельствовать о полноправном запуске аллергической реакции при туберкулезе, что может объяснять появление в IgG1 + E и IgG3 + E комплексов. Полученные данные могут объяснять запуск иного механизма, нежели только инфекционный, в развитии туберкулеза.

МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТЯЖЕСТЬЮ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Никитина И.Ю.[1], Пантелеев А.В.[1], Ганусов В.В.[2], Лядова И.В.[1]

[1] ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия
[2] Университет Теннесси, Ноксвилл, Теннесси, США

Исследования в области иммунопатогенеза туберкулеза (ТБ) являются актуальными и направлены на выяснение роли различных популяций клеток врожденного и адаптивного иммунитета в развитии противотуберкулезного ответа. Изменения соотношения между различными параметрами иммунного ответа являются факторами, влияющими на течение инфекции, и могут быть использованы для оценки активности ТБ и эффектности проводимой терапии.

В связи с этим **целью** исследования явился многопараметрический анализ различных популяций иммунных клеток и анализ их взаимосвязи с особенностями течения ТБ.

Материалы и методы. В исследование было включено 50 больных ТБ легких. С помощью проточной цитометрии были получены данные о 54 иммунологических показателях: Т- и В-лимфоцитах ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$), NK-клеток ($CD16/56^+$); лимфоцитах CD4, продуцирующих различные комбинации цитокинов IFNγ, TNFα и IL-2 и других. Тяжесть ТБ определяли, оценивая форму легочной патологии, уровень бактериовыделения, степень распространенности и деструкции в легких и тяжесть интоксикации.

Для статистического анализа применяли корреляционный метод, кластерный анализ, множественную линейную регрессию. Точность статистических результатов подтверждали, используя метод «ресемплинга» данных и проверки статистических гипотез на 1000 псевдовыборках (метод "bootstrapping").

Результаты. Корреляционный анализ с критическим уровнем p-value = 0,006 выявил, что основными иммунологическими коррелятами клинических параметров были популяции лейкоцитов. В частности, процент лимфоцитов обратно коррелировал со всеми клиническими проявлениями ТБ, кроме формы легочной патологии. Наиболее достоверными были прямые корреляции между процентом нейтрофилов, степенью деструкции в легких и уровнем бактериовыделения ($p = 2 \times 10^{-5}$ и $p = 0,01$ соответственно). Кластерный анализ с использованием метода "bootstrapping" подтвердил, что ассоциации между популяцией нейтрофилов, степенью деструкции легочной ткани и уровнем бактериовыделения сохраняются в псевдовыборках (70 и 50% соответственно). Множественная регрессия показала, что одним из основных факторов, влияющих на изменение числа нейтрофилов в крови является степень деструкции в легких.

Заключение. Тяжесть ТБ не определяется недостаточностью «протективного» иммунного ответа лимфоцитов Th1, а возможно зависит от патологической иммунореактивности организма, ассоциированной с повышенным содержанием популяций нейтрофилов.

Работа поддержана грантом РНФ № 15-15-00136.

ПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ Th1, Th17, Th1/Th17 ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Пантелеев А.В., Никитина И.Ю., Горелова Л.А., Космиади Г.А., Лядова И.В.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Введение. Протекция против туберкулеза (ТБ) была первоначально ассоциирована с генерацией лимфоцитов Th1 и продукцией ими IFNγ. Более поздние исследования показали вклад других популяций Т-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов в контроль над микобактериями (Mtb), в частности – лимфоцитов Th17 и IL-17. При этом некоторые исследования поставили под вопрос роль и механизмы протективной активности лимфоцитов Th1 при ТБ, а при ряде других патологий были описаны популяции клеток, коэкспрессирующих цитокины типа 1 и IL-17, а также рецепторы, характерные для популяций Th1 и Th17. Роль и относительный вклад этих популяций в противотуберкулезный иммунный ответ и патологию при ТБ остается не до конца установленной.

Цель. Фенотипическая и функциональная характеристика лимфоцитов Th1, Th17 и Th1/Th17 и анализ количественных параметров их ответа при туберкулезе легких у людей.

Материалы и методы. В исследование были включены больные ТБ легких, проходящие лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ», здоровые люди, находящиеся в контакте с больными ТБ, здоровые доноры, не имеющие установленных контактов с больными ТБ. Клетки крови стимулировали антигенами Mtb и с помощью проточной

цитометрии определяли содержание Mtb-специфичных лимфоцитов $CD4^+$, продуцирующих IFNγ, IL-17, и одновременно IFNγ и IL-17, экспрессию на них рецепторов CXCR3, CCR6, CD161, отличающих популяции лимфоцитов Th1, Th17 и Th1/Th17, экспрессию маркеров дифференцировки и функционального истощения клеток. Аналогичный подход был использован для определения содержания популяций Th1, Th17, Th1/Th17 в очаге инфекции в легочной ткани.

Результаты. Показано, что в крови больных ТБ и «контактов» среди лимфоцитов $CD4^+$, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, преобладают лимфоциты с фенотипом $CXCR3^+CCR6^+$, характерным для популяции Th1/Th17. Среди Mtb-специфичных лимфоцитов $CD4^+$, у больных ТБ и «контактов» преобладают лимфоциты $IFN\gamma^+IL\text{-}17^-$; содержание лимфоцитов $IL\text{-}17^+$ существенно ниже, содержание лимфоцитов $IFN\gamma^+IL\text{-}17^+$ незначительно. Несмотря на функциональную принадлежность лимфоцитов $IFN\gamma^+IL\text{-}17^-$ к популяции Th1, их фенотип отличается от фенотипа «классических» лимфоцитов Th1 и характеризуется коэкспрессией рецепторов CXCR3, CCR6, CD161 («гибридный» фенотип, характерный для популяции Th1/Th17). Проведен сравнительный анализ фенотипа, степени дифференцировки, содержания лимфоцитов Th1, Th17, Th1/Th17 в крови больных ТБ и «контактов», в крови больных ТБ с различным течением ТБ процесса, в крови и легких больных ТБ. Полученные результаты позволяют предположить, что популяция Mtb-специфичных лимфоцитов $IFN\gamma^+IL\text{-}17^-$, экспрессирующих фенотип $CXCR3^+CCR6^+$, является менее дифференцированной по сравнению с популяцией «классических» лимфоцитов Th1, а увеличение содержания последних ассоциировано с большей активностью и тяжестью инфекционного процесса.

Заключение. Полученные результаты выявляют специфические характеристики ответа Th1 при ТБ, к которым относится преобладание среди Mtb-специфичных лимфоцитов $CD4^+$ клеток-продуцентов IFNγ и экспрессия данными клетками «гибридного» фенотипа $CXCR3^+CCR6^+/CD161^+$. Увеличение содержания лимфоцитов Th1 в популяции $CXCR3^+CCR6^-$ отмечается при активном ТБ.

Работа поддержана грантом РНФ 15-15-00136.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СУПРЕССИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Уразова О.И., Есимова И.Е., Кононова Т.Е., Захарова П.В., Колобовникова Ю.В., Чурина Е.Г.

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Многие инфекционные возбудители (в том числе *Mycobacterium tuberculosis*) способны вызывать супрессию иммунного ответа. Немаловажная роль в ее развитии отводится Т-регуляторным лимфоцитам (Treg), реализующим свое иммуносупрессорное действие посредством экспрессии поверхностных (CD25, CTLA-4) и внутриклеточных (транскрипционный фактор FoxP3) молекул, гранзим-опосредованного цитолиза и секреции ингибиторных цитокинов (IL-10 и TGF-β). Однако остаются дискуссионными вопросы о том, какие конкретные патогенетические факторы и механизмы лежат в основе Treg-опосредованной иммуносупрессии при туберкулезе легких.

Цель. Определить роль и молекулярные механизмы Treg-опосредованной иммуносупрессии в иммунопатогенезе туберкулеза легких.

Материалы и методы. Обследованы 217 больных (149 мужчин и 68 женщин 41,94±10,63 лет) с впервые выявленным инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких (ИТЛ, ДТЛ) до лечения. Материал исследования: выделенные из крови лимфоциты и эозинофилы, ДНК, РНК. Методы исследования: иммунофенотипирование Т-лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^+$, $CD28^+$, CTLA-4^+, $FoxP3^+$, IL-2^+), оценка *in vitro* секреции IL-2, IL-10, TGF-β и содержания активных форм транскрипционных факторов внутриклеточной трансдукции сигнала (NF-κB, AP-1 и NFAT2) в Т-лимфоцитах при моделировании *in vitro* их рецептор-зависимой активации с применением методов иммуноферментного анализа и проточной цитометрии, определение полиморфизмов генов цитокинов IL-10, TGF-β и мРНК гена *FoxP3* с использованием ПЦР.

Результаты. У больных ТЛ увеличение количества $CD3^+CD4^+CD25^{high}$, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Treg в крови сочеталось с повышением экспрессии мРНК гена *FoxP3* в лимфоцитах и гиперсекрецией *in vitro* ингибиторных Treg-цитокинов IL-10, TGF–β с наибольшей выраженностью при ДТЛ (соответственно, 1,12%, 4,88%, 7,25%, 27,72 отн.ед., 30,93 пг/мл, 1227,71 пг/мл; $p < 0{,}01$-$0{,}001$). Выявлены ассоциации между базальной и BCG-индуцированной *in vitro* гиперсекрецией IL-10, TGF-β и носительством полиморфных вариантов генов *C-592A* гена *IL10* (аллель *A* и генотипы *CA, AA*) и *C-509T* гена *TGF*β (аллель *T* и генотипы *CT, TT*), что свидетельствует о генетически детерминированной предрасположенности к иммуносупрессии у больных ТЛ. Однако Treg реализуют свое иммуносупрессорное действие не только посредством цитокинов, но и контактным способом – через экспрессию ингибиторной молекулы CTLA4 (инактивирует молекулы костимуляции на антигенпрезентирующих клетках (APC) и Т-лимфоцитах). При этом блокируются не только внеклеточный этап активации Т-лимфоцитов (посредством костимуляции при контакте с APC), но и внутриклеточный – проведение сигнала активации от поверхности клетки к генам синтеза IL-2 и его рецептора при участии транскрипционных факторов NF-κB, AP-1 и NFAT2, на что указывают результаты моделирования *in vitro* CD3/CD28-зависимой активации Т-лимфоцитов у больных ТЛ – снижение численности NF-$κB^+$, AP-1^+, $NFAT2^+$ и (до 9,80%) $CD28^+IL\text{-}2^+$ активированных Т-клеток при повышении количества Treg с фенотипом $CD3^+CTLA4^+$ (более 20%) ($p < 0{,}001$). У 18% больных ТЛ увеличение числа и цитокинсекреторной активности $FoxP3^+$Treg ассоциировалось с эозинофильным лейкоцитозом до лечения (до $[0{,}97\pm0{,}11] \times 10^9$/л, более выраженным при ДТЛ, чем при ИТЛ) во взаимосвязи с деструктивными изменениями и замедлением темпов рассасывания инфильтратов в легких. Обнаружены корреляции между количеством иммуносупрессорных Treg в крови и показателями пролиферации (отрицательные) и апоптоза (положительные) лимфоцитов, снижением базальной и BCG-индуцированной *in vitro* секреции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами (10,59 и 33,85 пг/мл, $p < 0{,}05$) при повышении базальной и BCG-индуцированной *in vitro* секреции IL-2 эозинофильными гранулоцитами (666,23 и 670,45 пг/мл, $p < 0{,}05$) у больных ДТЛ. Ввиду того, что IL-2 – медиатор, в комбинации с TGF-β активирующий конверсию и функции Treg, гиперсекрецию IL-2 эозинофильными гранулоцитами в сочетании с эозинофильной реакцией крови можно рас-

ценивать как фактор, потенцирующий механизмы Treg-опосредованной иммуносупрессии при ДТЛ.

Заключение. Патогенетическими факторами Treg-опосредованной иммуносупрессии при ТЛ является повышение секреции ингибиторных цитокинов (IL-10, TGF-β) и экспрессии маркерных молекул (FoxP3, CTLA-4) с подавлением внеклеточного и внутриклеточного этапов рецептор-зависимой активации Т-лимфоцитов. Факторами, предрасполагающими к иммуносупрессии при ТЛ, являются полиморфизм генов *IL10* (*C-592A*), *TGF*β (*C-509T*) и эозинофильная реакция крови (эозинофилия) до лечения.

IL-18 И МАРКЕРЫ ДЕСТРУКЦИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Эсмедляева Д.С., Дьякова М.Е., Перова Т.Л., Васильев И.В., Кирюхина Л.Д.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Введение. Степень поражения легочной ткани напрямую зависит от состояния иммунной системы организма. IL-18, провоспалительный цитокин, экспрессируемый многими типами клеток, обладает широким спектром биологических эффектов: сдвигает баланс цитокинов в пользу клеточного иммунитета, стимулируя продукцию IFNγ, IL-2 и др., регулирует Fas-ligand опосредованный апоптоз. Наряду с TNFα, IL-17 и др. цитокинами участвует в стимуляции матриксных металлопротеиназ (ММР) – семейства внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса и к выбросу апоптозных лигандов (Fas).

Цель. Определить закономерности изменений IL-18 и системы ММР/ингибиторы в зависимости от хронической формы туберкулеза легких (ТЛ).

Материалы и методы. Обследовано 43 пациента ТЛ с длительностью заболевания более 2-х лет, с наличием распада, выделяющих лекарственно-устойчивые штаммы микобактерий. Среди них – 24 с туберкулемами (ТУБ) и 19 с фиброзно-кавернозным (ФКТ) ТЛ. В супернатантах мононуклеаров периферической крови определяли спонтанную и индуцированную фитогемагглютинином (PHA) и туберкулином (PPD) продукцию цитокинов (IL-18 и IFNγ) с использованием ИФА наборов ЗАО «Вектор Бест». Оценку внешнего пути активации апоптоза лимфоцитов проводили по экспрессии поверхностного фенотипа Fas ($CD95^+$) и по окрашиванию коньюгатом аннексин-V (AnnV) с флуорохромом (FITC) и йодистым пропидием (PI) (Becton Dickinson, USA) на проточным цитофлюориметре. В исследовании уровней коллагеназ (ММР-1,-8), желатиназы (ММР-9) и их ингибитора TIMP-1 в сыворотке крови использовали ИФА наборы (Biosiurce, USA). Расчет объемов деструкции проводили согласно результатам компьютерно-томографического обследования.

Результаты. Установлено, что ТУБ и ФКТ характеризуются значимым ростом абсолютного числа лимфоцитов, экспрессирующих $CD95^+$, возрастанием числа AnV^+ положительных клеток, не стимулированной продукцией цитокинов, не только относительно контроля, но и между собой. Индукция PPD вызывала увеличение продукции обоих цитокинов только при ТУБ. При ФКТ она была ниже контрольного уровня. Установлены связи IL-18 и IFNγ как между собой ($r = 0,69$, $p \le 0,03$; $r = 0,87$, $p \le 0,004$), так и с маркерами апоптоза, различающиеся в зависимости от характера стимуляции и объема поражения. При ТУБ активация IL-18 на PPD была связана с маркерами позднего апоптоза (AnnV+/ PI+) ($r = 0,45$, $p \le 0,03$), при ФКТ – с ранним апоптозом AnnV+/ PI- наряду с продукцией IFNγ на PPD ($r = 0,48$, $p \le 0,03$; ($r = 0,43$, $p \le 0,03$).

При обеих хронических формах ТЛ наблюдалось повышение уровней коллагеназ и желатиназы, не сопровождавшееся компенсированным повышением концентрации их ингибитора относительно контрольного уровня ($p \le 0,05$), приобретающее значимые различия по мере увеличения объема деструкции. С учетом того, что основными источниками ММР-8 и -9 являются нейтрофилы и что по мере увеличения тяжести процесса наблюдается увеличение казеозно-некротических масс, полученная закономерность кажется логичной.

Продукция IFNγ была связана только с одной из коллагеназ (ММР-8) и TIMP-1 и определялась объемом поражения. При ТУБ изменения ММР-8 были противоположны продукции цитокина стимулированной PPD ($r = -0,41$, $p \le 0,03$), при ФКТ – оставались на уровне контроля ($r = -0,52$, $p \le 0,03$). Связи IL-18 с уровнями ММР и TIMP-1 установлено не было.

Участие цитокинов в активации апоптоза было установлено при анализе изменений липидного состава поверхности мембраны клетки, тогда как показатели системы ММР/ингибиторы были связаны с уровнем экспрессии Fas-рецептора, характеризующего потенциальную готовность клеток к рецепции апоптотического сигнала. При этом в случае ТУБ объем деструкции определялся взаимосвязью $CD95^+$ с ММР-9 ($r = 0,55$, $p \le 0,03$), при ФКТ – с уровнем желатиназы и ее ингибитора ($r = 0,45$, $p \le 0,03$; $r = 0,48$, $p \le 0,03$).

Заключение. Показана зависимость изменений IL-18 с IFNγ и маркерами апоптоза при хронических формах ТЛ. При ТУБ отмечался рост спонтанной и PPD стимулированной продукции обоих цитокинов. При ФКТ установлено увеличение спонтанной продукции IL-18 и IFNγ по сравнению с ТУБ, тогда как при стимуляции PPD наблюдалось их снижение ниже контрольного уровня, свидетельствующее о низком функциональном состоянии иммунокомпетентных клеток. Нарушение соотношения уровня ММР/ингибитора в сторону протеаз, в большей степени выраженное при ФКТ, в сочетании с отрицательной связью с IFNγ, по-видимому, вызвано влиянием противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF-β), способствующих хронизации процесса и увеличению объема распада.

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

ИММУНОЛОГИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ К АНТИГЕНАМ ГЕПАТИТОВ А И В

Алпатова Н.А., Невская Л.В., Медуницын Н.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравохранения РФ, Москва, Россия

Несмотря на высокую эффективность различных видов имеющихся в настоящее время вакцин, ни одна из них не дает 100 % профилактического и лечебного эффекта. В связи с этим исследования, направленные на решение вопроса повышения эффективности вакцинации, имеют существенную значимость. Для оптимизации вакцинального процесса используются различные иммуномодуляторы, которые отличаются друг от друга по своему происхождению и механизму действия. Особое положение занимают цитокины, естественные медиаторы клеточного взаимодействия, которые необходимы для развития любой иммунной реакции. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что многие цитокины (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-8, IFNγ, TNFα, Г-КСФ) могут рассматриваться в качестве иммуноадьювантов при вакцинации, обеспечивая активацию вакцинального процесса.

Цель нашей работы заключалась в изучении иммуноадьювантного эффекта препаратов цитокинов на развитие гуморального иммунного ответа у интактных и иммунодефицитных животных, иммунизированных вакцинами против гепатитов А и В, а также в изучении содержания цитокинов в сыворотках крови лиц, вакцинированных против гепатитов А и В.

При изучении адьювантных свойств цитокинов оценивали их влияние на иммуногенность вакцины против гепатита А (ГЕП-А-ин-ВАК) в экспериментах на мышах и морских свинках. Показано, что препараты рчTNFα и Полиоксидония оказывают стимулирующее влияние на иммуногенную активность вакцины, индуцируя синтез специфических АТ к АГ ВГА. Повышение частоты выявления специфических АТ сопровождается увеличением их титра, при этом в опытных группах животных в большинстве случаев выявляются АТ в титре 1:40 – 1:160, тогда как в контроле – в титрах до 1:10. Установлено, что использование цитокинов в качестве адьювантов одинаково эффективно для вакцин с различным содержанием АГ ВГА в прививочной дозе. Наиболее выраженными иммуностимулирующими свойствами обладают цитокины рчTNFα, рчIL-1b и синтетический гексапептид имунофан. Введение адьювантов одновременно с вакциной способствовало формированию более высоких титров АТ к вирусу гепатита А по сравнению с группой животных, иммунизированных одной вакциной (в 2,5-13,5 раза), и обеспечивало 100% сероконверсию у животных после введения препаратов.

Влияние цитокинов рчIL-1β и рчIL-2 на интенсивность иммунного ответа животных при иммунизации вакциной против гепатита В (Энджерикс) изучено на экспериментальных моделях с индуцированной циклофосфаном иммуносупрессией и без иммуносупрессии. Показано, что уровень иммунного ответа интактных животных, иммунизированных меньшими дозами вакцины в сочетании с цитокинами, сопоставим с ответом на большую дозу вакцины. Введение цитокинов с вакциной приводит к увеличению числа сероположительных животных по сравнению с группой, иммунизированной одним АГ. Более выраженный эффект наблюдается в группах животных, которым АГ вводили в сочетании с рчIL-1β. При исследованиях на иммунодефицитных животных установлено, что частота выявления специфических АТ и средние значения концентрации АТ были значительно выше в группах животных, иммунизированных вакциной в сочетании с цитокинами, по сравнению с животными, иммунизированными одной вакциной. В случае использования исследуемых препаратов цитокинов как на этапе иммунизации, так и реиммунизации иммунодефицитных животных, уровень иммунного ответа приближается к уровню ответа у животных без иммуносупрессии, иммунизированных одним АГ.

Уровни цитокинов изменяются в процессе развития иммунного ответа. Вакцинация, как и инфекции, может привести к повышению концентрации циркулирующих цитокинов. Проведено изучение содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови лиц, вакцинированных против гепатитов А и В (вакцины Геп А-ин-Вак, ВГВдж, Ревакс). Показано, что вакцинация вызывала повышение уровня IL-1β и TNFα в сыворотке крови привитых лиц, который сохранялся в течение 4 недель после введения препаратов.

Таким образом, стимуляция иммунного ответа на вакцинацию против гепатитов А и В с использованием цитокинов может рассматриваться в качестве перспективного подхода в решении важного вопроса формирования выраженного протективного иммунитета, в том числе у лиц с иммунодефицитными состояниями.

УРОВЕНЬ ОНКОМАРКЕРОВ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Ахмалтдинова Л.Л.[1], Азизов И.С.[2], Тюхтина З.П.[3], Сердюк Л.И.[3], Козаченко Н.В.[4]

[1] Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан
[2] Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия
[3] Регионарный центр по профилактике и контролю за СПИД, Караганда, Казахстан
[4] НПО «Кредо» , Караганда, Казахстан

Классическая клиническая картина СПИД характеризуется развитием пролиферативных заболеваний, однако в большем случае это касается вирус-ассоциированных онкологических заболеваний (саркома Капо-

ши, лимфома Беркита). Но накапливаются данные, что ВИЧ-инфекция, даже при эффективном своевременном приеме ретровирусных препаратов, способствует увеличению случаев онкологических заболеваний. Связано ли это с ВИЧ-инфекцией или это является последствием социального неблагополучия и токсического воздействия посторонних факторов, вопрос еще открыт. **Целью** исследования стало изучения уровня молекулярных онкомаркеров у ВИЧ-инфицированных с фоном парентеральных форм наркотических средств и без отягощающего фона.

Материалы и методы. Были представлены 3 группы обследуемых. 30 ВИЧ$^+$ пациентов без фона наркотической зависимости, 30 ВИЧ-инфицированных потребителей инъекционных форм наркотиков. Контрольную группу составили 30 условно здоровых лиц. Группы формировались сходные по половозрастному составу, в группах с ВИЧ-инфекций тяжесть заболевания (стадии и среднее число CD4) так же были сравнимы.

Для мультиплексного определения факторов пролиферации и ангионеза, которые могут быть онкомаркерами, мы использовали иммунофлуоресцентное исследование методом xMap на Биоплекс 3Д с применением набора Cancer Biomarkers panel (BioRad). В данное исследование мы включили маркеры: sHER/2, sEGFR, sIL-6Rα, FGF, sVEGFR-2, PECAM1, PDGF AB/BB, G-SCF, sTIE2, SCF, sVEGFR-1, остеопонтин.

Результаты. Мы обнаружили, что в обеих группах с ВИЧ инфекцией значимо повышены биомаркеры sHER/2, sEGRf. У наших пациентов нет данных за опухолевый процесс, причины повышения этих маркеров возможно кроются в расстройствах регуляции клеточной пролиферации.

Мы обнаружили резкое повышение растворимого рецептора провоспалительного маркера sIL-6RA в обеих группах ВИЧ$^+$ пациентов в равной степени. Мы обнаружили увеличение сывороточного уровня sVEGfr2, но не sVEGfr1 в обеих группах ВИЧ$^+$ пациентов.

Исследование показало почти 2-кратное увеличение уровня PECAM1 во всех ВИЧ$^+$ группах. Это молекула клеточной адгезии с проангиогенные и провоспалительного активности.

Мы обнаружили повышение sTIE2 у всех ВИЧ$^+$ пациентов равной степени. sTIE2 –один их важнейших регуляторов ангиогенеза. Есть данные о повышении его во время ВИЧ-инфекции и использовании в качестве прогностических маркеров тяжести заболевания и осложнений.

Такие биомаркеры как FGF и SCF значимо повышены только в группе ВИЧ-инфицированных потребителей инъекционных форм наркотиков. FGF играет роль в процессах пролиферации, регенерации широкого спектра клеток и тканей. Известно, что продукция его может ограничивать ВИЧ-ассоциированные повреждения.

SCF-цитокин, играющий роль в гемопоэзе, сперматогенезе и меланогогенезе. Есть данные, которые обнаружили увеличение его при ВИЧ-инфекции, но у пациентов с неврологическими осложнениями.

Изменения остальных биомаркеров не обнаружено.

Обсуждение. Исследование биомаркеров канцерогенеза имеет свои особенности у пациентов с ВИЧ, в том числе осложненных наркотической зависимостью. Количественный мультиплексный анализ выявил тенденцию к повышению отдельных онкомаркеров, что может расцениваться как реакция на инфекционный агент (sIL-6RA, sVEGfr2, PECAM1, sTIE2). Увеличение таких маркеров как SCF и FGF у ВИЧ$^+$ потребителей наркотических препаратов, по-видимому, отражают компенсаторные реакции на хроническую интоксикацию. Однако, увеличение уровня маркеров эпителиального происхождения sHER/2, sEGRf сложно объяснить инфекционным процессом.

МОНИТОРИНГ СОДЕРЖАНИЯ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ С CXCR3 И CCR6 РЕЦЕПТОРАМИ В ПРОЦЕССЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ С

Басина В.В.[1], Бацунов О.К.[2, 3], Арсентьева Н.А.[2], Эсауленко Е.В.[1], Тотолян Арег А.[2, 3], Семенов А.В.[2, 3]

[1] Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[3] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В настоящее время для лечения и предотвращения развития осложнений хронического гепатита С (ХГС) применяют различные варианты противовирусной терапии (ПВТ): интерфероновые схемы и препараты прямого противовирусного действия (ППРД). Эффективность комбинированной терапии с использованием интерферона не превышает 80% при 1 генотипе вируса, а при использовании ППРД составляет 91-98%. В связи с этим в центре внимания оказывается вопрос об эффективности терапии в зависимости от особенности иммунологического ответа организма человека. Определение уровня экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 на популяциях лимфоцитов до, во время проведения и после ПВТ может помочь в поиске предикторов ее эффективности.

Цель и задачи. Определение возможных предикторов эффективности ПВТ является основной целью исследования. Задачей данной работы была оценка содержания Т- и В-лимфоцитов с CXCR3 и CCR6 рецепторами у пациентов с ХГС получивших противовирусную терапию с использованием интерферонов и получавших ППРД для оценки ее эффективности.

Материалы и методы. За период с 2014 по 2017 гг. в СПБ ГБУЗ «КИБ им. С.П. Боткина» проведено наблюдение 28 пациентов с ХГС до, во время и по окончанию проведения ПВТ в возрасте от 22 до 62 лет, средний возраст составил 43,0±8,5 лет. Все пациенты были разделены на 3 группы: 1 группа – пациенты получавшие ПВТ с использованием интерферонов – 16 человек, 2 группа – пациенты принимавшие ППРД – 7 человек и 3 группа – пациенты принимавшие ППРД перенесшие ранее трансплантацию печени – 5 человек. Во все три группы были включены пациенты, достигшие в процессе ПВТ вирусологического ответа (ВО). У всех пациентов определялось содержание лимфоцитов, несущих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6, методом проточной цитофлюориметрии с использованием различных комбинаций моноклональных антител. Для оценки цитотоксических Т-клеток (CTL) и натуральных киллерных клеток (NK) (CD3/CD16,56/CXCR3/CCR6/CD8), В-лимфоцитов

и Т-хелперов (Th) (CD19/CD3/CXCR3/CCR6/CD4). Для определения статистически значимого изменения медиан до, во время и после ПВТ был использован критерий Краскела–Уоллиса с уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты. В работе измерялось содержание Т и В-лимфоцитов с CXCR3 или CCR6 рецепторами в ходе терапии и производилось сравнение со значениями до начала лечения. В периферической крови больных получавших ПВТ с использованием интерферонов обнаружено увеличение содержания Т-клеток, несущих хемокиновый рецептор CXCR3 ($p = 0,018$), как Th ($p = 0,043$), так и CTL ($p = 0,009$). Уровень В-клеток с CXCR3 рецептором снижался на фоне ПВТ в этой же группе пациентов ($p = 0,007$). У пациентов 3 группы (получавших ППТД после трансплантации печени) так же было выявлено увеличение содержания Т-клеток с CXCR3 рецептором за счет CTL ($p = 0,016$). Содержание Т- и В-лимфоцитов несущих CCR6 рецептор не изменялось в процессе ПВТ у пациентов 1 и 2 групп. С высокой достоверностью выявлено увеличение NK CXCR3 – клеток (натуральных киллеров) ($p = 0,0001$) у пациентов, получавших интерфероны, а так же в группе пациентов, получавших ППТД и ранее перенесших трансплантацию печени ($p = 0,016$). У пациентов 3 группы было определено увеличение NK CCR6 –клеток ($p = 0,011$). Изменений содержания малых субпопуляций лимфоцитов у пациентов 2 группы не наблюдалось.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация Т-клеточного звена иммунного ответа за счет CTL и NK-клеток, несущих CXCR3 рецепторы, а так же снижение количества В-клеток с CXCR3 рецептором, является прогностически положительным фактором в отношении эффективности ПВТ.

АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ГОРМОНОВ У МУЖЧИН ПРИ ВИЧ/СПИД ЗАБОЛЕВАНИИ

Бегишева Р.Р., Меркушкина Т.А., Залялиева М.В.

Республиканский научный центр иммунологии Министерства здравоохранения РУ, Ташкент, Узбекистан

Регуляция обменных процессов в организме мужчин происходит при участии нейроиммуноэндокринной систем. Прогрессирующий иммунодефицит при ВИЧ-инфекции приводит к изменениям всех систем организма, в том числе и эндокринной системы, которая остается наименее изученной. Данные о состоянии половых гормонов при ВИЧ-инфекции очень скудные.

Целью исследования явилось изучение уровней гормонов пролактина, кортизола, тестостерона и эстрадиола у ВИЧ-инфицированных мужчин на 3-й и 4-й стадиях заболевания.

Нами было обследовано 49 ВИЧ-инфицированных мужчин в возрасте от 29 до 45 лет (средний возраст составил 37 лет) на 3-й и 4-й клинических стадиях заболевания. Все пациенты состояли на учете в Республиканском центре по борьбе со СПИДом МЗ РУз. Диагноз стадии ВИЧ/СПИД заболевания был установлен на основании клинических проявлений и лабораторных методов исследования (ИФА, иммуноблоттинг, абсолютное содержание СД4 лимфоцитов, вирусная нагрузка). Все больные находились на АРВ терапии. Концентрацию гормонов определяли с помощью стандартных коммерческих наборов фирмы Human (Германия) согласно инструкции производителя. Кровь у пациентов для анализа забирали утром натощак в сухую пробирку. Концентрацию гормонов определяли в сыворотке крови, которую до проведения анализа хранили в глубокой заморозке.

В среднем уровень пролактина в группе ВИЧ-инфицированных на 3-й и 4-й клинической стадии составил 19,5±2,5 нг/мл и 19,7±3,0 нг/мл соответственно, что в 2 раза выше средних значений группы контроля – 9,4±1,4 нг/мл ($p < 0,01$). Но у 46% мужчин на 3-й и 4-й стадиях заболевания уровень пролактина был выше верхних границ нормы и составил 29,8±3,1 нг/мл на 3-й и 33,8±7,8 нг/мл соответственно.

Уровень кортизола в среднем составил 188,1±23,8 нг/мл на 3й и 192±29,5 нг/мл на 4-й стадии заболевания, что было в 1,25 раза выше контрольных значений – 150,6 ±25,3 нг/мл ($p > 0,05$). Уровень кортизола был выше верхних границ нормы у 37,5% мужчин на 3-й стадии и составил в среднем 308±28 нг/мл, у 29% мужчин на 4-й стадии и в среднем составил 339±36,2 нг/мл. Достоверных отличий в зависимости от стадий заболевания по содержанию кортизола не выявлено.

Исследование половых гормонов показало, что концентрация эстрадиола составила 8,9±2,2 пг/мл на 3-й стадии и 8,9±2,8 пг/мл на 4-й, что в 2 раза ниже уровня контрольной группы – 18,7±3,0 пг/мл ($p < 0,05$). У 70% мужчин в 3-й стадии и у 76% мужчин в 4-й стадии заболевания уровень эстрадиола выявлялся ниже границ нормы и составил в среднем 2,6±0,9 пг/мл на 3-й и 3,8±1,0 пг/мл на 4-й стадиях ($p < 0,001$ относительно контроля).

Содержание тестостерона составило 8,7±1,1 нг/мл на 3-й стадии и 6,9±1,6 нг/мл на 4-й стадии заболевания, что незначимо отличалось от показателей контрольной группы – 8,6±2,0 нг/мл.

Таким образом, нами выявлены изменения всех исследуемых гормонов, что говорит о вовлечении в процесс не только гормонов гипофиза и надпочечников, но и половых гормонов. Каждый гормон имеет свое направленное действие на определенный орган, а также влияние на все системы организма, обеспечивая оптимальное взаимодействие между ними. Повышенный уровень кортизола у больных можно объяснить не только воздействием психического и инфекционного стресса, но и повышенной потребностью в восстановительных процессах при ВИЧ-инфекции, где для синтеза белковых структур организма необходим кортизол. Пролактин также воздействует на клеточный рост ткани и стимулирует синтез иммунных клеток. Снижение выработки половых гормонов объясняется тормозящим влиянием других гормонов, таких как пролактин и кортизол, что, конечно, имеет значение. Интересным является то, что у мужчин уровень эстрадиола был значительно снижен у большинства исследуемых, тогда как тестостерон менялся не так выраженно, несмотря на повышенные уровни кортизола и пролактина. Таким образом, на 3-й и 4-й клинических стадиях ВИЧ/СПИД заболевания у мужчин на фоне АРВ терапии происходят значительные изменения гормонов “стресса” и половых гормонов, что может иметь значение в тактике ведения ВИЧ-инфицированных пациентов.

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ 2 И 6 У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С (ХВГС)

Васнева Ж.П., Беляева Л.В.

АО «Самарский диагностический центр», Самара, Россия

Введение. Практически все интерлейкины (IL) обладают плейотропным действием на клетки системы иммунитета, но можно выделить и отдельные направления их действия. Так, IL-2 участвует в формировании Т-клеточного иммунного ответа, IL-6, являясь основным медиатором повреждения тканей, регулирует функциональную активность В-лифоцитов. Спонтанная продукция IL, как и других цитокинов, отражает состояние активации, тогда как ФГА-стимулированная – резервные возможности клеток иммунной системы. По литературным данным, спонтанная продукция IL-2сп колеблется от 0,0 до 10,0 (среднее 0,3), IL-6сп – 0,0-90,0 (среднее 12,0). ФГА – стимулированная продукция IL-2ст – 25,0-590,0 (среднее 155,0), IL-6ст – 100,0 – 30700,0 (среднее 8500,0) пг/мл. По данным ряда авторов, у пациентов с ХВГС отмечается дисбаланс цитокиновой регуляции воспалительного процесса.

Цель. Исследование особенностей спонтанной и ФГА – стимулированной продукции IL-2 и IL-6 у пациентов с ХВГС.

Материалы и методы. Обследовали 26 человек в возрасте от 29 до 67 лет с диагнозом «ХВГС» (мужчины 27,0%) в 2016 г. В гепаринизированной периферической крови определяли плазменные уровни IL-2, IL-6. Спонтанную и ФГА-стимулированную продукцию IL определяли после 48 часовой инкубации крови при 37 °С с использованием ИФТС («Вектор – Бест», Россия). Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 5.5.

Результаты. У пациентов с ХВГС плазменные уровни IL-2 и 6 сопоставимы с таковыми здоровых доноров (1,2±0,6 и 2,3±1,2 пг/мл соответственно).

Спонтанная продукция IL-2сп и IL-6сп составила 24,0±8,7 (0,0-184,0) и 1466,2±333,5 (34,0-4460,0) пг/мл, соответственно, что значительно превышает таковую, приведенную для здоровых доноров. ФГА-стимулированная продукция IL-2ст и IL-6ст составила 106,7±22,3 (0,-391,0) и 1736,0±380,4 (50,0-4484,0) пг/мл, соответственно, что ниже таковой здоровых доноров.

Более детальный анализ результатов исследования спонтанной продукции IL показал, что низкий уровень (< 100 пг/мл) IL-6сп отмечался в 38,5% случаев. Низкий (< 10,0 пг/мл) уровень IL-2сп – в 50,0%. Высокий уровень спонтанной продукции (> 1000,0 пг/мл) IL-6сп регистрировался в 46,0% случаев. Для IL-2сп высокий (> 150,0 пг/мл) – в 11,5% случаев.

Анализ результатов ФГА-стимулированной продукции ИЛ показал, что низкий (< 100 пг/мл) уровень IL-2ст регистрировался в 61,5% случаев, IL-6ст – в 38,5%. Высокие уровни (> 1000,0 пг/мл) IL-6ст отмечались в 46,0% случаев. Для IL-2ст высокие (> 150,0 пг/мл) отмечались в 23,0% случаев.

Кроме того, нами было отмечено, что у пациентов с ХВГС выброс ФГА – стимулированного IL-2ст относительно спонтанного уровня отмечался в 94,0% случаев, тогда как IL-6ст только в 57,7% случаев.

Заключение. У пациентов с ХВГС отмечается повышенная текущая активация продукции IL-2 и IL-6, регулирующих Т- и В-клеточный иммунитет, что в свою очередь сопровождается снижением резервных возможностей клеток иммунной системы к выбросу данных IL.

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ИНТЕРФЕРОНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С (ХВГС)

Васнева Ж.П., Беляева Л.В.

АО «Самарский диагностический центр», Самара, Россия

Введение. Продукция интерферонов (IFN) клетками системы иммунитета является показателем их функционального состояния, которое, в свою очередь, зависит от состояния организма, в том числе природы инфицирующего агента. Спонтанная продукция IFN, как и других цитокинов, отражает состояние активации, тогда как ФГА-стимулированная – резервные возможности клеток иммунной системы.

По литературным данным, спонтанная продукция гамма-IFNсп колеблется от 0,0 до 14,0 (среднее 4,0), альфа-IFNсп – 0,0-6,0 (среднее 1,0), ФГА-стимулированная продукция гамма – IFNст – 165,0 – 7450,0 (среднее 1200,0), альфа-IFNст – 0,0-13,0 (среднее 3,0) пг/мл.

По данным Касимовой Н.В. и др. (2015), у пациентов с ХГВС регистрируется дисбаланс продукции альфа- и гамма-IFN.

Цель. Исследование особенностей продукции IFN у пациентов с ХВГС в сравнении с другими воспалительными заболеваниями.

Материалы и методы. Обследовали 267 человек в возрасте от 29 до 67 лет (26 с диагнозом «ХВГС» (группа 1, мужчины 27,0%) и 241 с другими воспалительными заболеваниями (группа 2, мужчины 28%) в 2016 г. В периферической крови определяли плазменные уровни альфа и гамма- IFN. Спонтанную и ФГА – стимулированную продукцию таковых определяли после 48 часовой инкубации при 37 °С с использованием ИФТС («Вектор-Бест», Россия). Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 5.5.

Результаты. В 1 группе плазменный уровень альфа-IFN составил 0,58±0,3 пг/мл, что сопоставимо с таковым здоровых доноров. Тогда как спонтанный и стимулированный достигали более высоких уровней – 9,4±1,8 (пределы колебаний 1,0-25,0) и 11,7±2,0 (пределы колебаний 1,0-43,0) пг/мл соответственно.

Сравнительный анализ продукции гамма – IFN показал, что в группе 1 гамма-IFNсп составил 71,3±31,9, гамма-IFNст – 725,4±89,6 пг/мл. В группе 2 уровни спонтанной и стимулированной продукции гамма-IFN составили 12,1±1,6 и 764,0±34,1 пг/мл соответственно.

Более детальный анализ результатов исследования спонтанной продукции показал, что в 20,0% случаях в группе 1 и 33,0% в группе 2 уровень гамма-IFNсп не превышал 0,0 пг/мл. Низкий уровень (< 10 пг/мл) гамма-IFNсп в группе 1 отмечался в 44,0%, в группе 2 – в 33,2% случаев. Высокий уровень спонтанной продукции (> 20,0 пг/мл) в группе 1 регистрировался в 32,0% случаев, в группе 2 – в 19,5%.

Более детальный анализ результатов ФГА-стимулированной продукции гамма-IFN показал, что низкий (< 100 пг/мл) уровень в группе 1 регистрировался в 4,0% случаев, в группе 2 – в 15,8%, средние (100,0 – 1000,0 пг/мл) уровни – в 48,0 и 26,0% случаев соответственно, высокие (> 1000,0 пг/мл) – в 48,0 и 65,5% случаев, соответственно. ФГА-стимулированный выброс IFNγ относительно спонтанного уровня отмечался в 92,0% случаев всех пациентов.

Заключение. Пациенты с ХВГС характеризуются более высокими показателями спонтанной и более низкими показателями ФГА-стимулированной продукции гамма-IFN по сравнению с пациентами с другими воспалительными заболеваниями. Спонтанная и ФГА-стимулированная продукция альфа-IFN превышает уровни, приведенные для здоровых доноров.

Полученные нами данные могут свидетельствовать о более высокой текущей продукции IFN и большем истощении резервных возможностей клеток системы иммунитета к выбросу IFN.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ ПРИ КОИНФЕКЦИИ С ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В

Власик Р.А.[1, 3], Останкова Ю.В.[1], Семенов А.В.[1, 2,]

[1] ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[3] ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. По данным ООН количество инфицированных вирусом иммунодефицита человека типа 1 в мире составляет свыше 35 миллионов человек, а ВГВ заражены почти 2 млрд человек, из которых у 240 млн развивается хроническая форма. При этом общность механизмов заражения ВГВ и ВИЧ-инфекцией способствует повышению вероятности сочетания этих инфекций у пациентов. Проблема ВИЧ-инфекции, а также иных вирусных инфекций, часто сопровождающих ВИЧ, в настоящее время остаётся актуальной. В связи с этим важным вопросом являются иммунологические аспекты лабораторной диагностики как самой ВИЧ-инфекции, так и состояний коинфекции ВИЧ и других вирусных инфекций. Одним их таких состояний является конфекция ВИЧ и вируса гепатита В.

Цель и задачи. Проанализировать показатели вирусной нагрузки и количества $CD4^+$ клеток в сыворотке крови у пациентов с моноинфекцией ВИЧ и с коинфекцией ВИЧ + ВГВ.

Результаты. На основании филогенетического анализа показано, что в обследованной группе преобладает ВГВ генотипа D, при этом наиболее высокая частота встречаемости у субгенотипа D1 (39,7%) по сравнению с субгенотипом D2 (29,5%) и D3 (30,6%).

В результате работы выявлено, что в группе пациентов с ВИЧ-инфекцией количество $CD4^+$ составило 329,08±31,277 клеток/мкл при CI: 267,78-390,08, $p < 0,0001$; вирусная нагрузка 184976,41±29718 копий/мл CI: 126730-243223, $p < 0,0001$. В группе пациентов с коинфекцией ВИЧ + ВГВ субгенотипа D1 244,67±45,701 $CD4^+$ клеток/мкл при CI: 150,73-338,6, $p = 0,0001$; вирусная нагрузка 189087,73±64897 копий/мл при CI: 52739-325436, $p = 0,0349$; в группе пациентов с ВИЧ + ВГВ D2 – 336,27±81,562 $CD4^+$ клеток/мкл при CI: 166,66-505,88, $p = 0,0005$; вирусная нагрузка 281544,86±157672 копий/мл при CI: 56662-619752, $p = 0,0086$; в группе пациентов с ВИЧ + ВГВ D3 – 227,47±56,296 $CD4^+$ клеток/мкл при CI: 109,20-345,75, $p = 0,0008$; вирусная нагрузка – 381575,44±315897 копий/мл при CI: 284966-1048117, $p = 0,001$.

Таким образом, достоверных различий по показателям вирусной нагрузки и $CD4^+$ клеток между группой пациентов с ВИЧ-инфекцией и пациентами с коинфекцией ВИЧ + ВГВ субгенотипа D1, D2 и D3 не выявлено.

Вывод. На основании полученных данных можно сделать вывод об отсутствии у пациентов с коинфекцией ВИЧ + ВГВ каких-либо особенностей представленных в работе иммунологических аспектов. В связи с этим невозможно выделить среди пациентов с ВИЧ лиц группу риска относительно инфицирования ВГВ. Необходимо проводить скрининг на наличие ВГВ у всех ВИЧ-инфицированных лиц.

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЭНДОГЕННОГО РЕТРОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА HERV-E λ 4-1 ПРИ АФФЕКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВАХ

Гольдина И.А.[1], Гольдин Б.Г.[2]

[1] Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия
[2] ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет», Новосибирск, Россия

Введение. Изменения в функционировании иммунной системы являются важным звеном этиологии, патопсихологии и патогенеза ряда психических расстройств. Высокая степень коморбидности с аутоиммунными, инфекционными и хроническими воспалительными заболеваниями, выявляемая у больных с психическими расстройствами, подтверждает гипотезу о наличии общих для данных патологических процессов иммуноопосредованных механизмов патогенеза. Среди этиологических факторов психических расстройств рассматриваются персистирующие инфекции, а также эндогенные ретровирусы (ЭР). Известно, что ЭР человека I класса HERV-E λ 4-1 ассоциирован с психическими заболеваниями – шизофренией и биполярным расстройством, а также рядом аутоиммунных заболеваний, причем частота и уровень его экспрессии в мононуклеарных клетках крови (МНК) больных коррелирует с активностью заболевания. Учитывая иммунотропные свойства HERV-E λ 4-1, а также вовлеченность иммунологических механизмов в патологический процесс при депрессии, **целью** настоящего ис-

следования явилось выявление ассоциации активации данного ЭР и аффективных расстройств – депрессии и депрессивного расстройства.

Материалы и методы. В исследование были включены 17 больных с установленным диагнозом аффективного расстройства в виде депрессии (F 32, МКБ – 10), 26 больных с депрессивными реакциями (F 43, МКБ – 10), а также 35 клинически здоровых лиц. Протокол исследования соответствовал этическим стандартам, и соответствовал Хельсинской Декларации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека». Экспрессию гена env ЭР человека HERV-E λ 4-1 определяли МНК. Выделение тотальной РНК проводили методом фенольной экстракции, фрагменты кДНК анализировали в 2% геле агарозы, положительными считали образцы с наличием в геле полосы кДНК, соответствующей ожидаемому размеру ампликона. Продукты амплификации стандартизировали относительно β-актина и визуализировали на денситометре Pharmacia – LKB. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ STATISTICA v.7.0 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение. У всех больных, включенных в исследование, были выявлены признаки аффективных расстройств в форме депрессивных реакций или депрессии. Экспрессия env ЭР HERV-E λ 4-1 обнаружена во всех исследуемых группах. При этом частота ее в группе условно здоровых доноров была незначительной (2,9%), что, возможно, связано с наличием у них персистирующих форм инфекций. Частота экспрессии env ЭР HERV-E λ 4-1 в группе больных с депрессивными реакциями составляла 7,7% и достоверно не превышала таковую у доноров, тогда как в группе больных депрессией данный параметр достигал 52% и значительно превышал значения в группе и условно здоровых лиц, и больных с депрессивными реакциями ($p < 0,05$, Fisher exact test, two-tailed). Следовательно, активация env ЭР HERV-E λ 4-1 в МНК больных аффективными расстройствами была ассоциирована с развитием депрессии. Учитывая, что депрессия в настоящее время представляется как полиэтиологическое иммуноопосредованное заболевание, а транскрипты ЭР человека HERV-E λ 4-1 идентифицированы в головном мозге больных психическими заболеваниями, и одним из механизмов реализации биологических эффектов ЭР является выработка протеинов, обладающих иммунотропными свойствами, активация HERV-E λ 4-1, выявленная нами у больных депрессией, может обусловливать изменения в иммунном статусе этих больных и обусловливает актуальность дальнейших исследований роли HERV-E λ 4-1 в этиопатогенезе депрессии, с целью выявления возможных диагностических маркеров данного заболевания и разработки новых патогенетически обоснованных стратегий терапевтической коррекции.

Заключение. В результате проведенного исследования была установлена различная частота экспрессии env HERV-E λ 4-1 в МНК и больных аффективными расстройствами в форме депрессивных реакций и депрессии. У больных депрессией данный показатель значительно превышал таковой больных с депрессивными реакциями и условно здоровых лиц, что свидетельствует об ассоциации депрессии с активацией ЭР HERV-E λ 4-1 в мононуклеарных клетках крови.

СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ ПОРТРЕТИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Коноплева М.В.[1], Соколова М.В.[1], Фельдшерова А.А.[1], Баженов А.И.[2], Суслов А.П.[1]

[1] ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[2] ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и, прежде всего, «а»–детерминанта HBsAg, является основным кластером антигенных детерминант, против которых вырабатываются протективные антитела (естественные или поствакцинальные). Кроме того, преимущественно именно к «а»–детерминанте HBsAg направлены антитела, используемые в диагностических тест-системах для выявления HBsAg. Мутации в S-гене вируса гепатита В и соответствующие аминокислотные замены способны критическим образом влиять на связывание антител с HBsAg, приводя к ускользанию вируса гепатита В от вакцинального и диагностического контроля.

Целью данной работы была серологическая характеристика рекомбинантных белков HBsAg дикого и мутантного типа для выявления степени их соответствия природным молекулам HBsAg.

Молекулы HBsAg изучали методами конкурентного анализа и серологического «портретирования» путем проведения сравнительного анализа реакций моноклональных анти-HBs конъюгатов и выявления дефектов связывания этих антител с антигенными детерминантами HBsAg. Кроме того, изучалось влияние восстановления и алкилирования на реактивность HBsAg различных типов.

Конкурентный анализ оказался информативным для изучения HBsAg «дикого» типа. Эти эксперименты позволили установить, что моноклональные конъюгаты, использованные в данной работе, конкурируют за одни и те же эпитопы «а»-детерминанты HBsAg «дикого» типа. В то же время такой подход оказался малоинформативным для изучения связывания моноклональных антител, имеющих дефекты по распознаванию мутантного HBsAg.

Проведенный анализ серологических «портретов» рекомбинантных мутантных HBsAg позволил установить существенные серологические различия природных и рекомбинантных форм мутантного HBsAg. Был обнаружен лишь один рекомбинантный антиген с мутацией G145R с «портретом», максимально приближенным к «портрету» природного аналога.

Таким образом, методику серологического «портретирования» можно использовать при отборе рекомбинантных мутантных HBs-антигенов с целью создания контрольных панелей, предназначенных для оценки качества диагностических тест-систем, а также для разработки вакцин против гепатита В.

ИЗМЕНЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ КОИНФЕКЦИИ ВИЧ И *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Кудрявцев И.В.[1, 2], Васильева Е.В.[4, 5], Максимов Г.В.[3], Вербов В.Н.[4], Серебрякова М.К.[2], Тотолян Арег А.[1, 4]

[1] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[3] СПбГУЗ «Городской противотуберкулезный диспансер», Санкт-Петербург, Россия
[4] ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[5] Bostongene, Москва

ВИЧ-инфекция традиционно ассоциируется с уменьшением как относительного, так и абсолютного содержания общего пула $CD4^+$ лимфоцитов в периферической крови. Однако изменения в составе Т-хелперов, обладающих широким спектром регуляторных функций, оказывают влияние на эффективность реакций врожденного и приобретенного иммунитета в целом, в том числе и цитотоксических Т-клеток, играющих ведущую роль в защите от внутриклеточных патогенов. **Целью** данной работы был анализ субпопуляционного состава и оценка уровня дифференцировки $CD3^+CD8^+$ клеток, а также поиск новых перспективных маркеров, позволяющих отличить больных с ВИЧ от больных с коинфекцией ВИЧ-ТБ в условиях клинико-диагностической лаборатории. Объектом исследования служила венозная кровь, полученная от условно здоровых добровольцев (n = 37) и больных трех указанных групп. Для исследования особенностей дифференцировки цитотоксических Т-клеток у больных ВИЧ (n = 23), ТБ (n = 28) и при коинфекции ВИЧ-ТБ (n = 30) была использована тактика поэтапного «гейтирования», основанная на первоначальной оценке экспрессии CD45RA и CD62L с последующим анализом ко-экспрессии CD27 и CD28 клетками с фенотипами $CD45RA^-CD62L^-$ (клетки эффекторной памяти, EM) и $CD45RA^+CD62L^-$ («терминально-дифференцированных» клетки эффекторной памяти, экспрессирующие CD45RA, TEMRA). Было определено относительное и абсолютное содержания $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов с фенотипами $CD45RA^+CD62L^+$ («наивные» клетки), $CD45RA^+CD62L^-$,клеток эффекторной памяти и их основных субпопуляций (EM1, EM2, EM3 и EM4), а также клеток TEMRA, котрые подразделялись на «пре-эффекторы» 1 типа (pE1), «пре-эффекторы» 2 типа (pE2) и эффекторные (E) клетки. На всех упомянутых выше типах цитотоксических Т-клеток определяли уровень молекулы CD57, уровень экспрессии которой тесно связан с накоплением перфорина и гранзима B в составе цитолитических гранул. Относительное и абсолютное содержание $CD3^+CD8^+$ у здоровых доноров и больных ТБ не отличались, тогда как наличие ВИЧ приводило к увеличению данных показателей в два и полтора раза соответственно (в обоих случаях $p < 0,001$). В случае коинфекции относительное содержания $CD3^+CD8^+$ превосходило все указанные группы и достигало 60,94% (45,88; 72,03), а абсолютное содержание – 890 (538; 1159) кл/1 мкл. Столь же существенные изменения касались и субпопуляционного состава $CD3^+CD8^+$ клеток. Так, наличие ВИЧ приводило к резкому снижению числа «наивных» клеток и увеличению в циркуляции субпопуляций более «зрелых» фенотипов – EM и TEMRA. При сопоставлении групп больных только ВИЧ-инфекцией и на фоне туберкулеза, наиболее информативным являлся анализ субпопуляционного состава клеток EM. Так, относительное содержание клеток EM3 ($CD45RA^-CD62L^-CD27^-CD28^-$) при ВИЧ-инфекции составляло 5,66% (3,63; 7,84) или 82 (46; 102) клеток в 1 мкл крови, а при коинфекции ВИЧ-ТБ эти значения составили 12,05% (8,48; 23,17) и 180 (90,65; 294) кл/мкл соответственно ($p < 0,001$ в обоих случаях). При анализе групп сравнения – условно здоровые добровольцы и больные ТБ – эти значения были значимо ниже (2,11% (0,75; 3,95) и 42 (14; 76) кл/мкл, а также 3,06% (1,68; 5,69) и 47 (24; 100) кл/мкл соответственно). Более того, отмечено снижение относительного числа EM3 клеток, экспрессирующих CD57, в исследованных группах. Так, у здоровых добровольцев и больных ТБ CD57 обнаруживался на поверхности 79,83% (71,05; 88,20) и 76,75% (66,55; 83,64) клеток, соответственно, тогда как при ВИЧ-инфекции – лишь на 62,26% (51,30; 72,71) клеток, а при ВИЧ-ТБ – на 52,43% (34,73; 63,02) клеток. Полученные результаты позволяют предположить, что на основании анализа уровня дифференцировки $CD3^+CD8^+$ клеток при помощи многоцветной проточной цитометрии возможно разработать новые перспективные способы мониторинга течения ВИЧ и ТБ.

ИЗУЧЕНИЕ ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА CCR5 У ПОПУЛЯЦИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

Любимова Н.Е.[1], Семёнов А.В.[1, 2]

[1] ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Ген хемокинового рецептора CCR5 локализован на коротком плече 3 хромосомы. Лиганды CCR5, такие как хемокины CCL3, CCL4, CCL5 и CCL8, играют главную роль в хемотаксисе и активации лимфоцитов во вторичных лимфоидных органах. Аллель delta32 гена CCR5 представляет собой делецию 32 пар оснований этого гена. Эта мутация приводит к нарушению адгезивных свойств кодируемого ею белка CCR5 Т-лифоцитов.

Гомозиготы по делеции CCR5del32 резистентны к некоторым заболеваниям, например к ВИЧ. Аллель CCR5del32 преимущественно распространён в европейских популяциях, тогда как частота аллеля в большинстве азиатских популяциях ниже 3-5%. Этот аллель практически полностью отсутствует в аборигенных популяциях Америки и Океании. Его частота самая высокая в Северной Европе, в областях, прилегающих к Балтийскому и Белому морям (15-18%).

Определение пациентов с аллелью CCR5del32 важно для прогноза течения ВИЧ-инфекции у инфицированных пациентов, а также для оценки риска передачи ВИЧ в дискордантных парах, где только один из партнеров инфицирован.

Цель. Изучение частоты встречаемости аллелей CCR5del32 в Санкт-Петербурге.

Методы. Обследовали группу, состоящую из 423 условно здоровых доноров возрастом от 0 до 95 лет, про-

живающих в Санкт-Петербурге. Из образцов крови или буккального эпителия с помощью коммерческих наборов (Интерлабсервис, РФ) выделяли геномную ДНК. Генотип CCR5 определяли методом пиросеквенирования на пиросеквенаторе PyroMark Q24 (Qiagen), используя коммерческие наборы (Интерлабсервис, РФ), по рекомендации фирмы-производителя.

Результаты. Не было выявлено достоверного влияния пола и возраста на частоту распределения изучаемых аллелей. Распределение частот генотипов в исследуемой популяции не отличается от распределения Харди–Вайнберга. У 346 человек выявили генотип дикого типа. 72 человека были гетерозиготами по делеции изучаемого гена. В обследуемой популяции выявлено пять человек, являющимися гомозиготами по делеции. Таким образом, частота генотипа CCR5 дикого типа составляла 81,8% (346/423), гетерозигот по делеции – 17,0% (72/423), гомозигот CCR5del32/CCR5del32 – 1,2% (5/423). Частота аллеля дикого типа была 0,9, делеции – 0,1.

Заключение. Полученные результаты по частоте аллелей CCR5del32 совпадают с частотой аллелей в северной Европе и Северо-Запада РФ, где частота этих аллелей одна из самых высоких в мире. Высокая частота встречаемости аллели CCR5del32 делает обоснованным скрининг ВИЧ-инфицированных и группу риска по ВИЧ-инфекции.

ОЦЕНКА ГЕМОПОЭЗА У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Меледина И.В., Старостина Н.М., Шипунов М.В., Меняева Е.В., Филимонов П.Н., Черных Е.Р., Шевела Е.Я.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Введение. При исследовании периферической крови у 80-88% больных циррозом печени (ЦП) регистрируется цитопенический синдром, степень выраженность которого не всегда коррелирует со спленомегалией, тяжестью заболевания, проведением противовирусной терапии (ПВТ). Цитопения имеет клиническое значение при развитии осложнений ЦП, а также ограничивает возможность проведения ПВТ. Кроме того, учитывая возможность использования аутологичных мононуклеарных и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в терапии больных ЦП, представляется актуальной оценка костномозгового кроветворения у этой группы пациентов.

Цель и задачи. Оценка особенностей гемопоэтического плацдарма и развития линий клеточных элементов крови у больных ЦП различной этиологии.

Материалы и методы. Исследование клеточного состава костного мозга и периферической крови проведено у 19 пациентов (средний возраст 45,8±10,6 лет) с подтвержденным ранее диагнозом ЦП различного генеза: как исход вирусного гепатита (n = 11), токсического гепатита (n = 6), первичного билиарного цирроза (ПБЦ) и аутоиммунного гепатита (АИГ) (n = 2). Пациентам выполнялась трепанобиопсия подвздошной кости с последующим патогистологическим и цитологическим исследованием биоптата. Статистическую обработку проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows.

Результаты. Цитопенический синдром был диагностирован у 97.4% пациентов исследуемой группы. При патогистологической оценке трепанобиоптата подвздошной кости нарушение соотношения гемопоэтической и жировой ткани было зарегистрировано у 66,7% пациентов.

Наиболее выраженные изменения гемопоэза выявлены у пациентов с ЦП вирусной этиологии. Так, при оценке гранулоцитарного ряда, у 90,9% пациентов этой группы снижено количество промиелоцитов, у 63% – сегментоядерных нейтрофилов. У 36,4% регистрируется увеличение количества плазматических клеток. Количество мегакариоцитов снижено у 54,5% пациентов, преобладают мелкие формы. В группе больных ЦП вирусной этиологии эритроидный ряд гиперплазирован у 63,6% пациентов, снижение количества эритробластов и пронормоцитов регистрируется у 100 и 45,5% соответственно, более зрелые формы – нормоциты – представлены в нормальном количестве. У 64% пациентов снижен индекс созревания эритробластов.

В группе пациентов с ЦП токсической этиологии наблюдается преимущественно супрессия кроветворения – в 100% случаев был выявлен миелофиброз 1 ст, у 66,7% (n = 4) – гипоплазия эритроидного ростка за счет снижения количества эритробластов, при оценке гранулоцитарного ряда регистрируется снижение количества промиелоцитов (100%) и миелоцитов (66,7%), количество мегакариоцитов снижено у 83,3% пациентов.

У пациентов с аутоиммунным генезом ЦП (ПБЦ и АИГ) имеется реактивная гиперплазия эритроидного ростка, особенностью мегакариоцитарного ростка является преобладание мелких гипосегментированных форм, у 1 пациента зарегистрирован миелофиброз 1 степени, также у 1 пациента – гиперплазия плазматического ряда, ассоциированная с увеличением количества В-лимфоцитов периферической крови и гиперпродукцией IgG.

Заключение. Таким образом, у больных циррозом печени с высокой частотой регистрируются изменения костномозгового кроветворения, имеющие особенности в зависимости от этиологии заболевания печени, в связи с чем для рациональной коррекции гемопоэза могут требоваться различные подходы. В развитии нарушений костномозгового кроветворения обсуждается роль активной вирусной инфекции, резервуаром которой являются в т.ч. мононуклеарные и полиморфноядерные клетки периферической крови и костного мозга, опосредованной Т-лимфоцитами миелосупрессии, аутоиммунных реакций, влияния цитокинов (IFNγ, TNFα, хемокинов MIP 1 α/β, CXCL-10, CXCL-3, BCA-1). Представляется целесообразным дальнейшее уточнение генеза нарушений гемопоэза и оценка их влияния на структурные и функциональные характеристики гемопоэтических стволовых клеток.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО РИСКА НА СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА БОЛЬНЫХ ХГС ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Никитин В.Ю., Сухина И.А., Яременко М.В., Жданов К.В., Иванов А.М., Никитин Ю.В., Ширина И.В., Козлов К.В., Жанарстанова Г.А.

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

Введение. В настоящее время активно изучается взаимосвязь хронического гепатита С (ХГС) и метаболического синдрома. Коморбидные заболевания, такие как ожирение, сахарный диабет, гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца (ИБС), часто сопровождающие ХГС являются предикторами метаболического

синдрома. Эти факторы метаболического риска могут влиять на его течение и ответ на противовирусную терапию (ПВТ).

Цель и задачи. Целью данного исследования явилось изучение влияния факторов метаболического риска на состояние иммунитета больных ХГС при проведении ПВТ и достижения устойчивого вирусологического ответа (УВО).

Материалы и методы. Проведено первичное иммунологическое обследование периферической крови (ПК) 73 больных ХГС, как с метаболическими факторами риска, так и без них. В динамике через 24 недели после противовирусной терапии (ПВТ) пегилированным интерфероном-α и рибавирином иммунологическое обследование было проведено повторно у 25 больных с ХГС, из них у 7 больных не был достигнут УВО. Иммунологическое обследование включало определение содержания субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG и циркулирующих иммунных комплексов высокомолекулярных (ЦИК выс.), среднемолекулярных (ЦИК сред.) и низкомолекулярных (ЦИК низ.). Иммунофенотипирование лимфоцитов ПК осуществляли на проточном цитометре Cytomics FC500 (фирма Beckman Coulter, США) с использованием 4-х цветных комбинаций прямых моноклональных антител той же фирмы: CD19/CD5/CD27/CD45, CD4/CD8/CD3/CD45, CD16/CD56/CD3/CD45, CD3/CD25/HLA-DR/CD45, CD4/CD127/CD25/CD45, CD8/CD38/CD3/CD45. Определение концентраций IgA, IgM, IgG в сыворотке крови проводили турбидимитрическим методом на полуавтоматическом анализаторе BTS-350 фирмы BioSystems с помощью наборов той же фирмы, уровней ЦИК – методом, предложенным Ю.А. Гриневичем и А.Н. Алферовым (1981). Средние значения исследуемых показателей представлены медианой (Me).

Результаты. Иммунологическое обследование показало, что относительное содержание TNK-клеток ($CD3^+CD16^+CD56^+$) (до ПВТ 5,85%; УВО 4,45%), NK-клеток ($CD3^-CD56^+$) (до ПВТ 7,30%; УВО 5,30%), NK-клеток цитолитических ($CD3^-CD16^{+/high}CD56^{dim}$) (до ПВТ 8,00%; УВО 5,95%), достоверно снижалось ($p < 0,05$) у больных ХГС с метаболическими факторами риска, достигших УВО, в отличие от его отсутствия. Снижение активированных NK-лимфоцитов ($CD3^-CD8^{dim}CD38^+$) было зафиксировано у больных после ПВТ, как достигших (до ПВТ 24,80%; УВО 14,00%), так и не достигших УВО (до ПВТ 24,80%; без УВО 15,05%). В то же время у этой категории больных в ПК статистически значимо повышалось ($p < 0,05$) содержание активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$), как при достижении УВО (до ПВТ 0,08%; УВО 0,25%), так и при его отсутствии (до ПВТ 0,08%; без УВО 0,21%). Уровни этих показателей у больных ХГС без метаболических факторов риска, как достигших, так и не достигших УВО, не имели значимых различий, что может свидетельствовать о влиянии метаболических факторов риска на функциональность TNK- и NK-клеток при ХГС. Количество В-клеток $CD19^+$ у больных с метаболическими факторами риска повышалось у больных не достигших УВО (до ПВТ 12,4%; без УВО 20,9%), тогда как при достижении УВО их количество практически не изменялось (до ПВТ 12,4%; без УВО 13,65%). В то же время выявлено статистически значимое снижение сред. ЦИК у больных ХГС без метаболических факторов риска достигших УВО (до ПВТ 187%; УВО 114%) по сравнению с теми, у кого произошел рецидив заболевания (до ПВТ 187%; УВО 194%). Уровень ЦИК низ. достоверно снижался у больных с УВО в обеих группах (с и без метаболических факторов риска) (до ПВТ 699%; УВО 367%) и (до ПВТ 799%; УВО 398%) соответственно. У больных, не достигших УВО ЦИК низ., также имели тенденцию к снижению, но статистически значимых отличий не было получено. Исследование содержания IgA, IgM, IgG не показало какой-либо взаимосвязи с метаболическими факторами риска и вирусологическим ответом.

Заключение. Исследования показали, что метаболические факторы риска влияют на состояние иммунитета больных при ХГС. У пациентов с ХГС и метаболическими факторами риска при достижении УВО после ПВТ снижается количество Т- и NK-киллерных клеток, тогда как при отсутствии УВО увеличивается содержание В-клеток. Таким образом, у больных ХГС с метаболическими факторами риска снижение содержания популяций истинных киллеров и Т-киллеров во время терапии можно считать благоприятным признаком, а повышение числа В-клеток неблагоприятным.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПИЛОТНОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕНДРИТНО-КЛЕТОЧНЫХ ВАКЦИН В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ HCV-ИНФЕКЦИИ

Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Курочкина Ю.Д., Останин А.А., Старостина Н.М.

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

Введение. Многочисленными исследованиями показано, что ключевую роль в патогенезе и исходе инфекции, обусловленной вирусом гепатита С (HCV), играют антиген-специфические $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клетки. Развитие сильного устойчивого и мультиэпитопного Т-клеточного ответа приводит к элиминации вируса, тогда как несостоятельность адаптивного Т-клеточного ответа ассоциируется с персистенцией вируса. Дендритные клетки являются профессиональными антиген-презентирующими клетками, которые играют доминирующую роль в примировании Т-клеток и поддержании сильного Т-клеточного ответа.

Цель и задачи. Изучение безопасности ДК, нагруженных рекомбинантными белками Core (1-120) и NS3 (1192-1457) HCV генотипа 1b, и способности ДК-вакцин индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ.

Материалы и методы. В исследование были включены 10 пациентов с хроническим гепатитом С 1-го генотипа с вирусной нагрузкой – РНК ≥ 104 МЕ/мл, без трансформации в цирроз. Иммунотерапия проводилась в виде инициирующего (4 вакцинации с кратностью 1 раз в неделю) и поддерживающего (4-6 вакцинаций с кратностью 1 раз в месяц) курсов. Обследование пациентов проводилось до начала терапии, после 1-го, 2-го курса и последующего 6-месячного наблюдения. IFN-ДК получали путем культивирования прилипающей фракции мононуклкеарных клеток (МНК) больных ХГС в присутствии ГМ-КСФ и IFNα с последующей часовой нагрузкой вирусными антигенами. Специфический пролиферативный Т-клеточный ответ на вирусные антигены оценивали радиометрически по включению Н3 тимидина. Th1 и Th2 Т-клеточный ответ оценивали по продукции цитокинов IFNγ и IL-4 в антиген-стимулированных культурах Т-клеток.

Результаты. Установлено, что иммунотерапия аутологичными ДК, нагруженными рекомбинантными вирусными антигенами, характеризуется хорошей переносимостью, не вызывает тяжелых поствакцинальных реакций. Вакцинотерапия сопровождается возрастанием пролиферативного ответа мононуклеарных клеток на вирусные антигены, в большей степени на Core, индукцией антиген-специфических Th1-клеток (с пиком ответа после 2-го курса вакцинаций), и не приводит к генерации регуляторных $CD4^+CD25^+CD127^-$ Т-клеток. Несмотря на отсутствие устойчивого вирусологического ответа, было показано, что пролиферативный ответ МНК на вирусные антигены после 1-го курса вакцинотерапии обратно коррелирует с вирусной нагрузкой. Полученные данные свидетельствуют о том, что ДК, нагруженные HCV Core (1-120) и NS3 (1192-1457) рекомбинантными белками, способны стимулировать антигенспецифический Т-клеточный ответ и могут рассматриваться в качестве адьювантной иммунотерапии в комбинированном лечении больных хроническим гепатитом С.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о безопасности иммунотерапии IFN-ДК, нагруженными рекомбинантными вирусными антигенами, и позволяют рассматривать данный подход в качестве дополнения к терапии пегилированными интерферонами и рибавирином для улучшения результатов лечения.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ОККУЛЬТНОГО ГЕПАТИТА В У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАНЫХ ПАЦИЕНТОВ

Останкова Ю.В.[1], Семенов А.В.[1,2], Тотолян Арег А.[1,2]

[1] ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. По данным ООН количество инфицированных вирусом иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ) в мире составляет свыше 35 миллионов человек, количество инфицированных вирусом гепатита С (ВГС) составляет почти 3% от населения земного шара, у 70-80% которых развивается хронический вирусный гепатит С, вирусом гепатита В (ВГВ) заражены почти 2 млрд человек, из которых у 240 млн развивается хроническая форма. Общность механизмов заражения ВГВ, ВГС и ВИЧ-инфекцией способствует повышению вероятности сочетания этих инфекций у пациентов, а чем больше группа людей подвержена действию основных факторов риска в отношении ВГВ и других парентеральных инфекций, тем более высокий уровень носительства HBsAg она будет демонстрировать. Исходя из вышесказанного, логично было бы предполагать высокую частоту встречаемости ВГВ у ВИЧ-инфицированных пациентов. Однако ХВГВ выявляют примерно у 10%, а ХВГС у 25% ВИЧ-инфицированных. Такое противоречие ожидаемого и диагностируемого уровней распространенности ВГВ у ВИЧ-инфицированных пациентов может объясняться использованием для диагностики ВГВ преимущественно серологических методов (главным образом HBsAg), в то время как известно, что ВИЧ способен подавлять репликацию ВГВ, что приводит к распространенности оккультной формы ХВГВ (окГВ), а иммуносупрессия, вызванная ВИЧ-инфекцией, может приводить к низкой реакции антител на HBsAg, а также реактивации ВГВ.

Цель. Проанализировать распространенность генотипов оккультного гепатита В у HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологически неэффективной антиретровирусной терапией (АРВТ).

Материалы и методы. В работе использованы образцы плазмы крови 264 HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов из СЗФО с вирусологической неэффективностью АРВТ (вирусная нагрузка > 50 МЕ/мл после 6 месяцев АРВТ или повышение вирусной нагрузки после первичного подавления репликации вируса). Выявление ДНК ВГВ проводили с помощью разработанного метода «гнездовой» ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих рекомендованный для гено- и субтипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S протяженностью 1169 п.о., и в дальнейшем проводили прямое секвенирование фрагмента. Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 5, используя алгоритм ClustalW.

Результаты. При использовании предложенного нами метода выявления ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке ВГВ был обнаружен у 33,7% пациентов. На основании филогенетического анализа 89 изолятов показано, что в обследованной группе представлен преимущественно ВГВ генотипа D и только один пациент с ВГВ генотипа С, преобладает ВГВ субгенотипа D1 (39,3%) по сравнению с субгенотипами D2 (29,2%), D3 (30,4%) и C1 (1,1%). Внутригрупповой процент нуклеотидной идентичности среди пациентов с ВГВ субгенотипов D1, D2 и D3 составил 98,6%±0,6%, 98,9%±0,4% и 98,1%±0,4% соответственно. На филогенетическом древе выделяются несколько тесных кластеров, изоляты которых получены преимущественно (83,3%) от мужчин, более чем для половины из которых в анамнестических данных указана принадлежность к активным или бывшим ПИН. Так, среди пациентов с ВГВ D1 выявлен кластер, внутри которого средняя эволюционная p-дистанция составила 0,0025±0,001, среди пациентов с ВГВ D2 кластер со средней p-дистанцией 0,0013±0,0009, среди пациентов с ВГВ D3 кластер со средней p-дистанцией 0,004±0,001, что указывает на единый источник происхождения вирусов в каждом из этих случаев. Таким образом, становится очевидным, что главную роль в кластеризации играет не столько географическая общность, сколько пути передачи инфекции. Дополнительным подтверждением этого предположения является высокая встречаемость в группе ВГВ D3, ассоциированного с парентеральным инфицированием среди ПИН, при этом четко разделяющегося на специфический кластер близкородственных изолятов и последовательности ВГВ, находящиеся на различных филогенетических отростках, не имеющих близкого генетического родства.

Заключение. По всей видимости, среди ВИЧ-инфицированных лиц ВГВ распространяется не за счет значимых эпидемиологических сетей с конкретными единичными прародителями, а преимущественно независимыми путями посредством гетеросексуальных контактов, исключая отдельные случаи, явно связанные с парентеральным инфицированием у ПИН.

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

ОНКОИММУНОЛОГИЯ И ГЕМОБЛАСТОЗЫ

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ЭКСПРЕССИЕЙ РЕЦЕПТОРА NKG2D НА ЛИМФОЦИТАХ И ЕГО ЛИГАНДАМИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА И КИШЕЧНИКА

Абакушина Е.В., Пасова И.А., Неприна Г.С., Каприн А.Д.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Обнинск, Россия

На современном этапе развития онкологии важной задачей является поиск дополнительных диагностических маркеров и точек приложения для биотерапии опухолей. В настоящее время эффект ускользания опухоли от иммунного надзора изучен не полностью, но некоторые механизмы этого феномена уже достаточно хорошо известны. Одним из таких механизмов является феномен сбрасывания значимых опухоле-ассоциированных молекул с поверхности трансформированных клеток, например, стресс-индуцированных молекул MICA, которые должны распознаваться цитотоксическими лимфоцитами через NKG2D и уничтожаться. В данном случае лиганд рецепторное взаимодействие имеет важное значение.

Цель. Выявление взаимосвязи между уровнем MICA в сыворотке крови онкологических больных с различным распространением процесса и экспрессией рецептора NKG2D на лимфоцитах.

Материалы и методы. В работе использовали периферическую кровь 60 первичных больных с гистологически подтвержденным диагнозом: I группа – рак желудка ($T_{1-4}N_{0-3}M_{0-1}$) – 21 человек и II группа – рак кишечника ($T_{2-4}N_{0-2}M_{0-1}$) – 39 человек. Метастазирование процесса было обнаружено у 8 (13,3%) больных раком желудка и 19 (31,7%) больных раком кишечника. Контрольную группу составили 20 условно здоровых добровольцев.

Содержание растворимых форм молекул sMICA в сыворотке крови при помощи ИФА (Abcam, США) по инструкции. Субпопуляционный состав Т-, NK- и NKT-лимфоцитов периферической крови и маркера активации NKG2D на Т- и NK-клетках оценивали на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США) с использованием меченых антител анти CD45-PE, CD3-PC5.5, CD16/56-FITC (Beckman Coulter, Франция). Анализировали не менее 5000 событий в секторе живых клеток. Экспрессию NKG2D (CD314-PE) (eBioScience, США) анализировали на поверхности $CD56^+$ и $CD3^+$ лимфоцитов.

Результаты. У большинства больных раком желудка и кишечника уровень sMICA в 4,6 раз превышает контрольные значения, что может служить одним из диагностических маркеров ($p < 0.05$). Содержание NK-клеток в обобщенной группе больных при раке желудка и кишечника почти в 3 раза превышает референсные значения. Также в обеих группах наблюдается значимое увеличение экспрессии активирующего рецептора NKG2D на лимфоцитах и NK-клетках – с 9,1% до 19,7%. При этом экспрессия NKG2D была повышена в большей степени у больных раком желудка (в 2,6 раза). У больных раком кишечника значимо снижено содержание NKT-лимфоцитов с 2,9±2,1% до 1,8±1,7% ($P = 0,03$) по сравнению с группой больных раком желудка.

Также нами были проанализированы результаты фенотипирования лимфоцитов у больных с наличием метастазов и без них. При раке желудка с метастазами значимо повышено количество NK-клеток и экспрессия рецептора NKG2D на лимфоцитах и NK-клетках. В группе больных раком кишечника с метастазами также наблюдалось увеличение доли NK-клеток и $CD314^+$NK-клеток, но отличия от группы без метастазов были не достоверны. Среднее содержание активирующего рецептора NKG2D у пациентов обеих групп составило более 50%, что выше чем в контрольной группе. Выявилось достоверное увеличение $CD8^+$Т-лимфоцитов у больных раком желудка с распространенным процессом до 32,8±9,8% по сравнению с подгруппой без метастазов – 27,1±17,9% ($P = 0,047$). При раке кишечника с метастазированием содержание NKT-лимфоцитов снижено ($P = 0,03$). Показано, что CD314 экспрессируется на более чем 87% NK-клеток как у пациентов с раком желудка, так и у пациентов с раком кишечника, что выше, чем у здоровых доноров.

Таким образом, повышение сывороточного уровня sMICA в группах больных раком желудка и раком толстого кишечника сопровождалось ростом доли NK-клеток и увеличением поверхностной экспрессии NKG2D в популяции лимфоцитов у этих больных. При анализе субпопуляции Т-лимфоцитов было показано, что доля $NKG2D^+$Т-клеток достоверно снижена в обобщенной группе больных за счет вклада низких показателей больных раком желудка. Таким образом, растворимые молекулы MICA в большей степени оказывают негативное влияние на экспрессию NKG2D на Т-клетках, чем на NK-клетках.

Заключение. В работе обнаружена взаимосвязь между уровнем лигандов стресс-индуцированных молекул MICA и экспрессией NKG2D на лимфоцитах крови у больных раком желудка и кишечника. Показано, что с повышением уровня sMICA у больных раком желудка увеличивается количество циркулирующих NK-клеток, а при раке

кишечника наоборот уменьшается что, вероятно, связано с различным механизмом иммунного ответа и патогенезом данных злокачественных новообразований. Также можно сделать вывод о том, что высокий уровень иммунорегуляторных молекул MICA, лигандов NKG2D и увеличение их концентрации в сыворотке крови при метастазировании, а также повышение процента цитотоксических лимфоцитов и $NKG2D^{+}$NK-клеток, у большинства больных ЗНАО может служить фактором неблагоприятного прогноза.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00105) и гранта Президента НШ-9069.2016.4.

ОПЫТ ПРОВЕДЕНИЯ АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ ЛИМФОЦИТАМИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Абакушина Е.В.[1], Пасова И.А.[1], Козлов И.Г.[2,3], Каприн А.Д.[4]

[1] Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Обнинск, Россия
[2] ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологиим. Д. Рогачева, Москва, Россия
[3] ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет» им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия
[4] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Обнинск, Россия

Как известно, методы иммунотерапии, основанные на стимуляции лимфоцитов опухолевым антигеном, цитокинами, индукторами пролиферации и дифференцировки или сочетанием данных воздействий достаточно известны и хорошо себя зарекомендовали при лечении различных злокачественных новообразований. В данной работе представлен опыт применения адоптивной иммунотерапии (АИТ) аутологичными активированными цитотоксическими лимфоцитами у различных онкологических больных после комплексного лечения.

Цель. Оценка переносимости и эффективности АИТ у онкологических больных на различных этапах противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. АИТ была проведена 82 онкологическим больным обоего пола с морфологически подтвержденным диагнозом, подписавшим информированное согласие (табл.).

Для получения большого количества активированных лимфоцитов выделенные из периферической крови больного мононуклеарные клетки культивировали на протяжение 10-14 дней в питательной среде с добавлением IL-2 и IL-15 в CO_2 инкубаторе во влажной атмосфере при 37 °C. Введение клеток в количестве от 2 до 20 млн проводили каждые 2-3 дня. Далее АИТ продолжали клеточным продуктом по индивидуальной схеме. Исследование было одобрено этическим комитетом МРНЦ им. А.Ф. Цыба.

Результаты. В работе клинически доказана эффективность применения АИТ с использованием активированных аутологичных лимфоцитов среди которых доля NK-клеток составляла от 30 до 98%, а цитотоксических лимфоцитов более 70%. Побочных явлений выявлено не было. Появлении реактивных лимфоузлов является отражением процесса активации лимфоцитов *in vivo* во вторичных лимфоидных органах. Результаты исследования показали объективный ответ на терапию у больных меланомой в 9,8% случаев, стабилизацию болезни у большей части пациентов в 58,8% случаев. У больных с ОЖКТ в 42,9% наблюдалась стабилизация процесса. У одной пациентки был зафиксирован частичный ответ. У больных раком легкого, РМЖ и РЛ диагностирована стабилизация процесса в 70% случаев. Таким образом, среди 82 онкологических больных объективный эффект достигнут у 7,3% больных, а стабилизация процесса зафиксирована более чем у половины испытуемых в 56,1% случаев. У пациентов без объективного ответа на АИТ отмечено увеличение продолжительности безрецидивного периода, контроль над опухолью достигнут у 46 пациентов (56,1%). Большинство больных отмечали уменьшение побочных эффектов от химиотерапии, которые ранее проявлялись наличием диспепсии, тошноты, рвоты, нарушением дефекации, депрессией и упадком сил.

Заключение. АИТ активированными аутологичными цитотоксическими лимфоцитами является безопасным методом лечения. Проведение АИТ у онкологических больных с неблагоприятным прогнозом наиболее эффективна при минимальном объеме опухолевой массы и при продолжительном (более 2-х месяцев) и непрерывном лечении без длительных перерывов в курсах АИТ. Положительные отзывы пациентов дают основание полагать, что АИТ активированными лимфоцитами может применяться для улучшения качества жизни онкологических больных.

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ АБАКУШИНОЙ Е.В. И ДР.)

Нозология/ характеристика	Группа I	Группа II	Группа III			Всего
	Меланома	Опухоли ЖКТ	Рак молочной железы	Рак почки	Рак легкого	
Количество пациентов, чел. (%)	51 (62,2)	21 (25,6)	5 (6,1)	4 (4,9)	1 (1,2)	82 (100)
Средний возраст (интервал), лет	52±13 (26-82)	54±13 (25-79)	54±15 (36-79)	57±8 (48-66)	60	56±12 (26-82)
Наличие метастазов, чел. (%)	43 (84,3)	15 (71,4)	3 (60)	4 (100)	1 (100)	63 (75,9)
Количество курсов АИТ	107	40	12	5	3	170
Время наблюдения (интервал), мес.	11,8 (1-33)	13,9 (4-37)	12,7 (2-30)	21,5 (6-28)	12	14,4 (1-37)

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00105) и гранта Президента НШ-9069.2016.4.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Авдеева Ж.И.[1], Солдатов А.А.[1], Киселевский М.В.[2], Бондарев В.П.[1], Меркулов В.А.

[1] ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Онкологические заболевания в большинстве промышленно развитых стран занимают второе место по причинам летального исхода вслед за сердечно-сосудистыми заболеваниями. Несмотря на значительные успехи клинической онкологии, многие вопросы лекарственной терапии остаются нерешенными. Используемые для химиотерапии препараты подавляют пролиферацию всех быстро делящихся клеток. В отличие от них препараты таргентной терапии воздействуют на конкретные молекулы, задействованные в механизмах канцерогенеза и роста опухолей. Для таргентной терапии в основном используются биотерапевтические препараты с иммунотропной направленностью действия. Эффективность таких препаратов обеспечивается за счет формирования и стимуляции противоопухолевого иммунитета или за счет направленного действия, вызывающего подавление роста, гибель опухолевых клеток или нарушение васкуляризации опухолевой ткани. Современные достижения биотехнологии позволили разрабатывать лекарственные препараты моноклональных антител (МкАТ), обладающих направленным действием на опухолевые клетки, ростовые факторы или стимулирующих противоопухолевый иммунитет. При разработке препарата МкАТ с противоопухолевой активностью, прежде всего, проводят исследования по определению антигена (АГ), локализованного на поверхности опухолевой клетки, либо рецепторов, участвующих в передаче активационных сигналов. При этом следует учитывать следующее – АГ должен экспрессироваться преимущественно на опухолевых клетках, принимать важное участие в развитии опухоли и быть представленным на клетках наиболее часто встречающихся опухолей. Основные трудности при разработке противоопухолевых препаратов МкАТ связаны с гетерогенностью опухолевых АГ, «нежелательной» иммуногенностью МкАТ и способностью опухолей включать механизмы «ускользания» от противоопухолевого иммунитета. Вследствие генетической нестабильности в клетках опухолевой ткани происходят частые мутации, что сопровождается изменением поверхностных АГ и уровнем их экспрессии, в связи с этим препараты МкАТ могут терять клиническую эффективность. Для снижения «нежелательной» иммуногенности с целью повышения эффективности и снижения безопасности разрабатывают препараты МкАТ, структура которых приближена или полностью соответствует структуре иммуноглобулина (Ig) человека. Однако даже в этом случае нельзя в полной мере прогнозировать проявление иммуногенности МкАТ при клиническом применении. За счет продукции метаболитов, иммуносупрессирующих цитокинов, хемокинов опухолевые клетки, а также клетки микроокружения опухоли способны блокировать развитие иммунного ответа на любом из его этапов, обеспечивая иммунотолерантность опухолей. Одним из механизмом, обеспечивающих недоступность клеток опухоли для воздействия цитотоксических Т-Лф, является потеря экспрессии молекул ГКГ, участвующих в формировании комплекса с опухолевым АГ, распознаваемым Т-Лф. Отсутствие экспрессии молекул ГКГ чаще наблюдается на клетках наиболее злокачественных опухолей. Опухолевые клетки могут экспрессировать молекулы Fas лиганда (известного как «фактор смерти») и вызывать ответный апоптоз иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих Fas молекулы, в частности, цитотоксических Т-Лф, нормальных киллеров и ДК. Клетки опухоли способны продуцировать вещества, подавляющие функциональную активность ДК, направлять дифференцировку Т-Лф по Th2-фенотипу, снижать количество клеток Thl-фенотипа, более необходимого с точки зрения формирования цитотоксических клеток; подавлять механизмы внутриклеточной передачи сигналов, что затрудняет активацию Т-клеток. Продукция опухолевыми клетками трансформирующего фактора роста (TGF-β) приводит и подавлению активности, как Т-Лф, так и АПК; синтез фактора ангиогенеза опухолей (ФАО) стимулирует развитие сосудов и способствует инвазивному, росту опухолевой ткани; продуция IL-1β, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и ГМ-КСФ стимулирует пролиферацию иммуносупрессивных миелоидных клеток. Синтез веществ, проявляющих иммуносупрессивную активность, ингибирующих функциональные свойства ДК, как АПК, а также определяющих путь дифференцировки Т-клеток, существенно влияет на развитие и реализацию противоопухолевого иммунного ответа. В основе механизма действия лекарственных препаратов МкАТ нового поколения лежит их способностью вызывать активацию цитотоксических Т-Лф, осуществляющих естественную иммунную защиту от опухолевых процессов, и воздействовать на механизмы подавляющие их активность. К таким препаратам относятся МкАТ, воздействующие на лиганды, подавляющие активность Т-Лф (лиганд-1 программируемой гибели клеток (PD-L1) и костимулирующие молекулы, такие как CTLA-4). Успешно применяются препараты МкАТ, специфичные к опухолеассоциированным АГ, ростовым факторам, конъюгированные препараты.

СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ КАК ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Багина У.С.[1], Игнатьев К.С.[2], Волкова Т.О.[1]

[1] ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия
[2] ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», Петрозаводск, Россия

Исследования последних лет показали, что рост большинства злокачественных опухолей сопровождается значительными нарушениями различных звеньев иммунного ответа организма. Традиционно роль иммунной системы в патогенезе онкологических заболеваний рассматривают в аспекте ее взаимодействия с опухолью, направленного на отторжение злокачественного новообразования, либо способствующего его росту и прогрессии. Главную роль

в противоопухолевом иммунитете играет клеточный иммунный ответ, ключевыми участниками которого являются Т-лимфоциты. Т-лимфоциты экспрессируют дифференцировочные антигены, которые объединены в кластеры дифференцировки (CD). Субпопуляции CD-клеток различны по функциям, стадиям развития и активации Т-лимфоцитов и могут служить иммунологическими маркерами онкогенеза, в том числе и рака молочной железы (РМЖ).

Цель и задачи. Определение соотношения лимфоцитов разных популяций, выбранных в качестве предполагаемых иммунологических маркеров, установление взаимосвязи между уровнем содержания этих клеток в периферической крови и стадией опухоли в молочных железах.

Материалы и методы. Исследовали венозную кровь 95 пациенток ГБУЗ «Республиканский Онкологический Диспансер» (г. Петрозаводск), имеющих гистологически подтвержденный РМЖ: ст. I – 20, ст. II – 30, ст. III – 45. В качестве контроля использовали кровь 30 небеременных женщин, сопоставимых по возрасту, данным анамнеза и не имеющих онкологических заболеваний. Субпопуляции мононуклеарных клеток периферической крови выявляли методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител, специфичных к дифференцировочным антигенам (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD95) (Sigma, США). Оценивали относительное количество CD-позитивных клеток от общего числа лимфоцитов. Для сравнения выборок использовали непараметрический U-критерий Уилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты. Согласно результатам иммунофенотипирования клеток периферической крови ст. I РМЖ характеризовалась статистически значимым повышением относительного количества CD16-клеток: 17,06±0,74, по сравнению с контрольной группой (13,15±0,94). Одновременно происходило снижение относительной численности CD3 и CD4-клеток (от 62,74±1,98 контроля до 53,65±1,20 и от 39,94±2,79 контроля до 34,05±0,77 соответственно), и повышение уровня CD8-клеток (до 36,17±0,84 против 31,98±1,62 контроля), что отражается на соотношении $CD4^+/CD8^+$ и свидетельствует о наличии хелперного дефекта. По мере развития опухоли, начиная со II стадии, у больных отмечалось прогрессирование иммунодефицитного состояния: относительное количество CD3 и CD4-клеток достоверно снижалось. Содержание $CD4^+CD25^+$, напротив, в крови увеличивалось: 8,01±0,11 для больных III стадией РМЖ. У здоровых женщин данный показатель составил 4,11±0,48. Содержание CD20-клеток в крови оставалось без изменения. Количество CD95-лимфоцитов достоверно повышалось по мере прогрессирования опухоли.

Заключение. Не смотря на то, что изменение соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов дает только ориентировочные выводы, в первую очередь, акцентируя внимание на прогрессировании онкопатологии, использование Т-лимфоцитов в качестве дополняющих диагностических и прогностических иммунологических маркеров при раке молочной железы позволит повысить точность постановки диагноза и эффективность лечения, основываясь на индивидуальном иммунологическом «портрете» пациентки.

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России, проект 6.5111.2017/БЧ.

ВАРИАНТЫ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ ПРИ РАКЕ ПОЧКИ

Борисов А.Г., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Модестов А.А., Тоначева О.Г., Мошев А.В.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия

Механизмы нарушения противоопухолевого иммунитета многообразны и связаны в конечном итоге с невозможность распознавать и уничтожать опухолевые клетки. Стратификация больных в подгруппы со сходными показателями иммунного реагирования является важнейшим шагом в реализации индивидуального подхода к лечению онкологических больных.

Цель. Используя кластерный анализ, описать варианты иммунного реагирования у больных почечноклеточным раком (ПКР) и дать характеристику течения заболевания в этих группах.

Обследовано 63 больных ПКР в возрасте 40-55 лет проходивших лечение в КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского». Диагноз у всех больных верифицирован гистологически. В качестве контрольной группы были обследованы 78 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипа лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA). Использовалось пятицветное иммунофенотипирование по панелям: CD3/CD4/CD8/CD45/CD25 и CD3/CD19/CD16+56/CD45/HLA-DR. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларацией (2013 г.). Кластеризацию осуществляли методом одиночной связи (Single linkage). Число кластеров определяли на основании вычисления величин Евклидовых расстояний между среднегрупповыми величинами.

При изучении иммунологических данных обнаружено большая вариабельность иммунологических показателей, несмотря на то, что у больных ПКР определяется лимфопения за счет снижение числа Т-, NK- и NKT-лимфоцитов, при индивидуальном анализе практически у 45% больных не выявлены отклонения от нормы.

Последующий кластерный анализ основных иммунологических показателей позволил выделить четыре кластера, определенных нами как варианты иммунного ответа. Первый с увеличением числа клеток врожденного иммунитета и прежде всего, нейтрофилов выявлен в 4,76%. Второй с увеличением числа цитотоксических Т-лимфоцитов и иммуноглобулинов класса G диагностирован в 19,05% случаев. Третий со снижением иммуноглобулинов, нейтрофилов и Т-лимфоцитов – иммунодефицитный в 31,75%. Наиболее распространенным оказался ареактивный вариант (44,44%), иммунологические показатели которого у больных ПКР не выходили за контрольный диапазон. Анализируя особенности клинического течения в этих группах установлено, что только у больных ПКР T1-2N0M0, встречался вариант иммунного реагирования с активацией врожденного иммунитета. Помимо этого у больных этой группы диагностировались варианты с активацией адаптивного иммунитета (19,35%), иммунодефицитный (32,26%) и ареактивный (38,71%). У больных ПКР T3N0M0 так же в 2/3 случаях диагностировался иммунодефецитный (21,05%) и ареактивный (47,37%) вариант иммунного реагирования и в 31,58% случаях активация адаптивного иммунитета. У больных ПКР T3-4N0-1M1

выявлен только иммунодефицитный и ареактивный вариант реагирования соответственно 46,15 и 53,85%

Таким образом, установлено, что показатели, характеризующие различные звеньев иммунной системы при ПКР, характеризуются значительным разнообразием значений. Использование кластерного анализа позволило выделить у больных ПКР 4 иммунотипа, определяемых различным состоянием врожденного и адаптивного иммунитета. Эти иммунотипы можно рассматривать как различные патогенетические варианты течения ПКР. Неблагоприятными при этом является иммунодефицитный и, несмотря на нетяжелое течение, – ареактивный иммунотип. Иммунотипы с активацией адаптивного и врожденного иммунитета являются наиболее благоприятными. Стратификация пациентов при ПКР по иммунотипам может лечь в основу при назначении иммунотропных препаратов, так как позволит повысить эффективность лечения больных ПКР и реализует персонифицированные подходы к диагностике и лечению нарушений функции иммунной системы.

УЧАСТИЕ CD4$^+$CD39$^+$Т-КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОЙ СУПРЕССИИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Жулай Г.А.[1], Олейник Е.К.[1], Чуров А.В.[1], Кравченко П.Н.[1], Романов А.А.[2], Олейник В.М.[1]

[1] ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия
[2] ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», Петрозаводск, Россия

В настоящее время в онкоиммунологии уделяется особое место изучению молекулы эктонуклеозидтрифосфат дифосфогидролазы-1 (ENTPD1, CD39). CD39 совместно с CD73 участвует в генерации внеклеточного аденозина, оказывающего иммуносупрессорное действие через А2А-рецепторы и способствующего развитию опухоли. Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных типов злокачественных новообразований, однако роль аденозин-A2AR иммуносупрессорного механизма в его развитии до конца не изучена.

Цель. Оценка роли CD4$^+$Т-клеток, экспрессирующих CD39, в формировании иммунной супрессии у больных КРР.

Материалы и методы. Обследовано 42 больных КРР и 30 здоровых доноров. Уровень мРНК *CD39, CD73, A2AR* определяли методом ПЦР в реальном времени. Проведен анализ фенотипов клеток периферической крови, а также опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), выделенных из клинических образцов опухолевой ткани (n = 5). Лимфоциты крови анализировали до начала терапии. Экспрессию CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD127, FoxP3, CD39 оценивали методом проточной цитометрии. Достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$, для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент корреляции Спирмена. Данные представлены в виде M±SD.

Результаты. Для оценки активации аденозин-A2AR иммуносупрессорного механизма у больных КРР определяли уровень мРНК генов *CD39, CD73, A2AR.* Показано, что у больных КРР содержание мРНК *CD39* в лейкоцитах увеличивается в процессе развития заболевания, тогда как для *CD73* значительных различий по сравнению с контролем не найдено. Наряду с этим для больных с поздними стадиями КРР (III-IV ст.) отмечено повышение экспрессии мРНК *A2AR*, что может свидетельствовать об активации аденозин-A2AR иммуносупрессорного механизма.

На поздних стадиях развития КРР (III-IV ст.) наблюдалось накопление периферических CD4$^+$CD39$^+$Т-клеток. Среди ОИЛ количество этих клеток было в 4 раза выше ($p < 0,05$), чем в крови тех же больных. Увеличение числа CD39$^+$ клеток среди ОИЛ наблюдалось и в популяции CD3$^+$CD4$^-$Т-клеток. При этом доля CD4$^-$CD39$^+$ клеток была выше в опухолевой ткани.

В работе проводили анализ популяционного состава периферических лимфоцитов для определения связи с CD4$^+$CD39$^+$Т-клетками у больных КРР. Были отмечены изменения, вероятно, свидетельствующие о развитии вторичного иммунодефицита, особенно в отношении Т-лимфоцитов. У больных КРР по сравнению с контролем снижено число В-лимфоцитов, как на начальных стадиях развития заболевания, так и на поздних ($p < 0,05$). В отношении NK-клеток у больных КРР достоверных различий по сравнению с контролем не выявлено. Изменения количества CD3$^+$Т-лимфоцитов отмечены для больных с III-IV стадиями КРР. На всех стадиях развития КРР наблюдалось пониженное число CD4$^+$Т-хелперов ($p < 0,05$) и активированных CD4$^+$CD25$^+$Т-клеток ($p < 0,05$), а также повышенное количество CD8$^+$ЦТЛ ($p < 0,05$). В результате оценки связи изменений в популяционном составе лимфоцитов и CD4$^+$CD39$^+$Т-клеток у больных КРР обнаружена отрицательная корреляция между количеством CD3$^+$CD4$^+$Т-хелперов и числом CD4$^+$CD39$^+$Т-клеток ($r = -0,60$, $p = 0,0003$), а также между CD3$^-$CD19$^+$В-клеток и CD4$^+$CD39$^+$Т-клеток ($r = -0,40$, $p = 0,044$).

Важную роль при канцерогенезе играет субпопуляция регуляторных CD4$^+$Т-клеток (Treg). В крови больных КРР при анализе CD4$^+$CD25$^+$CD127$^{lo/-}$ Tregs наблюдали усиление уровня экспрессии молекулы CD39. Экспрессия CD39 у Treg-клеток увеличивается уже на начальных этапах (I-II ст.) развития опухоли (55,24±4,2%) по сравнению с контролем (41,16±3,1%; $p < 0,05$) и достигает максимальных значений у больных с более поздними стадиями КРР (67,95±3,1%; с контролем $p < 0,001$, с I-II стадиями $p < 0,05$). Тогда как клетки с фенотипом не характерным для Treg, CD4$^+$CD25$^-$ и CD4$^+$CD25$^+$Т-клетки, не отличались такой закономерностью. Кроме того, у больных КРР обнаружена положительная корреляция между экспрессией CD39 и транскрипционного фактора FoxP3 на CD4$^+$Т-клетках ($r = 0,47$, $p < 0,006$). Среди ОИЛ CD4$^+$CD25^{hi} Treg-клетки также отличались от циркулирующих в периферической крови более высокой экспрессией эктонуклеотидазы CD39. Повышенная экспрессия этой молекулы наблюдалась и у нерегуляторных клеток с фенотипами CD4$^+$CD25$^-$ и CD4$^+$CD25$^+$. Кроме того, при оценке связи экспрессии молекулы CD39 на Treg-клетках с уровнем мРНК *A2AR*, в крови больных КРР обнаружена положительная корреляция ($r = 0,45$, $p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, повышенный уровень экспрессии молекулы CD39 как на периферии, так и среди ОИЛ, а также изменение мРНК *A2AR* лейкоцитов могут говорить об активации аденозин-A2AR иммуносупрессорного механизма у больных КРР. Полученные результаты, возможно, свидетельствуют об участии и важной роли Treg-клеток в этом механизме.

Финансовая поддержка: РФФИ (проект № 16-34-00970), бюджетная тема № 0221-2014-0040.

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА И УРОВНИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Златник Е.Ю., Бахтин А.В., Новикова И.А., Шульгина О.Г., Триандофилиди Е.И.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) считаются в настоящее время одним из важных механизмов метастазирования злокачественных опухолей, но они же могут нести опухолевые антигены и потенциально индуцировать иммунный ответ. Сведения об их возможной роли в процессе «иммунноредактирования» опухоли единичны, хотя она может быть значимой для уточнения прогноза заболевания и оптимизации лечения больных.

Цель. Изучить взаимосвязи между характеристиками клеточного иммунитета и количеством ЦОК у больных раком легкого при различном гистогенезе и распространенности опухолей.

Материалы и методы. Изучали уровни ЦОК с помощью системы CellSearch®, основанной на экспрессии клетками молекул EpCAM, и показатели клеточного иммунитета с помощью проточного цитофлюориметра FACSCantoII (BD) у 30 больных мелкоклеточным (МРЛ) и немелкоклеточным (НМРЛ – аденокарциномой) раком легкого III и IV стадии до начала лечения; средний возраст 62±1,3 года. Из 20 больных МРЛ у 13 (65%) была III, у 7 (35%) – IV стадия заболевания; в группе с НМРЛ у всех 10 была диагностирована IV стадия. Статистическую обработку выполняли с использованием параметрических и непараметрических методов. Вычисляли среднюю, медиану, ошибку средней, достоверность различий, коэффициент корреляции (r); силу прямых и обратных корреляционных связей по критерию Пирсона.

Результаты. ЦОК были обнаружены у 27 больных (90%) в количестве от 1 до 6888, причем в группе МРЛ ЦОК выявлены у 17 больных (85%) в количестве 0-6888, среднее значение составило 655,7, медиана 38,5; в группе НМРЛ ЦОК – у всех 10 пациентов в количестве 1-486, среднее значение составило 57,2, медиана 5,0. При сравнении показателей иммунного статуса ЦОК$^+$ больных РЛ разного гистогенеза, установлено, что их наличие при МРЛ сопровождалось более высоким содержанием $CD3^+CD4^+$ клеток с маркерами поздней активации ($CD95^+$), а также $CD3^+CD4^+$ клеток с иммунофенотипом клеток «памяти» НМРЛ (84,4±2,4 и 72,2±3,7%; 73,2±4,1 и 64,7±3,5% соответственно, $p < 0,05$). У этих же больных уровень $CD3^+CD8^+HLA\text{-}DR^+$ лимфоцитов был выше, чем у больных НМРЛ (29,2±4,2 и 19,8±2,2% соответственно, $p < 0,05$). У больных МРЛ обнаружены более низкие показатели индекса $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ (1,4±0,1 и 1,9±0,3 соответственно, $p < 0,05$), активированных $CD3^+CD4^+CD38^+$ лимфоцитов, (19,9±2,3 и 27,8±3,5% соответственно, $p < 0,05$), и NK-клеток, способных к продукции интерферона-гамма (CD16dimCD56bright) (7,1±1,5 и 15,3±3,8% соответственно, $p < 0,05$). При анализе данных в зависимости от стадии МРЛ был обнаружен в 36 раз более низкий уровень ЦОК при III стадии (44,6±18,7) по сравнению с IV (1616±952,7). Наряду с этим отмечено более высокое количество NKT- и B-лимфоцитов у больных IV стадии по сравнению с III стадией и более низкие уровни активированных Т-лимфоцитов как среди $CD3^+CD4^+$, так и среди $CD3^+CD8^+$ клеток, а также с маркерами ранней (CD38, CD25) и поздней (CD95, HLA-DR) активации. Кроме того, при IV стадии ниже, чем при III, было количество активированных NK-клеток, экспрессирующих Granzyme B. Итак, наличие ЦОК у больных МРЛ сопровождается более низким уровнем активированных Т-лимфоцитов в субпопуляциях $CD4^+$ и $CD8^+$ и активированных натуральных киллеров, т.е., депрессией Т- и NK-звеньев иммунной системы. Результаты корреляционного анализа показали, что при МРЛ отмечены прямая связь с уровнем ЦОК количества наивных CD4 клеток ($r = 0,5$) и обратная – с уровнем $CD3^+CD4^+$ клеток памяти ($r = -0,6$) и активированных ($CD3^+CD4^+CD95^+$) лимфоцитов ($r = -0,7$). НМРЛ характеризуется прямой связью уровня ЦОК с процентом $CD3^+$, $CD3^+CD8^+$ клеток ($r = 0,8$) и сильной обратной – с количеством $CD3^+CD8^+$ клеток памяти ($r = -0,7$). Показана корреляция уровня ЦОК с количеством активированных $CD3^+CD4^+CD25^+$ лимфоцитов ($r = 0,6$) и $CD3^+CD4^+HLA\text{-}DR^+$ ($r = 0,9$), несмотря на обратную корреляцию с общим уровнем $CD4^+$ клеток ($r = -0,7$) и ее отсутствие с процентом Tregs. Уровень ЦОК при НМРЛ обратно коррелирует с активностью фагоцитарного звена. Как при МРЛ, так и при НМРЛ уровень ЦОК обратно коррелирует с количеством Т-лимфоцитов памяти, хотя при МРЛ она выявлена с $CD4^+$ ($r = -0,6$), а при НМРЛ – с $CD8^+$ клетками ($r = -0,7$).

Заключение. При МРЛ и НМРЛ выявлен ряд корреляций уровней ЦОК с показателями иммунного статуса преимущественно минорными лимфоцитарными субпопуляциями: активированными Т-лимфоцитами, Т-клетками памяти, функционально активными NK-клетками.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00244мол_а «Оценка взаимного влияния уровня циркулирующих опухолевых клеток и параметров иммунного статуса у больных раком легкого».

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РИСКА РАЗВИТИЯ МИОМЫ МАТКИ У КОРЕННЫХ ЖИТЕЛЬНИЦ г. ТАШКЕНТА

Исанбаева Л.М., Мусаходжаева Д.А.

Ташкентский институт усовершенствования врачей, Республиканский научный центр иммунологии Министерства здравоохранения РУз, Ташкент, Узбекистан

Миома матки – одно из достаточно распространенных доброкачественных новообразований женской половой сферы. Опухоль растет как генетически аномальный клон клеток, который в результате произошедшей в нем мутации приобретает способность нерегулируемого роста. Значительную роль в предрасположенности к опухолям играют антигены гистосовместимости системы HLA. **Целью** исследования явилось изучение антигенов гистосовместимости I класса у женщин – коренных жительниц Ташкента.

Обследованы 177 женщин в возрасте от 20 до 55 лет с диагнозом миома матки (основная группа). Обследованные женщины являлись лицами узбекской национальности, с учетом родословной в трех поколениях согласно материалам VII Уоркшопа по обсуждению антигенов системы HLA. Иммуногенетические исследования (типирование системы HLA для выявления антигенов I класса

A, B, Cw), выполнены в РНЦ иммунологии Министерства здравоохраненияРУз. HLA-фенотип устанавливали с помощью стандартного микролимфоцитотоксического теста с использованием панели HLA-антисывороток Санкт-Петербургского НИИ гематологии и переливания крови. Контрольную группу составили практические здоровые 300 женщин, принадлежащие к узбекской этнической группе. При обследовании общей группы женщин с миомой матки экспрессировались 35 HLA-антигенов I класса: 13 антигенов по локусу HLA-A, 17 антигенов по локусу HLA-B и 5 антигенов по локусу HLA-Cw. Было выявлено, что по локусу HLA-A наиболее часто был зарегистрирован антиген HLA-A28 (в 20,3% в основной группе против 4,9% в контрольной; $p < 0,05$). С наименьшей частотой экспрессировался антиген HLA-A2 (в 20,9% в основной группе против 36,9% в контрольной; $p < 0,01$). Следует отметить, что в основной группе регистрировались антигены в следующем проценте случаев: A25 – 5,6%, A29 – 4,5%, A24 – 2,8%, A21 – 2,2%, A23 – 1,6%, тогда как в контрольной группе эти антигены не выявлялись вовсе. При исследовании локуса HLA-B у больных с миомой матки по сравнению с контрольной группой наиболее часто (при $p < 0,001$) встречались антигены HLA-B8 (в 14,6% против 4,7% в контрольной группе), B22 (в 12,4% в основной группе против 1,3% в контрольной). Наименее часто встречался антиген HLA-B35 (в 14,1% в основной группе против 27,2% в контрольной ; $p < 0,01$). Анализ данных по распределению антигенов HLA-Cw-локуса в основной группе показал, что наиболее часто по сравнению с контрольной группой встречался антиген HLA-Cw5 (в 9,6% в основной группе против 2,3% в контрольной; $p < 0,05$). Антиген HLA-Cw4 определялся значительно реже, чем в контрольной группе (в 15,8% в основной группе против 36,2% в контрольной; $p < 0,001$). При измерении силы ассоциации HLA-антигенов с заболеваниями нами выявлена истинность связи в основной группе больных с миомой матки для следующих антигенов: B22 ($\chi^2 = 26,7$; EF = 0,112; OP = 10,5; pc < 0,001),B8 ($\chi^2 = 17,9$; EF = 0,108; OP = 3,8; pc < 0,001), что определило положительную ассоциацию этих маркеров с риском развития миомы матки. Аддитивная тенденция риска развития данного заболевания отмечалась у антигенов A28 ($\chi^2 = 13,5$; EF = 0,806; OP = 4,8; pc = н/д), Cw5 ($\chi^2 = 12,3$; EF = 0,074; OP = 4,4; pc = н/д). Отрицательная ассоциация с риском развития миомы матки была установлена для Cw4 ($\chi^2 = 19,7$; PF = 1,7; OP = 0,3; pc < 0,001), A2 ($\chi^2 = 12,6$; PF = 1,3; OP = 0,4; pc < 0,01), B35 ($\chi^2 = 12,6$; PF = 1,2; OP = 0,4; pc < 0,01), что подтверждает протективный эффект данных антигенов.

Таким образом, проведенные нами исследования в группе больных с миомой матки позволили установить положительную ассоциацию и риск развития миомы матки у женщин – коренных жительниц Ташкента, имеющих антигены HLA-B8, B22 и A28. Отрицательная ассоциация с риском развития миомы матки выявлена у носительниц антигенов HLA-A2, B35, Cw4, которые выполняют протективную функцию. Ранняя верификация антигенов гистосовместимости у коренных жительниц Ташкента позволит прогнозировать риск развития миомы матки и провести ряд профилактических мероприятий, направленных на предотвращение роста миомы.

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ПРОФИЛЯ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ФОРМАХ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Курмышкина О.В., Волкова Т.О., Щеголева Л.В., Ковчур П.И.

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

Введение. Основные механизмы, стимулируя которые развивающаяся опухоль может оказывать системное негативное влияние на иммунную систему, направлены на: 1) расширение популяций лейкоцитов с супрессорной активностью (например, Т-регуляторных клеток); 2) усиление процессов, приводящих к пониженной активности или истощению пула эффекторных клеток (например, через индукцию их апоптоза); 3) снижение численности (и активности) клеток-компонентов врожденной системы противоопухолевого надзора. В случае рака шейки матки (РШМ), ввиду его вирус-ассоциированной природы, высока вероятность обнаружить проявления этих механизмов в системной циркуляции на ранних этапах развития патологии, однако, далеко не все из них исследованы к настоящему времени.

Цель и задачи. Охарактеризовать профиль изменений в иммунной системе пациенток с доклиническими формами РШМ на основе следующих параметров: 1) экспрессии маркеров апоптоза (CD95/Fas, Annexin V) в основных популяциях лимфоцитов крови – CD4 и CD8 Т-клетках и естественных киллерах (NK); 2) численности регуляторных CD4 и CD8 клеток (Tregs) по экспрессии маркеров CD25, CD127, FoxP3; 3) численности субпопуляций NK-клеток (в том числе, регуляторных NKreg), а также Т-лимфоцитов с NK-подобным фенотипом (по относительному уровню CD3, CD16 и CD56), и выявить взаимосвязи между данными параметрами с целью предложить возможные механизмы, задействованные в ранних этапах прогрессии патологии.

Материалы и методы. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови было проведено методом проточной цитофлуориметрии на приборе MACSQuant Analyzer (Miltenyi Bitec); образцы крови были получены от 57 женщин с диагнозом цервикальная интраэпителиальная неоплазия (ЦИН) 3 степени (включая рак *in situ*) или микроинвазивный рак шейки матки (стадия IA1) непосредственно перед операцией, а также от 30 здоровых женщин, составивших группу контроля.

Результаты. Увеличение доли Т-лимфоцитов, связывающих Annexin V и ко-экспрессирующих CD95/Fas, в крови больных РШМ (относительно контрольной группы, $p < 0,5$) указывает на повышенный уровень спонтанного апоптоза Т-клеток, с возрастанием вклада Fas-зависимого пути. При дифференцированном анализе CD4 и CD8 популяций выявлен различный характер изменений экспрессии CD95, свидетельствующий о большей подверженности апоптозу CD8 Т-клеток в группе больных. Связывание Annexin V с CD3(-) популяцией также увеличивалось в группе пациенток с РШМ ($p < 0,5$), при этом различий в экспрессии CD95 на NK-клетках между обследованными группами не обнаружено ($p > 0,5$). У пациенток с РШМ наблюдали повышение численности как $CD4^+$Tregs, так и $CD8^+$Tregs, и одновременно снижение соотношения CD3CD8/Treg. По общей численности циркулирующих NK-клеток анализируемые группы не различались, но для субпопуляций NKreg-клеток и NK-подобных Т-лимфоцитов выявлена тенденция ($p > 0,5$) к снижению

их относительного количества, сопровождаемая изменением соотношения $CD56^{dim}/CD56^{bright}$ NK-клеток в группе больных. Сравнение полученных данных для пациенток с пре-инвазивным (*in situ*) и микроинвазивным раком позволяет предполагать усиление наблюдаемых отклонений при дальнейшей прогрессии неоплазии, но достоверных различий между этими подгруппами не установлено. Результаты поиска корреляций между 80 выбранными фенотипическими параметрами позволяют говорить о том, что при развитии инвазивного РШМ происходит согласованное увеличение экспрессии маркеров иммунорегуляторных CD4/CD8 клеток, становятся более выраженными взаимосвязи между Tregs, уровнем экспрессии CD95 на CD4 и CD8 Т-клетках и апоптозом, что может иметь непосредственное отношение к механизму формирования патологических отклонений в иммунной системе.

Заключение. Индукция инвазивного роста при РШМ поддерживается широким спектром нарушений, при этом, системные изменения баланса регуляторных клеток врожденного и адаптивного иммунитета могут играть ключевую роль и должны рассматриваться в качестве объекта более детального исследования при разработке новых методов иммунотерапии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №16-34-60019).

ОПЫТ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Моруга Р.А.[1], Родкина Г.Н.[1], Путков С.Б.[1], Казаков С.П.[1, 2]

[1] ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко» Министерства обороны РФ, Москва, Россия
[2] ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Цель. Проведение сравнительных исследований костного мозга на проточном цитофлюориметре и оценка фенотипических особенностей популяций плазматических клеток пациентов с множественной миеломой (ММ), для его анализа и использования полученных результатов в диагностической лабораторной практике.

Материалы и методы. Для исследования использовался пунктат костного мозга, полученный от 10 пациентов с подозрением на ММ на разных стадиях заболевания и лечения. Фенотипически оценивалась популяция клеток, предполагаемая как миеломные плазматические клетки, в результате чего был получен фенотип, как правило, присутствующий на опухолевых миеломных клетках: $CD45^{+dim}CD19^{-}CD38^{+}CD138^{+}CD56^{+dim}$. А также исследовалось относительное количество внутриклеточного и мембранного содержания легких цепей иммуноглобулинов – $Kappa^{+}$ и $Lambda^{+}$, с применением технологии пермобилизации клеток. Образцы сыворотки крови и мочи пациентов исследовались методом электрофореза, иммунофиксации, нефелометрии с определением количества белка в сыворотке и моче, фенотипа миеломы – тяжелых с общими и свободными цепями, количества свободных и общих легких цепей. Костный мозг больных так же направлялся на исследование иммуногистохимическими и цитогенетическими методами.

Результаты. От пациентов с установленным диагнозом ММ, в процессе исследования был выявлен материал, содержащий легкие цепи фенотипа $Kappa^{+}$ и $Lambda^{+}$, неоднородный по степени их экспрессии. В ходе дальнейших исследований были получены три группы пациентов.

Первая: с положительными результатами иммунофиксации по IgG, Lambda в сыворотке крови, повышенным содержанием общих легких цепей Lambda, повышенное количество, как клеток костного мозга, несущих легкие цепи $Lambda^{+}$ медиана – 93,2% (88,7-97,8%) в исследуемой популяции и средней плотности данного рецептора на клетках медиана – 22,7 (21,7-23,7).

Вторая – с аналогичной тенденцией по IgG, Kappa и клетками $Kappa^{+}$ медиана – 89,5% (83,3-95,7) и невысокой плотностью экспрессии рецепторов медиана – 4 (2,8-5,2).

Третья – в данной группе методом иммунофиксации сыворотки крови выявлялся фенотип IgG, Lambda или IgG, Kappa и повышенное количественное содержание данных легких цепей. Однако в этой, группе по результатам проточной цитометрии, отмечалось невысокое относительное содержание клеток, несущих легкие цепи медиана – 3,25% (3,2-3,3%), и невысокой экспрессией плотности рецепторов медиана – 3,2 (1,9-4,5).

У других пациентов, не имевших диагноза ММ, в ходе исследования косного мозга определялся значительно меньший процент количества плазматических клеток экспрессирующих легкие цепи $Kappa^{+}$ или $Lambda^{+}$ 5,7% (0,5-11%) клеток, а средняя плотность экспрессии по данным маркерам, не превышала – 1,0.

Также все обследованные пациенты были распределены согласно прогностической классификации предлагаемой клиникой Mayo (США, 2013 г.). Было отмечено повышение количества плазматических клеток в миелограмме у пациентов с более высоким риском прогрессии ММ, по данным, полученным цитогенетическими методами исследования. Было проведено распределение пациентов по группам риска и прогнозу злокачественности. Так высокий прогностический риск по цитогенетическому исследованию и классификации клиники Mayo – у 1 пациента с 76,4% плазматических клеток в костном мозге. Промежуточный риск – у 1 пациента с 46,6% плазматических клеток. Стандартный риск выявлен у 4 пациентов с 36% (9,6-63,6) плазматических клеток.

Выводы. По результатам проведенных исследований нами были сформированы три, выше описанных, группы фенотипа «плазматических миеломных» клеток и прослежен ряд тенденций.

Дальнейшая работа в данном направлении, по нашему мнению, может оказаться необходимой при оценке стадии и прогноза заболевания, а также начала лечения и выживаемости пациентов с множественной миеломой, при сравнительной характеристике фенотипа и генотипа.

РОЛЬ ГИПЕРВИРУЛЕНТНЫХ *H. PYLORI*, ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ЦИТОКИНОВ В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГАСТРИТА И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С КАНЦЕРОГЕНЕЗОМ

Москалев А.В., Рудой А.С.

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

На протяжении ряда лет, опираясь на данные собственных исследований и литературы, изучали вопросы иммунопатогенеза острого и хронического гастрита (ХГ), язвенной болезни. Однако вопросы взаимосвязи хронического атрофического гастрита (ХАГ) с риском развития

аденокарциномы желудка оставались незатронутыми. Установлено, что риск развития рака желудка возрастает экспоненциально в зависимости от стадии и степени тяжести атрофического гастрита. В настоящее время считаются доказанными различия канцерогенного потенциала штаммов *H. pylori*. Считается, что сочетание вирулентности микроорганизма и генетической восприимчивости хозяина ведет к более тяжелому хроническому воспалению и более быстрому прогрессированию рака желудка. Главной детерминантой выраженной степени воспаления является содержание фактора вирулентности CagA. В частности, значительная часть штаммов *H. pylori* содержит CagA-ген, являющийся маркером цитотоксичности и отвечающий за выработку так называемого CagA белка. Метаанализ 16 исследований по принципу «случай-контроль», показал, что среди *H. pylori*-инфицированных пациентов инфицирование CagA-позитивными ($CagA^+$) штаммами в 1,64 раз увеличивает риск возникновения рака желудка. Такие бактериальные факторы вирулентности как CagA-формы с множественными EPIYA-C сегментами и штаммы с harbor VacA сигнальной областью типа s1 и mid-region m1 также связаны с повышенным риском рака желудка.

В последние годы широко изучена роль и генетического полиморфизма интерлейкинов (IL) в патогенезе желудочного канцерогенеза. Прежде всего, описаны IL-1β, антагонист рецептора IL-1 (IL-1ra), IL8, IL-10 и TNFα, играющие важную роль в воспалительной реакции на *H. pylori* и воспаление СОЖ, что приводит к атрофии слизистой оболочки и прогрессированию рака желудка. Подтверждена ассоциация риска развития рака желудка с генотипами IL-1 (IL-1B-511 T, IL-1B-31 T, и генотипом ×2/×2 антагониста рецептора IL-1 с отношением шансов 2,5; 2,6 и 3,7 для развития рака желудка у гомозиготных носителей этих аллелей по сравнению с не носителями. Обнаружена связь IL-1β и IL-1RN×2 с риском возникновения рака желудка. Установлен повышенный риск рака желудка для носителей IL-RN×2, специфичный для дистального рака. Лица, которые являются носителями TNFα-308A, имеют повышенный риск развития рака желудка. Также доказано, что функциональные полиморфизмы Toll-like рецепторов 4 типа (TLR4), участвующих в распознавании *H. pylori*, лежат в основе избыточного иммунного ответа и связано с повреждением СОЖ. В частности, носители $TLR4^+$ 896A > G полиморфизма имеют более тяжелую атрофию желудка и степень воспаления, а также повышенный риск развития некардиального рака желудка.

Таким образом, имунопатогенез канцерогенеза атрофического гастрита является многогранным, в котором существенную роль играют генетическая предрасположенность, гипервирулентность *H. pylori* и выраженность воспалительной реакции в СОЖ.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ МУКОЗИТОВ В ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Назарова Е.Л., Минаева Н.В., Хоробрых М.Н., Зорина Н.А., Шардаков В.И., Демьянова В.Т., Парамонов И.В.

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия

Введение. Высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) способствует увеличению общей выживаемости и удлинению периода бессобытийной выживаемости пациентов с множественной миеломой (ММ). Одним из осложнений высокодозного кондиционирования в период гипоплазии кроветворения является токсическое повреждение слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта. Мукозиты проявляются болевым синдромом разной степени выраженности, диспепсией, присоединением тяжелых инфекционных и, в ряде случаев, жизнеугрожающих осложнений, терапия которых увеличивает расходы на лечение и сроки пребывания больных в стационаре. К независимым факторам риска развития тяжелых мукозитов при ММ относят гендерную принадлежность пациента, нарушения функции почек и используемые режимы кондиционирования. В результате проведенных E.A. Coleman et al. (2015) исследований, было убедительно показано, что генетические особенности пациента, в частности наличие полиморфизма генов иммунного ответа, может также играть важную роль в патогенезе данных осложнений в качестве дополнительного фактора.

Цель и задачи. Определить участие полиморфизма генов иммунного ответа в развитии мукозитов в раннем периоде после аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой.

Материалы и методы. Генотипирование 20 полиморфных локусов 14 генов иммунного ответа *TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, CD14, TNFα, FCGR2A* проводили методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле у 20 пациентов с ММ и ауто-ТГСК. Степень выраженности мукозитов оценивали на основании критериев CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) version 4.0 for Gastrointestinal Events, 2009 [http://www.acrin.org/Portals/0/Administration/Regulatory/CTCAE_4.02_2009-09-15_QuickReference_5x7.pdf]. Соответствие распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга, расчет наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, сравнение частот аллелей и генотипов проводили общепринятыми методами популяционной биометрии. Поиск ассоциаций выявленных гаплотипов с мукозитами различной степени выраженности производили путём сравнения частот аллелей и генотипов между группами больных, используя критерий $\chi 2$ с поправкой Йетса на непрерывность. Об ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к данному осложнению судили по величине отношения шансов (OR) с уровнем статистической значимости результатов $p < 0,05$.

Результаты. Установлено, что у всех пациентов с ММ после ауто-ТГСК отмечалось развитие мукозитов различной степени тяжести. Так, у семи больных (35%) поражение слизистых оболочек соответствовало 0-I степени (согласно CTCAE), а у большинства обследованных – 13 человек (65%) – симптомы мукозита отнесены к II-III степеням токсичности. Жизнеугрожающих (IV-V степени) повреждений слизистых оболочек отмечено не было. Среди 20 исследованных полиморфных локусов генов иммунного ответа диагностически значимыми выступили гены *IL-1β* и *IL-10* в точках мутации -1473 и -819, соответственно. Так, в группе пациентов с более выраженными симптомами мукозита (2 группа) практически отсутствовали мутантные гомозиготы гена *IL-1β* ($\chi^2 = 6.11$; $p = 0,01$; OR = 19,44; 95%CI: 0,83-455,15) наряду с преоб-

ладанием гомозиготного гаплотипа гена *IL-10* (C-819T) с аллелем «дикого» типа ($\chi^2 = 5,93$; $p = 0,01$; OR = 16,00; 95%CI: 1,27-200,93). Таким образом, найденные отличия характеризовали группу больных ММ с риском развития осложнений в раннем посттрансплантационном периоде, требующих коррекции медикаментозной терапии.

Заключение. Выявленные точечные полиморфизмы в локусах генов *IL-1β* (G-1473C) и *IL-10* (C-819T) могут играть роль в воспалении и/или обеспечении целостности эпителия слизистых оболочек при повреждающем токсическом действии на них химиотерапевтических препаратов. Определение этих маркеров может служить предиктором развития тяжелых мукозитов у больных ММ в раннем периоде после ауто-ТГСК, позволит индивидуализировать меры профилактики и своевременно скорректировать тактику лечения.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ В ПЕРИФОКАЛЬНОЙ ЗОНЕ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОГО РАКА

Непомнящая Е.М., Шапошников А.В., Никипелова Е.А., Рядинская Л.А., Ульянова Е.П.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. В последнее десятилетие отмечаются значительные успехи в изучении этиологии, патогенеза, диагностики и лечения злокачественных новообразований различных локализаций. Однако во всем мире и в России наблюдается постепенный рост заболеваемости. Особый интерес вызывает изучение влияния различных общих и местных коморбидных заболеваний в онкогенезе. Следует выделить базовые изменения в печени: воспаление – фиброз – цирроз – рак. Этому могут способствовать различные факторы: вирусные гепатиты, метаболический синдром, наследственность, возрастные изменения, эндокринно-обменные процессы.

Цель и задачи. Изучить морфологические изменения в перифокальной зоне при гепатоцеллюлярной карциноме.

Материалы и методы. Материал забирали интраоперационно на расстоянии 2-3 см от края опухоли. Гистологическое исследование осуществляли на светооптическом уровне. Иммуногистохимическое исследование проводили с антителами CD3, CD4, CD8 для определения состава лимфоцитарного инфильтрата. Гистологически гепатоцеллюлярная карцинома была представлена трабекулярной и солидной формами.

Результаты. В удаленных неопухолевых участках печени были обнаружены фиброз, некроз, лимфоцитарная инфильтрация, стеатоз, цирроз. Патоморфологические изменения при наличии воспалительных изменений оценивали как активность воспалительного процесса, а также II-III степень фиброза и фибриногенеза. Вокруг портальных вен и в ткани печени была выявлена лимфоцитарная инфильтрация, различной степени выраженности от незначительной до резко выраженной с формированием лимфоидных фолликул. Полученные результаты о лимфоцитарных инфильтратах в паратумо-ральной зоне при гепатоцеллюлярной карциноме, согласуются с исследованием выполненом нами ранее, в котором установлено, что обнаружение лимфоцитов происходит как из поступления их из крови, так и из костномозговых предшественников. В лимфоцитарном инфильтрате преобладали преимущественно Т-хелперы – $CD3^+$, $CD4^+$, а также $CD8^+$.

Заключение. Таким образом, выявленные структурные изменения в печени в виде фиброза, лимфоцитарной инфильтрации объективно вписываются в картину гепатоканцерогенеза: различные внешние и внутренние туморогенные влияния приводят к фиброзно-некротическим изменениям органов мишени-печени с последующей трансформацией в опухолевый рост. Полученные данные подтверждают необходимость превентивной оценки функционально-морфологического состояния печени для последующего построения схем предопухолевой профилактики.

АНТИТЕЛА К ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ И РЕЦЕПТОРНЫЙ СТАТУС РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Поленок Е.Г.[1], Глушков А.Н.[1], Антонов А.В.[2], Вержбицкая Н.Е.[3], Вафин И.А.[4], Каменских Н.А.[4]

[1] ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» СО РАН (Институт экологии человека), Кемерово, Россия
[2] ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», Кемерово, Россия
[3] ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное патологоанатомическое бюро», Кемерово, Россия
[4] ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», Кемерово, Россия

Определение индивидуального риска возникновения рака молочной железы (РМЖ) с учетом рецепторного статуса опухоли имеет большое значение в связи с возможностью превентивной терапии (профилактики) селективными модуляторами эстрогеновых рецепторов (LaCroix A. et al., 2010; Cuzick J. et al., 2013; Sestak I., 2014). Одним из подходов к решению этой задачи представляется иммуноанализ антител (АТ), специфичных к стероидным гормонам.

Цель. Выявить ассоциации АТ класса А, специфичных к эстрадиолу и прогестерону (IgA-Es и IgA-Pg), с риском РМЖ с учетом наличия в опухоли эстрогеновых (ER) и прогестероновых (PR) рецепторов.

Материалы и методы. Уровни IgA-Es и IgA-Pg определили в сыворотке 222 здоровых женщин и 258 больных РМЖ в постменопаузе с помощью ранее описанного неконкурентного иммуноферментного анализа (Глушков А.Н. и соавт., 2011). Наличие ER и PR в опухоли определили с помощью стандартного иммуногистохимического метода (Петров С.В., 1998). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Риски возникновения РМЖ оценивали на основании показателя отношения шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости. Для выявления пороговых значений уровней АТ (cut-off) был проведен ROC-анализ (Hajian-Tilaki K., 2013).

Результаты. С помощью ROC-анализа были определены пороговые значения для АТ к стероидным гормонам: IgA-Es = 3, IgA-Pg = 3. Одновременное отсутствие или низкие уровни IgA-Es < 3 и IgA-Pg < 3 наблюдалось значительно реже у больных ER+PR+РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами (38,2% против 56,8% соответственно, p = 0,0009). Повышение только уровней IgA-Es > 3 при отсутствии IgA-Pg обнаруживали значительно

чаще у ER+PR+РМЖ (19,1%) и ER+PR-РМЖ (21,4%), чем у здоровых женщин (7,6%) ($p < 0,05$). Наличие только IgA-Pg без IgA-Es не было ассоциировано с РМЖ. Одновременно повышенные уровни обоих АТ значительно чаще встречались только у больных ER+PR+РМЖ в отличие от здоровых женщин (33,3% против 22,1% соответственно, $p = 0,003$).

Заключение. Впервые выявлены ассоциации антител к стероидным гормонам с РМЖ: при одновременном отсутствии IgA-Es и IgA-Pg риск ER+PR+РМЖ снижается (OR = 0,5, 95%CI 0,3-0,7), а при одновременном их образовании – повышается (OR = 2,2, 95%CI 1,3-3,7). Рекомендуется использовать предлагаемый вариант иммуноанализа антител к стероидным гормонам для определения показателей к превентивному назначению селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов.

ОСОБЕННОСТИ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Андреева А.А., Тарабановская Н.А., Кайгородова Е.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В.

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

Макрофаги, ассоциированные с опухолью (МАО), занимают одну из центральных позиций в патогенезе злокачественных опухолей (Allavena P., Mantovani A., 2012). Эффекторы острой фазы воспаления М1-макрофаги реализуют цитотоксическую активность, в том числе и в отношении опухолевых клеток (Biswas S., Mantovani A., 2014). М2-макрофаги, активированные по альтернативному пути и опосредующие регенераторную фазу воспаления, в отношении опухоли проявляют рост-стимулирующую, ангиогенез-стимулирующую и иммуносупрессорную активность (Sica A., Mantovani A., 2012). Возможность изменить свойства МАО от М2-типа в сторону М1 делает их перспективным объектом для поиска и создания новых противоопухолевых иммунотерапевтических подходов. Большинство исследований для изучения свойств МАО и модуляции их активности используют модель индукции макрофагов из моноцитов периферической крови (ПК) здоровых доноров (Ambarus C.A. et al., 2012; Toniolo A. et al., 2015; Yang Y. et al., 2016). Вызывает сомнение адекватность подобного подхода, поскольку очевидно, что моноциты больного злокачественным новообразованием находятся в других условиях существования по сравнению со здоровыми лицами. Подобные отличия могут приводить к значимым изменениям базовых свойств моноцитов и изменять чувствительность к стимулам, индуцирующим поляризацию тканевых макрофагов. **Целью** работы явилось сравнение свойств (фенотип, экспрессия генов, продукция цитокинов) моноцитов ПК у больных раком молочной железы (РМЖ) и у здоровых лиц и выявление взаимосвязи с особенностями среды циркуляции (сывороточные цитокины, циркулирующие опухолевые клетки).

Материалы и методы. В исследование включены 18 пациенток с впервые диагностированным инвазивным РМЖ и 6 здоровых женщин. В периферической крови методом проточной цитофлюориметрии были определены М1 ($CD68^+$), М2 ($CD163^+$) моноциты; моноциты, экспрессирующие рецепторы к IFNγ($CD119^+$) и IL-4($CD124^+$); моноциты, продуцирующие внутриклеточные цитокины IL-1β и TNFα. В полученной методом магнитной сепарации фракции моноцитов методом количественной ПЦР в реальном времени была проведена оценка экспрессии генов, ассоциированных с поляризацией М1 (IL-1β,TNFα) и М2 (CHI3L1, CHI3L2, CHID1, Stabilin1). В качестве важных факторов среды циркуляции оценивали уровень воспалительных (IFNγ, IL-1β и TNFα) и противовоспалительных (IL-4) цитокинов в сыворотке крови методом ИФА и количество циркулирующих опухолевых клеток с фенотипом $EpCAM^+$ (метод проточной цитофлюриметрии).

Результаты. Известно, что характерными особенностями злокачественного процесса являются системное воспаление и циркуляция опухолевых клеток в кровотоке (Ben- Baruch A., 2012; Serrano M.J., 2012). Действительно, в нашем исследовании уровень воспалительных цитокинов IFNγ. IL-1β и TNFα у больных РМЖ превышал соответствующие показатели у здоровых лиц в 4,48; 4,48 и 1,83 раза ($p = 0,07$; 0,002 и 0,1). Увеличение воспалительных цитокинов в циркуляции сопровождалось статистически значимым снижением экспрессии их генов и уменьшением внутриклеточной продукции IL-1β в моноцитах ПК по сравнению со здоровым контролем. Однако количество CD68+ моноцитов ПК, которые, по мнению ряда авторов, характеризуют М1-популяцию моноцитов, не имело статистически значимых различий у больных РМЖ и у здоровых лиц. Значимым отличием в популяционной структуре моноцитов ПК у больных РМЖ явилось снижение М2 ($CD163^+$) популяции и пула $CD124^+$ моноцитов, экспрессирующих рецептор к IL-4 – главному индуктору М2-поляризации, по сравнению со здоровыми лицами. Если в группе контроля $CD163^+$ моноциты составляли 14,35% от всех моноцитов, то у больных злокачественным новообразованием данный показатель равнялся лишь 0,85% ($p = 0,0009$). $CD124^+$ популяция моноцитов у больных РМЖ в 3,6 раза меньше, чем у здоровых лиц ($p = 0,005$). При этом экспрессия генов-маркеров М2 в моноцитах и уровень сывороточного IL-4 не имели различий в группах сравнения. Интересен тот факт, что количество $CD124^+$ моноцитов ПК у больных РМЖ коррелировало с уровнем $EpCAM^+$ циркулирующих опухолевых клеток ($r = 0,7$, $p < 0,05$).

Заключение. Моноциты ПК у больных РМЖ и у здоровых лиц имеют выраженные фенотипические, экспрессионные и функциональные отличия. Выявленные отличия связаны с системным воспалением и циркуляцией опухолевых клеток в кровотоке у больных РМЖ и могут оказаться критическими для осуществления направленного программирования свойств индуцируемых из моноцитов макрофагов у больных злокачественными новообразованиями, что следует учитывать при разработке иммунотерапевтических подходов.

ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ГЛИОБЛАСТОМАМИ ДО И ПОСЛЕ ОПЕРАТИВНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Сухина И.А., Чемодакова К.А., Мартынов Б.В., Никитин В.Ю., Иванов А.М., Иванникова Л.П.

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

Введение. Глиомы (нейроэпителиальные опухоли) составляют около 60% всех опухолей головного мозга. В настоящее время их лечение, в зависимости от степени злокачественности, может сочетать различные под-

ходы, такие как хирургическое вмешательство, лучевая терапия, химиотерапия. Эти методы, не смотря на достижения, остаются неудовлетворительными, особенно для глиобластом, что приводит к необходимости поиска новых вариантов лечения. Перспективным методом для борьбы с некоторыми опухолями стала иммунотерапия, но ее применение для лечения глиом имело ограниченный успех. Изучение иммунобиологии глиальных новообразований головного мозга поможет понять причины неудачи этого терапевтического метода и привести к более успешному лечению в будущем.

Цель и задачи. Целью данного исследования явилось выявление значимых иммунологических показателей у пациентов с глиомами, динамика их изменения после проведения хирургического лечения для подбора наиболее адекватной тактики терапии в дальнейшем. Для решения этой задачи у больных глиальными опухолями с различными гистологической структурой и степенью злокачественности были исследованы субпопуляции Т- и NK-лимфоцитов, основных участников противоопухолевого иммунитета.

Материалы и методы. Исследована периферическая кровь (ПК) 58 пациентов с глиальными опухолями головного мозга различной степени злокачественности. Взятие крови проводили в день выполнения оперативного вмешательства и на 7-е сутки после него. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови (ПК) осуществляли на проточном цитометре «Cytomics FC500» (фирма Beckman Coulter, США) с использованием комбинаций прямых моноклональных антител той же фирмы: CD45FITC/CD4PE/CD8ECD/CD3PC5/CD25PC7, CD45FITC/CD56PE/CD19ECD/CD3PC5.

Результаты. Пациенты были распределены по группам по степени злокачественности: группа grade II (диффузные глиомы) – 19 чел. (33%); группа grade III (анапластические глиомы) – 21 чел. (36%); группа grade IV (глиобластомы) – 18 чел. (31%). После первичного иммунофенотипического исследования больным было проведено хирургическое лечение: в группе с диффузными глиомами (grade II) преимущественно выполнялась стереотаксическая биопсия, в случаях с глиомами grade III-IV (high grade) – открытое вмешательство и криодеструкция опухоли в целевых точках. До хирургического лечения в ПК больных с глиомами низкой степени злокачественности (grade II) отмечалось более высокое ($p < 0,05$) абсолютное количество общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) и NK-клеток ($CD3^-CD56^+$) по сравнению с пациентами с глиомами высокой степени злокачественности (high grade). В послеоперационном периоде в группе grade II было обнаружено выраженное ($p < 0,05$) снижение числа $CD3^+$ (до: 2,42±0,18; после: 1,54±0,09), $CD3^+CD4^+$ (до: 1,56±0,12; после: 0,95±0,07), $CD3^-CD56^+$ (до: 15,47±1,58; после 7,17±0,47) и увеличение ($p < 0,05$) популяции $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (до: 0,53±0,04; после: 0,79±0,07). Тогда как у больных с grade III,IV глиомами статистически значимых изменений данных показателей после операции не наблюдалось. В то же время в ПК больных с high grade глиомами и до, и после операции выявлено повышение ($p < 0,05$) абсолютного количества Т-киллеров ($CD3^+CD56^+$). Наряду с этим в группе grade IV на дооперационом этапе по сравнению с другими группами зафиксировано увеличение ($p < 0,05$) относительного количества Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{bright}$), обладающих супрессорной функцией.

Заключение. На дооперационном уровне у пациентов с диффузными астроцитомами (grade II) (в отличие от больных с grade III, IV) наблюдалась активация Т-клеточного звена иммунитета и NK-клеток, препятствующая быстрому развитию опухоли, но при недостаточно эффективном цитотоксическом Т-клеточном ответе. После хирургического вмешательства пациенты группы grade II (в отличие от больных с grade III, IV) продемонстрировали усиление цитотоксического ответа. Уменьшение количества NK-клеток у пациентов с диффузными астроцитомами (grade II) и анапластическими глиомами (grade III) после хирургического лечения может быть связано с миграцией этих клеток в зону оперативного вмешательства. Повышенное количество Т-киллеров до и после хирургического вмешательства у больных с high grade глиомами возможно отражает компенсаторную реакцию иммунной системы на низкий ЦТЛ ответ. Увеличение Treg на дооперационном этапе свидетельствует о нарушении противоопухолевого иммунного ответа (возможно инициированного опухолью), что является причиной подавления цитотоксического Т-клеточного ответа у больных с high grade глиомами.

МЕХАНИЗМЫ ДЕФЕКТНОСТИ TNFα-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ГЛИОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Тыринова Т.В.[1], Леплина О.Ю.[1], Мишинов С.В.[2], Долгова Е.В.[4], Проскурякова А.С.[4], Баторов Е.В.[1], Калиновский А.В.[3], Чернов С.В.[3], Ступак В.В.[2], Богачев С.С.[4], Черных Е.Р.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия
[2] ФГБУ «Научно-исследовательский институт Травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия
[3] ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия
[4] ФГНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Введение. Дендритные клетки (ДК) играют ключевую роль в индукции противоопухолевого иммунного ответа и при этом обладают эффекторной функцией, заключающейся в способности лизировать опухолевые клетки. У больных злокачественными глиомами ДК характеризуются нарушением цитотоксической активности против TNFα-чувствительных опухолевых клеток, что связано с низким уровнем экспрессии мембранной формы TNFα (mTNFα) на ДК. Одним из позитивных регуляторов цитотоксичности ДК и экспрессии mTNFα является экзогенная двуцепочечная ДНК человека (dsDNA).

Цель. Настоящее исследование направлено на изучение механизмов дефектности mTNFα-медиируемой цитотоксической активности ДК больных злокачественными глиомами, а также роли dsDNA в регуляции этих механизмов.

Материалы и методы. В исследование были включены 15 здоровых доноров и 13 больных с глиобластомой (Grade IV). ДК получали путем культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток в присутствии GM-CSF и IFNα с последующим дозреванием с липополисахаридом (IFN-ДК). Уровень экспрессии мРНК TNFα в ДК определяли методом обратной транскрипции и RT-PCR и нормировали относительно содержания мРНК гена «домашнего хозяйства» RPLP0. Активность TNFα-конвертирующего фермента (TACE) в ДК оценивали спектрофлуориметрически.

Результаты. Экспрессия мРНК TNFα в IFN-ДК больных глиобластомой была снижена более чем в 2 раза по сравнению с IFN-ДК доноров (Me $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = 0,35 *vs* 1; p < 0,05). Активность фермента TACE, осуществляющего шеддинг mTNFα с мембраны клеток, была выше более чем в 2 раза в IFN-ДК больных по сравнению с IFN-ДК доноров (Me 680 RFU/μg белка *vs* 265 RFU/μg белка; p = 0,08). Добавление в культуры IFN-ДК больных глиобластомой dsDNA (5 мкг/мл) на этапе конечного созревания (совместно с ЛПС) увеличивало экспрессию мРНК TNFα в IFN-ДК больных глиомами (Me $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = 2,74 *vs* 0,35; p = 0,09) и приводило к значимому снижению активности TACE по сравнению с интактными ЛПС-стимулированными ДК анализируемых пациентов (Me 680 RFU/μg белка *vs* 443 RFU/μg белка; p = 0,043).

Заключение. Нарушенная регуляция экспрессии mTNFα в IFN-ДК у больных злокачественными глиомами обусловлена низким уровнем экспрессии мРНК TNFα и высокой активностью фермента TACE. При этом нарушенная регуляция экспрессии mTNFα может корригироваться с помощью dsDNA как на транскрипционном уровне, так и посттрансляционном уровне.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЦИТОКИНОВ С АЛЛОПРЕГНАНОЛОНОМ У ЖЕНЩИН С ПРЕДМЕНСТРУАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ

Хайдарова Ф.А., Ходжаева Н.В.

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эндокринологии Министерства здравоохранения РУз, Ташкент, Узбекистан

Выявлено, что возникновение ПМС зависит от типа чувствительности организма к половым гормонам. Выявлена связь предменструального синдрома с аллопрегнанолоном – женским половым гормоном из группы гестагенов. В норме чувствительность к этому гормону у женщин является максимальной после менструации и минимальной перед ней, из-за чего ПМС, как правило, не возникает. Однако примерно 8% женщин, напротив, имеют повышенную чувствительность к аллопрегнанолону перед менструацией, что проявляется симптомами предменструального синдрома.

Целью исследования явилось изучение уровня провоспалительных цитокинов (TNFα и IL-6) и аллопрегнанолона у женщин с ПМС в зависимости от фазы менструального цикла. Обследовано 76 женщин репродуктивного возраста, обратившихся за медицинской помощью в консультативную поликлинику РСМНПЦ Эндокринологии МЗ РУз с жалобами на наличие соматических и/или психоэмоциональных симптомов, возникающих перед менструацией. 20 практически здоровых женщин без жалоб на ПМС составили контрольную группу. Всем женщинам было проведено лабораторное обследование в сыворотке крови, включающее изучение иммунологических (провоспалительные цитокины TNFα и IL-6) и гормональных (аллопрегнанолон) показателей на 5-6 и 20-21-й день менструального цикла, методом ИФА. Наиболее распространенными симптомами заболевания явились депрессия (92%), агрессивность (88%), нагрубание молочных желез (75%), изменение аппетита (72%), отечность (69%). Выраженность тревожных и депрессивных расстройств достоверно повышалось к 25-му дню менструального цикла.

Анализ результатов показал, что у женщин контрольной группы уровень TNFα в лютеиновую фазу в 1,8 раза выше (40,1±2,3 пкг/мл), чем в фолликулиновую (21,8±1,84 пкг/мл) (P < 0,01). Динамика уровня TNFα позволяет предполагать позитивную связь с уровнем всех женских половых гормонов, которые имеют сходные циклические колебания. Уровень IL-6 у женщин контрольной группы в фолликулиновую фазу составил в среднем 18,9±1,8 пкг/мл, а в лютеиновой фазе этот показатель был в 1,68 раза выше, чем в фолликулиновую фазу и составил в среднем 31,7±1,9 пкг/мл (P < 0,05). У женщин с ПМС в фолликулиновую фазу уровень TNFα достоверно выше относительно данных контрольной группы (P < 0,01). Однако, уровень IL-6 у женщин с предменструальным синдромом достоверно снизился в 1,3 раза относительно контрольных значений (P < 0,05). Необходимо отметить, что у женщин с ПМС наблюдаются изменения концентрации некоторых гормонов в лютеиновую фазу, в частности, аллопрегнанолона, который ингибирует синтез IL-6. В фолликулиновую фазу у женщин контрольной группы уровень аллопрегнанолона составил в среднем 3,54±0,25 нг/мл, а в лютеиновую фазу – 2,92±0,14 нг/мл, что достоверно ниже, чем в фолликулиновую фазу (P < 0,05).

Анализ результатов по изучению уровня аллопрегнанолона у женщин с ПМС показал, что в лютеиновой фазе концентрация его достоверно ниже (1,29±0,05 нг/мл), чем у женщин контрольной группы (2,92±0,14 нг/мл) (P < 0,05). Следовательно, низкий уровень аллопренгнанолона сопровождается низким уровнем IL-6 и повышенным уровнем TNFα (P < 0,05). Показано, что при ПМС происходит изменение синтеза некоторых гормонов, в частности прогестерона. В связи с этим, можно предположить, что предменструальный синдром развивается не только от дефицита прогестерона, но и от особенностей его метаболизма в ЦНС. При нормальном метаболизме прогестерон способен образовывать аллопрегнанолон, который стимулирует ГАМК-А рецепторы, а также повышает активность хлоридных ионных каналъцев нейронных мембран, обеспечивая седативный эффект. При нарушениях метаболизма прогестерона в ЦНС гормон образует прегнанолон, который является антагонистом А- и В-ГАМК рецепторов, наличие которых может объяснить клинические проявления ПМС. Сниженный уровень аллопрегнанолона вызывает депрессию, часто встречающуюся при предменструальном синдроме. Разнонаправленное содержание изученных провоспалительных цитокинов коррелирует со сниженным уровнем аллопрегнанолона, что свидетельствует о взаимосвязи иммунной и эндокринной систем, при которой изменение в одной системе оказывает влияние на изменение другой. Причем, что интересно, циклические изменения гормонов приводят к изменению функций иммунокомпетентных клеток не только на местном, но и на системном уровне, что проявляется изменением концентрации сывороточных цитокинов или интенсивности их продукции циркулирующими лимфоцитами.

ВЛИЯНИЕ АУТОПЛАЗМЫ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ В ПРИСУТСТВИИ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК ОПУХОЛИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Храмова Т.В., Вараксин В.В., Батов С.В., Гулам М.Р., Кудашева Е.Л.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
БУЗ УР «Республиканский клинический онкологический диспансер им. С.Г. Примушко» Министерства здравоохранения УР, Ижевск, Россия

Введение. Известно, что важную роль в контроле опухолевого роста играет иммунная система. Однако механизм этого контроля остается не известен. Существующие сегодня факты позволяют предполагать, что аутореактивные лимфоциты и продуцируемые ими аутоантитела регулируют пролиферативную активность клеток и тканей организма в норме. В соответствии с теорией идиотипической сети Н. Ерне, все лимфоциты организма способны к специфическому взаимодействию между собой посредством комплементарного взаимодействия антигенраспознающих рецепторов друг друга. Такие взаимодействия называются идиотип-антиидиотипическими и лежат в основе формирования иммунной сети. Согласно гипотезе данного исследования, антиидиотипические антитела регулируют активность аутореактивных лимфоцитов, специфичных к тканевым антигенам. Нарушения в этой регуляции могут приводить к нарушению контроля над пролиферацией и патологическому разрастанию ткани.

Цель. Исследование влияния антиидиотипических антител на пролиферацию лимфоцитов в культуре в присутствии опухолевых клеток щитовидной железы.

Материалы и методы. Исследованы больные раком щитовидной железы с метастазами (n = 7) и больные раком щитовидной железы без метастазов (n = 9). Из плазмы крови больных, полученной перед операцией, выделяли лимфоциты на градиенте плотности фиколл-верографина. Из опухолевой ткани, полученной после тиреоидэктомии, выделяли клетки щитовидной железы ферментативным способом и обрабатывали митомицином С. Лимфоциты предварительно инкубировали с аутоплазмой, после чего отмывали от несвязавшихся факторов плазмы. Предварительные исследования показали специфический характер реакции лимфоцитов на обработку аутоплазмой, это служит основаниеим предполагать, что эффект аутоплазмы может быть обусловлен антиидиотипическими антителами. Оценивали интенсивность пролиферации лимфоцитов в культуре по потреблению глюкозы глюкозооксидазным методом после 5 дней инкубации с опухолевыми клетками щитовидной железы.

Результаты. Обнаружено, что в группе больных раком щитовидной железы с метастазами наблюдается высокая активность аутологичных лимфоцитов по отношению к раковым клеткам щитовидной железы, которая выражается в 3,1±1,8 ммоль потребленной глюкозы. В группе больных раком щитовидной железы без метастазов этот показатель равен 1,3±0,9 ммоль. Предварительная инкубация лимфоцитов с аутоплазмой с последующим отмыванием от несвязавшихся факторов плазмы позволяет оценивать влияние антиидиотипических антител на пролиферативную активность лимфоцитов, специфичных к тканевым антигенам щитовидной железы. При раке щитовидной железы с метастазами наблюдается отсутствие эффекта после обработки аутоплазмой лимфоцитов, тогда как при раке щитовидной железы без метастазов обработка аутоплазмой оказывает ингибирующий эффект на пролиферацию лимфоцитов, вызванную клетками щитовидной железы.

Для сравнения, аналогичные исследования были проведены на здоровых крысах. Исследовали влияние обработки лимфоцитов аутоплазмой на пролиферативную активность лимфоцитов в присутствии аутологичных клеток щитовидной железы. Было обнаружено, что активность лимфоцитов по отношению клеткам щитовидной железы у крыс варьирует в широком диапазоне (от 0 до 4,6 ммоль потребленной глюкозы), однако, эффект аутоплазмы зависит от текущей активности лимфоцитов. Так, при относительно низкой пролиферативной активности лимфоцитов обработка лимфоцитов аутоплазмой стимулирует их пролиферацию в присутствии клеток щитовидной железы, при относительно высокой – ингибирует, при средних значениях пролиферативной активности влияние аутоплазмы отсутствует.

Заключение. Таким образом, в норме обработка аутоплазмой оказывает нормализующий эффект на пролиферативную активность лимфоцитов. Это не противоречит гипотезе исследования о регуляторной роли антиидиотипических антител в регуляции аутореактивных лимфоцитов. Ингибирующий эффект аутоплазмы при раке щитовидной железы без метастазов и отсутствие эффекта при раке с метастазами свидетельствует об изменении в системе регуляции пролиферативной активности клеток. Различие в эффекте аутоплазмы между больными раком щитовидной железы без метастазов и больными раком с метастазами может использоваться для определения наличия метастазов и прогнозировании возможных рецидивов после тиреоидэктомии у больных раком щитовидной железы.

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИИ И ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ

Шабашова Н.В., Никитин О.А., Вишникина Е.Д., Филиппова Л.В.

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

Введение. Злокачественные новообразования остаются серьезной медицинской и социальной проблемой. Использование традиционных методов лечения не исключает возможности метастазирования или повторного заболевания, поскольку клиническая эффективность этих методов не способна избавить пациента от дефектности защитных противораковых механизмов, которая лежит в основе развития раковых заболеваний.

Цель и задачи. Оценить состояние иммунной системы пациентов с разными вариантами рака после оперативного лечения и полихимиотерапии в периоде ремиссии при первом посещении иммунолога.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили иммунограммы 36 пациентов с разными вариантами рака желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) – 1-я группа и 21 больная раком молочных желез – 2-я груп-

па, впервые обратившихся к иммунологу за 2009-2016 гг. Среди них 26 пациентов посещали иммунолога в течения года, 14 пациентов – более двух лет, 6 – более пяти лет с оценкой динамики клинического состояния и повторных анализов после лечения. Были оценены иммунограммы пациентов при первичном посещении. В качестве контрольных показателей использовали показатели иммунитета 19 условно здоровых лиц. Данные обрабатывались с помощью программной системы STATISTICA for Windows (версия 6.0).

Результаты. Установлено, что средние показатели содержания различных клеток в периферической крови достоверно не отличались от контроля. Анализ индивидуальных результатов показал тенденцию к лейкопении Me = 4,6 × 10^9/л ($p < 0,05$) и нейтропении Me = 2,52 × 10^9/л ($p < 0,05$) у больных раком ЖКТ и лимфопении 1,35 × 10^9/л ($p = 0,0004$) после традиционных методов лечения рака молочных желез. При этом у больных 1-й группы выявлено достоверное снижение средних значений содержания клеток с рецепторами к IL-2 ($CD25^+$) – Me = 8.0% ($p < 0,05$) и Me = 0,15 × 10^9/л ($p < 0,05$) и В-лимфоцитов ($CD19^+$) – Me = 0,20 × 10^9/л ($p < 0,05$), тенденция к увеличению числа Т-цитотоксических лимфоцитов Me = 29% ($p > 0,05$) и снижению количества натуральных киллеров Me = 0,20 × 10^9/л ($p > 0,05$). Тенденция к увеличению $CD8^+$-ЛФ при снижении числа NK сопровождалась достоверным дефицитом синтеза индуцированного IFNγ Me = 458,0 пг/мл ($p < 0,05$), который является основным цитокином этих клеток и регулятором противоопухолевой защиты, а также фагоцитарных функций. Возможно, этот дефект является одной из причин снижения киллерной активности нейтрофильных гранулоцитов, о чем свидетельствовал достоверно измененный коэффициент киллинга Me = 16,0% ($p < 0,05$). Изменения показателей у больных 2-й группы отличались от 1-й: абсолютная лимфопения сопровождалась снижение абсолютных значений большинства лимфоидных субпопуляций: $CD4^+$ – 0,56 × 10^9/л ($p = 0,001$); $CD19^+$ – 0,20 × 10^9/л ($p = 0,0185$); $CD25^+$ – 0,13 × 10^9/л ($p = 0,0001$); $CD56^+$ – 0,14 × 10^9/л ($p = 0,0013$) при нормальных относительных, кроме $CD25^+$ (%) – 9,0% ($p = 0,0001$). Как и в 1-й группе обнаружено значительное истощение способности к синтезу IFNγ – уровень цитокина при индукции ФГА – 377,5 пг/мл ($p = 0,0001$). Это может быть свидетельством дефектов основных клеточных механизмов противоопухолевой защиты, регулятором которых, как и фагоцитарных функций, является IFNγ. Отличием от контрольных данных в обеих группах было увеличение метаболической активности нейтрофилов – НСТ активированный – 66,0% ($p = 0,0165$) и снижение коэффициента киллинга – 16,0% ($p = 0,0001$) – закономерные изменения после полихимиотерапии и свидетельство сохраняющегося воспалительного процесса.

Заключение. Отсутствие существенных отклонений средних величин большинства иммунологических показателей пациентов с опухолевыми заболеваниями свидетельствует о неадекватности состояния иммунной системы в данный период ремиссии. Это может быть обусловлено как самим патологическим процессом, причиной которого считается нарушение противоопухолевого иммунитета, так и последствием традиционных видов лечения, в частности, полихимиотерапии. Снижение IFNγ, по-видимому, является одним из основных показателей дефицита функций всех киллерных механизмов, учитывая важнейшую регуляторную роль этого цитокина в названных процессах противораковой защиты. Выявленные изменения активности лимфоидных клеток и фагоцитов свидетельствуют о необходимости иммунореабилитации для профилактики метастазирования, рецидивов, повторных эпизодов рака и хронических воспалительных заболеваний.

ИММУНОТЕРАПИЯ ВАКЦИНОЙ НА ОСНОВЕ КСЕНОГЕННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ III СТАДИИ: БЕЗОПАСНОСТЬ, ИММУННОГЕННОСТЬ, ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Шишков А.А.[1], Селедцова Г.В.[1], Кащенко Э.А.[1], Гончаров А.Г.[2], Газанова Н.Д.[2], Селедцов В.И.[2]

[1] Институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия
[2] Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

Введение. Современное состояние эпидемиологической картины и традиционно низкая клиническая эффективность традиционной терапии меланомы формирует определенный потенциал к дальнейшему поиску и развитию новых подходов к терапии данного заболевания. Многообещающие результаты демонстрирует развитие и применение препаратов Аргентиной терапии (препараты ингибирующие/блокирующие митоген активированный протеинкиназный путь – MAPK, антицитотоксический Т-лимфоцит ассоциированный рецептор – CTLA, рецептор программируемой клеточной гибели – PD-1 и его лиганд – PD-L1). Но данные препараты имеют определенные показания и демонстрируют ряд выраженных побочных эффектов, которые ограничивают их широкое применение. Кроме того, они не могут применяться с профилактической целью и не оказывают стимулирующего влияния на иммунную систему. Что в свою очередь, мотивирует научно-медицинское сообщество к разработке и изучению специфических иммуностимулирующих препаратов и методов терапии, включая и различные варианты противоопухолевых вакцин.

Цель. Изучение безопасности применения (определение наличия и степени выраженности нежелательных реакций или отсутствие таковых, а так же, влияние на общеклинические показатели крови) ксеногенной полиантигенной противоопухолевой вакцины в терапии меланомы кожи III стадии развития процесса. Определение характера и степени выраженности влияния терапии на пролиферативную активность мононуклеаров периферической крови пациентов на опухолевые антигены аллогенного происхождения (BRO – клеточная линия меланомы человека, лизат), на цитокиновый профиль сыворотки крови, на уровень субпопуляций лимфоцитов периферической крови, на общую 5-летнюю выживаемость пациентов.

Материалы и методы. Данное исследование проводилось в полном соответствии с протоколом клинического исследования утвержденным Научным советом и этическим комитетом «НИИФКИ» г. Новосибирска. Каждым пациентом дано письменное согласие на участие в данном исследовании. Пациенты с гистологически подтвержденной меланомой кожи III стадии заболевания без наличия в анамнезе аутоиммуного заболевания, не подвергавшиеся иммуносупрессорному лечению в течение, не менее, чем за 4 недели до начала исследования и соответствующим 80% и более по шкале Карновского состоянием здоровья. Вакцина (лиофилизированный криолизат клеточной линии B16 меланомы и LLC карциномы мыши в количестве 50 × 10^6 25 × 10^6 клеток на дозу соответственно). Курс состоял из 10 инъекций (подкожно в 2,0 мл на-

трия хлорида 0,9% 5 инъекций с интервалом 1 раз в 7 дней, далее 5 инъекций с интервалом 14 дней). В соответствии с рекомендациями Национального института рака (NCI) оценивались наличие и степень локальных и системных нежелательных реакций. Для определенияя показателей параметров общего, биохимического анализа крови, аутоиммунных антител, субпопуляций лимфоцитов и цитокинового профиля использовались анализаторы и соответствующие наборы реактивов к ним (Erma PCE-210, Erma Inc, Japan; Furuno CA-180, Furuno Electric Company, Japan; eBioscience, San Diego, CA; ChemWell® 2910, Awareness Technology, USA). Статистическая обработка материала производилась с помощью пакета Statistica 6.0.

Результаты. В ходе исследования выявлено относительное увеличение субпопуляции $CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток (но не $CD8^+CD45RO$ Т-клеток) и достоверное увеличение пролиферативной активности мононуклеаров на аллогенный антиген BRO. Данные изменения ассоциировались с повышением в сыворотки крови уровней IFNβ, IL-8 и увеличением общей 5-летней выживемости в группе исследования относительно группы сравнения (55% против 18%). В процессе иммунизации не было отмечено серьезных нежелательных реакций. У части пациентов наблюдались локальные реакции в месте инъекции в виде гиперемии до 2,0 см и подъем температуры тела на 1 градус в течение первых суток после введения. Симптомы самостоятельно регрессировали в теччение 48 часов.

Вывод. Иммунотерапия ксеногенной полиантигенной клеточной вакциной показала свою безопастность и выраженную эффективность в случае применения в терапии пациентов с меланомой кожи III стадии. Учитывая высокую иммуногенность, данный метод терапии показан в первую очередь в качестве терапии профилактики рецидива заболевания и может быть использован с сочетании со стандартными методами терапии рака.

ПЕРВИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК TREC И KREC В ПУПОВИННОЙ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

Дробышевская В.Г.[1,2], Любимова Н.Е.[1], Семенов А.В.[1,2], Тотолян Арег А. [1,2]

[1] Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Первичные иммунодефициты – это большая группа заболеваний, связанных с разнообразными врожденными генетическими нарушениями механизмов иммунной защиты организма, что приводит к развитию тяжелых хронических инфекций и часто к смерти или инвалидизации в раннем возрасте за счет формирования необратимых изменений в органах и тканях. По статистике, на первом месте среди первичных иммунодефицитов находятся гуморальные дефекты (61%), на втором месте – комбинированные иммунодефицитные состояния (18%). (Ярцев М.Н., и соавт., 2006). Данные группы иммунодефицитов характеризуются полным или частичным отсутствием Т- и/или В-клеток, или ослаблением функций этих клеток. В связи с чем особый научный интерес представляет исследование содержания у людей Т-рецепторных эксцизионных колец – TREC (T-cell receptor excision circles) и В-клеточных эксцизионных колец – KREC (kappa-deleting recombination excision circles). TREC формируются в процессе V(D)J-реарранжировки, когда часть генетического материала вырезается и замыкается в кольцо. TREC служат маркерами созревания Т-клеток, недавно эмигрировавших из тимуса и слабо вовлекавшихся в процесс пролиферации или не делившихся совсем. В ходе пролиферации клеток иммунной системы эксцизионные кольца остаются в одной из дочерних клеток, что позволяет использовать их определение как показатель пролиферации лимфоцитов и суррогатный маркер нормального развития иммунной системы. Аналогично образуются KREC (kappa-deleting recombination excision circles) – В-клеточные эксцизионные кольца. Содержание KREC в периферической крови является также суррогатным маркером эффективности развития В-клеточного звена иммунной системы в процессе эмбриогенеза. Определение TREC и KREC можно применять для ранней диагностики иммунодефицитных состояний (van Zelm et al., 2011).

Цели и задачи. 1. Отработка наиболее удобной для практического применения в скрининговом режиме методики выделения ДНК из образцов доноров.

2. Валидация методики количественного определения молекул ДНК TREC и KREC с помощью ПЦР в режиме реального времени.

3. Популяционный анализ концентрации TREC и KREC в крови условно здоровых новорожденных С.-Петербурга.

Материалы и методы. В настоящем исследовании использовалась пуповинная кровь новорождённых. Образцы крови до обследования были заморожены и хранились при -80 °С. Выделение ДНК из клеток крови осуществляли ручным методом на наборе для выделения ДНК/РНК «Рибо-Преп» (ИнтерЛабСервис, РФ) согласно инструкции фирмы-производителя и с небольшими модификациями. Для определения количества TREC и KREC использовали российскую тест-систему, предоставленную Институтом химической биологии и фундаментальной медицины подробно описанной в (Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478). Интерпретацию полученных результатов проводили, согласно рекомендациям разработчика. Статистический анализ осуществляли с использованием программы GraphPad Prizm 5.0

Результаты и обсуждение. В нашем случае проанализированы образцы пуповинной крови 157 новорождённых – 79 девочек и 78 мальчиков. Концентрация TREC составила от 10762 до 121068 копий/10^5 лимфоцитов. Среднее значение TREC 29945±1412 копий/10^5 лимфоцитов. Концентрация KREC составила от 10550 до 89533 копий/10^5 лимфоцитов, среднее 36199±1347 копий/10^5 лимфоцитов. Достоверных межполовых различий концентрации TREC и KREC выявлено не было, что совпадает с литературными данными (Xue-ling Ou et al., 2012; Донецкова А.Д. и др., 2014; Гордукова и др., 2015).

Заключение. Определение количества TREC успешно используется в разных скрининговых программах новорождённых на выявление иммунодефицитов (Chiarini et al., 2013; Kwan et al., 2014). Возможность определения количества KREC для диагностики гуморальных дефектов иммунной системы так же показано в ряде зарубежных и отечественных исследований. Для установления более точного диапазона референтных величин и формулировки возможных рекомендаций использования тест-системы в широкой практике национальной программы скрининга новорожденных требуются дальнейшие эксперименты.

СОДЕРЖАНИЕ TNFα, IFNγ, IL-4 И IL-10 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ТРАНЗИТОРНОЙ ГИПОГАММАГЛОБУЛИНЕМИЕЙ

Климов А.В., Климов В.В., Деев И.А.

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста (ТГД), относительно доброкачественная форма первичного иммунодефицита, характеризуется задержкой становления синтеза IgG, а иногда и снижением IgM

и IgA у детей в возрасте старше 6 месяцев до 2-6 лет. Молекулярные аномалии в основе ТГД до настоящего времени не выявлены. Возможно, что в связи со снижением экспрессии части корецепторного комплекса В-клеток (CD19) при сохранении другой части (CD21 и CD81) после распознавания антигенов через BCR первоначально нарушается активация В-клеток, а в последующем – переключение синтеза IgM на продукцию IgG (Artac et al., 2013). Однако этот процесс при ТГД является преходящим и нивелируется с возрастом. В настоящее время описаны немногочисленные данные по функционированию клеток, вовлечённых в иммунорегуляцию, а также цитокинов и хемокинов при ТГД.

Цель. Определение содержания TNFα, IFNγ, IL-4 и IL-10 в сыворотке крови у детей с транзиторной гипогаммаглобулинемией.

Проведено клиническое наблюдение и обследовано 14 детей в возрасте от 6 месяцев до 4 лет, страдающих рецидивирующими пиогенными инфекциями, у которых были снижены сывороточные иммуноглобулины ниже диагностических критериев: IgG < 5 г/л, IgM < 0,4 г/л, IgA < 0,2 г/л. У данных детей были исключены другие, тяжелые формы первичных иммунодефицитов. Группу сравнения составили 24 ребенка того же возраста, страдающих повторными респираторными инфекциями, без доказанного первичного иммунодефицитного состояния. Все исследования проводились в периоде ремиссии инфекций. В контрольную группу вошли 16 здоровых детей того же возраста.

В результате исследований отмечено достоверное повышение при ТГД по сравнению с группой сравнения и здоровыми детьми содержания TNFα и IL-10. Концентрации всех остальных цитокинов не менялись, включая группу сравнения по отношению к контрольной группе.

На первый взгляд полученные данные являются парадоксальными, т.к. у детей с ТГД найдено повышение одного из потенциальных провоспалительных цитокинов с системным действием (TNFα) и одновременно одного из основных иммуносупрессивных цитокинов (IL-10).

В одной из ранних работ Kowalczyk и соавт. (1997) продемонстрировали повышение TNFα, TNFβ и IL-10 в крови детей с ТГД *in vivo*, а также снижение продукции IgG и IgA В-клетками в условиях стимуляции митогеном лаконоса при добавлении TNFα и TNFβ *in vitro*. Это не исключает ингибирующего действия TNFα и TNFβ на антителопродукцию при ТГД. IL-10 является одним из цитокинов nTreg, и его повышение может косвенно свидетельствовать об увеличенной активности этих клеток при ТГД. Такая интерпретация нашла подтверждение в исследованиях Rutkowska и соавт. (2013), которые определили существенное увеличение количества nTreg ($CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$) в крови детей с ТГД.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА

Махарова М.А.[1, 2], Останкова Ю.В.[1], Чурина М.А.[1], Кузнецова Р.Н.[1, 3], Семенов А.В.[1, 3]

[1] ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия
[3] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Наследственный ангионевротический отёк (НАО) – заболевание, относящееся к группе первичных иммунодефицитов, связанное с генетически детерминированным дефектом гена, кодирующего С1-ингибитор системы комплемента (C1-INH). Несмотря на низкую частоту, это заболевание представляет серьезную проблему в практической медицине. Этиопатогенетическая структура отечного синдрома чрезвычайно вариабельна и имеет полиморфный генез. Это приводит к постановке неправильного диагноза и назначение неадекватной для данного заболевания терапии, что и является причиной высокой смертности пациентов с НАО. Ген SERPING1 Локализован в 11 хромосоме (11q11-q13.1), имеет протяженность 17 тысяч п.о. и содержит 8 экзонов, где на данный момент (согласно базе данных ClinVar) описаны около 50 мутаций, ассоциированных с НАО. Заболевание не только приводит к существенному снижению качества жизни пациентов, но и является жизнеугрожающим. Только установленный вовремя диагноз и соответствующая терапия позволяют говорить об относительно благоприятном прогнозе. Очевидна значимость своевременного определения НАО у пациентов.

Цель и задачи. Апробация молекулярно-генетического метода диагностики НАО 1 и 2 типов.

Материалы и методы. Материалом служила цельная кровь здоровых людей, а также образец крови пациента Т. предположительно больного НАО. Предварительный диагноз был поставлен на основании ряда симптомов и показаниям лабораторных исследований (концентрация С1-ингибитора в пределах нормы, активность < 60% от нормы). Геномную ДНК выделяли с помощью тест-системы «Ампли-Прайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ). Нуклеотидные последовательности 8-ми экзонно-промоторных областей гена SERPING1 длиной 140-600 нт определяли с помощью прямого секвенирования фрагментов. При этом после проведения ПЦР с экзон-специфичными праймерами производилось очищение продуктов реакции и определение концентрации спектрофотометрическим методом на Quantus fluorometer (Promega, США). Очищенные фрагменты использовали для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров. Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в формамиде и помещали в генетический анализатор ABIPRISM 3500 (AppliedBiosystems, США). Обработка и анализ последовательностей проводились в программе Contig Express пакета VectorNTI 10 Advance (Invitrogen, США).

Результаты. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности в 2 случаях (здоровые люди) не имели особенностей, а в 1 случае была выявлена гетерозиготная точечная миссенс-мутация G- > A 57.614.516 (rs4926), приводящая к замене аминокислоты Val480Met. В базе данных ClinVar данная мутация имеет статус не патологичной, что сопровождается 3мя клиническими подтверждениями. Полученные нами результаты не противоречат этим данным, так как пациента Т. беспокоили рецидивирующие отеки конечностей и лица, однако тяжелых патологических состояний не наблюдалось. Не стоит исключать, что такая полиморфная форма белка в сочетании с другими нарушениями элементов системы комплемента может являться причиной описанных клинических проявлений и снижения активности С1-ингибитора. Этот случай только доказывает важность генетического анализа как гена С1-ингибитора, так и других ключевых белков системы комплемента при постановке диагноза.

Выводы. В ходе работы была успешно отработана и внедрена в клиническую практику методика генетического анализа НАО 1 и 2 типов. Секвенирование ДНК у конкретного индивидуума и накопление данных о конкретных мутациях может существенно облегчить и ускорить постановку диагноза у больных НАО.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ПОДХОДА В ДИАГНОСТИКЕ И НАБЛЮДЕНИИ БОЛЬНЫХ С СЕЛЕКТИВНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ ИММУНОГЛОБУЛИНА А

Савин Т.В.[1], Кузнецова Р.Н[1, 2]

[1] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Распространенность селективного дефицита иммуноглобулина А в мире, по данным Pereira L.F., Sapina A.M. (1997), составляет 1:163 человека. В Российской Федерации частота данного первичного иммунодефицита, по данным Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов (2014), составляет 1:300-1:700 человек. Несмотря на то, что данная форма иммунодефицита является самой распространенной формой первичного иммунодефицита, стандартного лечения, позволяющего контролировать данное заболевание, в настоящий момент не предложено.

Цель. Разработка клинико-иммунологических критериев течения различных форм селективного иммунодефицита иммуноглобулина А и оценка возможности дифференцированного подхода в лечении больных.

Материалы и методы. Всего было обследовано 24 пациента в возрасте от 18 до 42 лет (женщины – 13, мужчины – 11), которые наблюдаются в Центре первичных иммунодефицитов в ФБУН НИИ ЭМ им. Пастера. Контрольную группу составили 25 условно здоровых лиц.

Оценка иммунного статуса включала определение у больных концентрации иммуноглобулинов, подклассов иммуноглобулина G в сыворотке крови и носоглоточных смывах, определение субпопуляций лимфоцитов.

В работе использованы коммерческие тест-системы «Вектор-Бест». Оценка концентрации сывороточных иммуноглобулинов проводилась методом иммунотурбидиметрии, подклассы иммуноглобулина G – методом иммуноферментного анализа. Оценка субпопуляций лимфоцитов проводилась с использованием метода проточной цитофлюориметрии.

Результаты. Выявлены различные клинические формы течения селективного иммунодефицита иммуноглобулина А (1 группа – больные с аутоиммунной патологией, 2 группа – пациенты с рецидивирующими заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей).

Анализ показателей гуморального иммунитета показал, что концентрация иммуноглобулина А в сыворотке крови больных была достоверно ниже уровня данного иммуноглобулина у пациентов группы практически здоровых лиц ($p < 0,001$), что подтверждало наличие у больных селективного иммунодефицита иммуноглобулина А.

Проведенный сравнительный анализ гуморального профиля позволил выявить, что в группе больных с преимущественно аутоиммунной патологией уровень иммуноглобулина А в сыворотке крови был достоверно выше, чем в группе больных с рецидивирующими заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей ($p < 0,01$).

При проведении нашего исследования мы обнаружили, что концентрация иммуноглобулина А в носоглоточных смывах больных была снижена всего в 1,5 раза в сравнении с показателями практически здоровых лиц, а уровень иммуноглобулина М резко повышен. Но выявленная особенность требует дальнейшего изучения и проведения статистической обработки.

Таким образом, анализ клинического течения селективного иммунодефицита иммуноглобулина А и показателей гуморального иммунитета позволяет предположить наличие связи между особенностями течения заболевания и гуморальным профилем больных.

ЗНАЧИМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ОБЩЕВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Кролевец Д.И.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Патогенетически значимым принципом терапии пациентов с общевариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН) – гипогаммаглобулинемией является замещение недостающего эффекторного звена гуморальной иммунной защиты внутривенными иммуноглобулинами (ВВИГ). Однако не у всех больных на фоне регулярной заместительной терапии происходит полное купирование признаков иммунной недостаточности (Караулов А.В., Сидоренко И.В., 2011; Сизякина Л.П., Андреева И.И., 2012). Возможно, что помимо протективной роли заместительной иммуноглобулинотерапии немаловажный вклад в обеспечение эффективности работы иммунной системы у больных с первичными иммунодефицитами по гуморальному типу вносят факторы врожденного иммунитета, в первую очередь – клеточное звено.

Целью настоящей работы является выявление роли клеточных факторов врожденного иммунитета у пациентов с первичным иммунодефицитом – ОВИН.

Под наблюдением находилось 16 пациентов в возрасте 8-59 лет (9 мужчин, 7 женщин) с диагнозом ОВИН – гипогаммаглобулинемия, получавших в течение года заместительную терапию ВВИГ (0,4 г/кг массы ежемесячно). При этом у пяти больных на фоне регулярного приема препаратов регистрировались эпизоды воспаления придаточных пазух, обострение хронического бронхита, гнойный конъюнктивит. Комплексную оценку параметров иммунного статуса проводили методом проточной лазерной цитометрии на приборе «FC 500» и определяли экспрессию CD16 и содержание Гранзима В в $CD3^{-}CD16^{+}$ лимфоцитах, экспрессию HLA-DR на $CD14^{+}$ моноцитах периферической крови с использованием соответствующих моноклональных антител (Bekcman Coulter). Кислородзависимую метаболическую активность нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте. Контрольную группу составили 10 практически здоровых доноров крови в возрасте 20-32 лет. Математическую обработку полученных данных проводили, используя программу Statistica 7.0.

При анализе параметров клеточных факторов врожденного иммунитета выявлено, что для всех обследован-

ных больных характерным является снижение количества циркулирующих $CD16^+$ лимфоцитов (6,3±2,1%, в контроле 12,1±1,2%), также как и угнетение их цитолитического потенциала в сравнении с данными практически здоровых ($CD16^+GrB^+$ 4,30±2,3; в контроле 10,21±1,10%). Однако функциональная активность $CD16^+$ натуральных киллеров (НК), оцениваемая по процентному содержанию Гранзим-содержащих НК от их общего числа, у не болеющих выше (20,1±3,7%) по сравнению с пациентами с клиническими признаками иммунной недостаточности на фоне терапии ВВИГ (7,2±2,9%). Кроме того, у больных без клинических проявлений ОВИН в условиях заместительной терапии более высокий антигенпрезентирующий потенциал макрофагальных клеток: $CD14^+HLA\text{-}DR^+$ – 73±8% (в контроле 85±5%), тогда как у болеющих отитами, конъюнктивитами, бронхитами количество $CD14^+HLA\text{-}DR^+$ составило лишь 52±3%. Также выявлены отличия функционирования фагоцитирующих нейтрофилов, которые наиболее показательны при сопоставлении значения К ст. НСТ-теста. У болеющих на фоне ВВИГ-терапии регистрируется существенное снижение адаптационного потенциала нейтрофильного фагоцитоза (К ст. 1,4±0,2 у.е.) в сравнении с аналогичным показателем не болеющих пациентов (1,8±0,3).

Таким образом, у больных с врожденным дефектом гуморальной составляющей адаптивной иммунной защиты клеточные факторы врожденного иммунитета играют существенную роль в поддержании целостного функционального потенциала иммунной системы, что следует учитывать при иммунокоррекции в случае неполной эффективности заместительной терапии.

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ (NGS) В ДИАГНОСТИКЕ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ

Суспицын Е.Н.[1, 2], Гусева М.Н.[3, 4], Соколенко А.П.[1, 2], Бизин И.В.[5], Имянитов Е.Н.[1, 2]

[1] ФГБОУ «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[3] Консультативно-диагностический центр Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, Санкт-Петербург, Россия
[4] ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия
[5] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Первичные иммунодефициты (ПИД) – заболевания, связанные с наличием наследственного дефекта какого-либо звена иммунной защиты. Диагностика ПИД затрудняется существованием большого числа нозологических форм (более 300), которое регулярно увеличивается. Клинико-лабораторные признаки часто недостаточно специфичны, что не всегда позволяет с уверенностью поставить диагноз, а высокая генетическая гетерогенность ограничивает ценность ДНК-анализа. Эффективность диагностики может быть повышена за счет применения методов секвенирования нового поколения (NGS), которые дают возможность одномоментного тестирования множества генов.

Цель и задачи. Установление генетической причины заболевания у детей с клиническими признаками возможного первичного иммунодефицита.

Материалы и методы. Для проведения ДНК-анализа были отобраны 34 пациента с подозрением на наличие ПИД; отбор осуществлялся на основании наличия клинических признаков ПИД, предложенных Jeffrey Modell Foundation. Клинические и иммунологические признаки позволяли заподозрить конкретные нозологические формы ПИД лишь в трети случаев (12/34, 35%). Поиск мутаций проводился посредством высокопроизводительного таргетного секвенирования на платформе Illumina. При этом целевому обогащению с помощью наборов зондов SeqCapEZMedExome (Roche) подвергались кодирующие последовательности 302 известных генов первичных иммунодефицитов. При отборе потенциально патогенных вариантов учитывались тип мутации, популяционная частота, наличие сведений о патогенности, а также данные предиктивных программ.

Результаты. Однозначный результат генетического исследования, т.е. выявление патогенной мутации, соответствующей клинической картине и типу наследования заболевания, был получен в 13/34 (38%) случаев. Выявлен широкий спектр нозологических форм ПИД, включаятакие заболевания как аутоиммунный полиэндокринный синдром 1 типа, синдром IPEX, агаммаглобулинемия Брутона, хроническая грануломатозная болезнь, атаксия-телеангиэктазия, синдром Нетертона, аутовоспалительные синдромы и др. В 6 из 13 случаев результат ДНК-анализа соответствовал диагнозу, предполагаемому ранее на основании клинических и лабораторных данных.

Заключение. Мультигенное таргетноесеквенирование является ценным методом диагностики первичных иммунодефицитных состояний, особенно в ситуациях, когда клинико-лабораторные данные не дают оснований к проведению «прицельного» тестирования отдельных генов. Эффективность выявления генетических причин ПИД в проведенном исследовании соответствует данным зарубежных работ, выполненных с использованием аналогичных подходов.

Работа поддержана за счет средств гранта РНФ 15-15-00079.

ИММУНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ

РЕГУЛЯТОРНЫЕ FoxP3⁺Т-КЛЕТКИ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ У ЖЕНЩИН В ЦИКЛАХ ЭКО

Андреева Е.А.[1], Хонина Н.А.[1], Тихонова М.А.[1], Пасман Н.М.[2]

[1] ФБГНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Большой интерес у репродуктологов к регуляторным FoxP3⁺Т-клеткам обусловлен участием этих клеток в индукции толерантности к аллоантигенам плода. При этом регуляторные свойства проявляют как $CD4^+FoxP3^+$ клетки, так $CD4^-FoxP3^+$ клетки. Учитывая большое влияние различных клеток и факторов в микрокружении преовуляторного фолликула на созревание ооцита, можно допустить участие фолликулярных Т-клеток в созревании фолликулов и ооцитов.

Цель. Исследование содержания различных типов $FoxP3^+$ и $FoxP3^-$ клеток в фолликулярной жидкости (ФЖ) женщин, проходивших лечение бесплодия методом ЭКО, и их возможное значение в овуляторном процессе.

Материалы и методы. В исследование вошли 55 женщин с бесплодием, проходивших лечение методом ЭКО. Средний возраст женщин составил 33,6±5,1, длительность бесплодия – 6,9±4,4 лет. Пациенты подписывали информированное добровольное согласие на проведение иммунологического исследования. Образцы ФЖ забирали во время трансвагинальной пункции яичников, центрифугировали (2000 об/мин), затем полученные клетки криоконсервировали (-80°С). Индекс оплодотворения ($И_О$) рассчитывали по формуле: $И_О$ = кол-во оплодотворенных ооцитов/кол-во зрелых ооцитов. Относительное содержание различных субпопуляций Т-клеток определяли методом проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur) с использованием меченных моноклональных антител. Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Statistica 6.0.

Результаты. Оценка эффективности ЭКО показала, что наступление клинической беременности ассоциировано с меньшим количеством фолликулов и меньшим содержанием ооцитов, характеризующихся более высоким индексом оплодотворения (0,8±0,09% *vs* 0,7±0,06% у женщин с отрицательным результатом ЭКО; $p_u < 0,05$). Исследование ФЖ у женщин при стимуляции суперовуляции выявило наличие в ней $FoxP3^+$ клеток как в популяции $CD4^+$ ($CD4^+FoxP3^+$), так и $CD4^-$ ($CD4^-FoxP3^+$) Т-клеток. При этом $FoxP3^+$ клетки выявлялись как среди $CD4^+CD25^+$, так и $CD4^+CD25^-$ клеток. Анализ взаимосвязи различных субпопуляций Т-клеток с количеством фолликулов и ооцитов показал, что меньшее число фолликулов ассоциировалось (на уровне тенденции) с более высоким содержанием $CD4^-FoxP3^+$клеток. Более того, меньшее число зрелых ооцитов выявлялось у женщин с более высоким количеством как $CD4^-FoxP3^+$ клеток (10,7±2,8% *vs* 3,1±1,6%; $p_u < 0,01$), так и $CD4^+FoxP3^+$ (4,0±0,9% *vs* 2,1±0,6%; $p_u < 0,01$). При этом между содержанием ооцитов и $CD4^-FoxP3^+$Т-клеток отмечалась умеренная, но достоверная корреляционная зависимость ($r = -0,36$; $p < 0,05$). Ретроспективный анализ показал, что наступление и прогрессирование беременности ассоциировалось с более низким содержанием $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ клеток. На это указывают достоверные различия между количеством $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ клеток у женщин с клинической и биохимической беременностью (3,0±0,3% *vs* 8,0±1,7%; $p_u < 0,01$) и между группами с клинической беременностью и отрицательными исходами ЭКО (3,0±0,3% *vs* 7,9±1,5%; $p_u < 0,05$).

Заключение. Впервые показано, что в ФЖ женщин, проходивших стимуляцию суперовуляции методом ЭКО, содержатся различные субпопуляции регуляторных FoxP3⁺Т-клеток, которые могут оказывать влияние на различные этапы овуляторного процесса и эмбриогенеза. При этом можно полагать, что $CD4^+FoxP3^+$и $CD4^-FoxP3^+$ клетки оказывают влияние на этапах созревания фолликулов и ооцитов, а $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ клетки на процессы эмбриогенеза.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В-ЛИМФОЦИТОВ И ПРОДУКЦИЯ АУТОАНТИТЕЛ ПРИ ЭНДОМЕТРИОЗЕ

Анциферова Ю.С., Малышкина А.И., Абдуллаева Л.Х., Красильникова А.К.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н.Городкова» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

Введение. Иммунные механизмы играют важную роль в патогенезе эндометриоза, одного из наиболее распространенных гинекологических заболеваний. Наряду с изменением активности клеток врожденного иммунитета, при эндометриозе многие авторы отмечают признаки аутоиммунных нарушений, в том числе усиление продукции аутоантител различной природы. Однако вопрос о значимости аутоантител в патогенезе эндометриоза до конца еще не решен. В ряде работ не было выявлено взаимосвязи между титром аутоантител и стадией эндометриоза. Были получены противоречивые данные о специфичности аутоантител, выявляемых у пациенток с эндометриозом. До сих пор не изучены механизмы, приводящие к выработке аутоантител, нет данных о характере функционирования В-лимфоцитов при данном заболевании.

Цель и задачи. Целью исследования было установить взаимосвязь между особенностями активации и дифференцировки В-лимфоцитов и содержанием аутоантител в периферической крови и перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом различной степени тяжести для уточнения механизмов развития аутоиммунных нарушений при данном заболевании.

Материалы и методы. Было проведено обследование 59 пациенток с эндометриозом и бесплодием (из них 36 женщин с эндометриозом 1-2 степени и 23 женщины с эндометриозом 3-4 степени) и 25 здоровых фертильных женщин (контрольная группа). Материалом для исследования служили периферическая кровь и перитонеальная жидкость. Фенотип В-лимфоцитов ($CD20^+$, $CD19^+$, $CD19^+CD27^+$, $CD19^+CD27^-$, $CD19^+CD20^-CD38^+$, $CD20^+CD5^+$, $CD20^+CD86^+$) оценивали методом многоцветной проточной цитометрии. Содержание аутоантител (анти-гистоновых, анти-Zona Pellucida (ZP), анти-овариальных, анти-фосфатидил-этаноламин IgG, анти-фосфатидил-холин IgG и анти-beta-2-гликопротеин IgG антител) и sCD30 определяли методом ИФА.

Результаты. У всех пациенток с эндометриозом вне зависимости от степени его тяжести в крови и перитонеальной жидкости было выявлено снижение количества $CD27^+$ В-клеток памяти и увеличение содержания плазматических $CD19^+CD20^-CD38^+$ клеток, уровня наивных $CD27^-$ и активированных $CD86^+$ клеток в популяции $CD19^+$ лимфоцитов. При этом у женщин с распространенными формами эндометриоза изменения дифференцировки В-лимфоцитов на локальном уровне были более выражены, чем при эндометриозе 1-2 степени. Кроме того, у женщин с эндометриозом 3-4 степени в перитонеальной жидкости отмечалось повышение концентрации растворимой формы молекулы CD30, сдвигающей баланс регуляции Th1/Th2 типов иммунного ответа в сторону усиления активности гуморальных реакций. Оценка продукции аутоантител при эндометриозе не выявила увеличения частоты встречаемости диагностически значимых титров антител изученной специфичности. В то же время в крови пациенток с эндометриозом различной степени тяжести было отмечено статистически значимое повышение концентрации анти-овариальных антител, а при эндометриозе 1-2 степени – увеличение содержания анти-гистоновых антител как в крови, так и в перитонеальной жидкости. Проведение корреляционного анализа показало, что при эндометриозе 1-2 степени в крови отмечалась положительная корреляционная взаимосвязь между уровнем анти-ZP антител и содержанием В-1 лимфоцитов, а в перитонеальной жидкости уровни анти-ZP и анти-овариальных антител прямо коррелировали с количеством наивных $CD27^-$В-лимфоцитов. Кроме того, в перитонеальной жидкости женщин с эндометриозом 1-2 степени была выявлена отрицательная корреляционная связь между содержанием анти-ZP антител и уровнем активированных $CD20^+CD86^+$ клеток. При эндометриозе 3-4 степени было выявлено меньше, чем при эндометриозе 1-2 степени корреляционных взаимосвязей между содержанием аутоантител и показателями, характеризующими состояние В-лимфоцитов. Как в крови, так и в перитонеальной жидкости при распространенных формах эндометриоза отмечалась отрицательная взаимосвязь между уровнем анти-фосфатидил-холин IgG антител и наивных В-клеток.

Заключение. Таким образом, для пациенток с эндометриозом характерен сдвиг системной и локальной дифференцировки В-лимфоцитов в сторону увеличения пула наивных клеток и повышения содержания плазматических клеток. Эти изменения, по-видимому, ведут к изменению репертуара продуцируемых антител, в том числе к выработке аутоантител, способных реагировать с антигенами органов репродуктивной системы, что может способствовать развитию бесплодия при данном гинекологическом заболевании.

АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ В ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ НАРУЖНЫМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ

Арипова Т.У.[1], Мусаходжаева Д.А.[1], Ешимбетова Г.З.[2], Азизова З.Ш.[1]

[1] Республиканский научный центр иммунологии Министерства здравоохранения РУз, Ташкент, Узбекистан
[2] Ташкентский институт усовершенствования врачей, Ташкент, Узбекистан

В структуре гинекологических заболеваний эндометриоз занимает третье место после воспалительных заболеваний половых органов и миомы матки. Она диагностируется у 2-10% женщин, впервые обратившихся к гинекологу, и у 30% больных, нуждающихся в гинекологических операциях. При применении лапароскопии очаги эндометриоза выявляются у 20-50% женщин, страдающих бесплодием неясного генеза. В настоящее время актуальны методы, позволяющие непосредственно оценить состояние локальных клеточных и метаболических процессов в перитонеальной полости. Показана немаловажная роль активности перитонеальных фагоцитов в патогенезе наружного генитального эндометриоза (НГЭ).

Целью исследования явилось изучение кислородзависимого метаболизма перитонеальных макрофагов в процессе фагоцитоза в перитонеальной жидкости у больных с различной степенью тяжести наружного генитального эндометриоза.

Было обследовано 37 больных в возрасте от 20 до 45 лет с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ), которые составили 3 группы: 1-я группа – 12 больных с легкой степенью тяжести заболевания; 2-я группа – 10 больных с умеренной тяжестью заболевания; 3-я группа – 15 больных с тяжелым течением. Контрольную группу составили 18 здоровых фертильных женщин. Диагноз у всех больных был установлен на основании интраоперационного обследования и подтвержден результатами гистологического исследования. Для определения кислородзависимой биоцидности перитонеальных макрофагов и нейтрофилов использовали спонтанный и стимулированный НСТ-тест.

Исходные показатели кислородзависимой реактивности макрофагов и нейтрофилов перитонеальной жидкости во всех наблюдаемых подгруппах женщин с НГЭ отражали повышение спонтанной биоцидности по НСТ-тесту по сравнению с группой контроля. В целом, активность спонтанного НСТ-теста, у больных с эндометриозом была выше, чем у здоровых фертильных женщин ($8,3\pm0,3$ и $10,7\pm0,6$ соответственно, $p < 0,05$). Наиболее значительное увеличение спонтанного НСТ-теста регистрировали у женщин 1-й и 2-й групп (в 1,5 и 1,6 раза соответственно выше контроля). При тяжелом течении НГЭ наблюдалось снижение активности спонтанного НСТ-теста, так что его значения недостоверно превос-

ходили контроль. Стимулированный НСТ-тест выявляет резервные возможности перитонеальных макрофагов. При стимуляции наблюдалось незначительное, недостоверное, повышение фагоцитарной активности по сравнению с контролем при легком и умеренном течении НГЭ и достоверное снижение активности у больных с тяжелым течением. В целом достоверных различий между контрольной и основной группой не было. При этом достоверно низкие относительно контроля индексы стимуляции в подгруппах основной группы – 2,41, 2,2 и 1,81 соответственно, говорили о склонности к гипореактивности и снижении резерва микробицидности по мере утяжеления НГЭ. Выявленная прямая зависимость между показателями метаболической активности макрофагов перитонеальной жидкости и степенью активности НГЭ позволяет использовать спонтанный и стимулированный НСТ-тест как один из диагностических критериев в комплексном обследовании больных с эндометриозом.

Макрофаги составляют более 90 % от всех клеток, находящихся в перитонеальной полости, как у здоровых фертильных женщин, так и при эндометриозе. В норме перитонеальные макрофаги заканчивают жизненный цикл менее зрелыми. У больных НГЭ по сравнению со здоровым контролем выявлено резкое увеличение популяции крупных и активных макрофагов, в которых по сравнению с контрольной группой регистрируется повышенная спонтанная кислородзависимая метаболическая активность (по результатам НСТ-теста), обратно коррелирующая со степенью тяжести заболевания. Уровень же стимулированного фагоцитоза у них достоверно не отличался от контроля. Эти данные свидетельствуют о хронической стимуляции макрофагов в перитонеальной полости при эндометриозе, что приводить к избыточному образованию свободно-радикальных молекул, а это в свою очередь является дополнительным стимулом к накоплению и активации моноцитов крови в перитонеальной полости.

АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Tcyt-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Батурина И.Л., Абрамовских О.С., Логинова Ю.В., Никушкина К.В., Зотова М.А., Никонова Т.И., Емельянов И.В., Новоженина В.С., Кох Е.В.

НИИ иммунологии ФГБОУ ВПО «Южно-уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия

Репродуктивная дисфункция является одной из актуальных проблем практического акушерства и гинекологии. Случаи самопроизвольного прерывания беременности составляют в нашей стране около 20% от общего числа зарегистрированных беременностей – 15% приходится на самопроизвольные выкидыши и 5% – на преждевременные роды. В настоящее время установлено, что иммунные механизмы играют значимую роль при беременности, с одной стороны, защищая мать и плод от инфекционных патогенов, а с другой стороны, обеспечивая толерантность иммунной системы матери в отношении эмбриона и плода. Дисбаланс иммунорегуляторных механизмов приводит к недостаточности репродуктивной функции, в том числе нарушениям имплантации, спорадическому или привычному невынашиванию беременности, неразвивающейся беременности (Михалевич С.И. и соавт., 2012). Исследование данных механизмов в последнее время активно изучается и имеет противоречивые и разрозненные данные, что требует дальнейшего изучения.

Цель. Изучение Tcyt-лимфоцитов разной стадии дифференцировки в периферической крови у пациенток с привычным невынашиванием беременности (ПНБ).

Материалы и методы. На базе НИИ иммунологии ЮУГМУ г. Челябинска в 2015-2017 гг. было проведено комплексное обследование 30 женщин в возрасте от 20 до 36 лет, с диагнозом ПНБ. Диагноз был подтвержден врачами – гинекологами с помощью клинических и инструментальных и молекулярно-генетических методов исследования. Группу контроля составили 30 условно здоровых женщин, имеющих 2-х и более детей от одного мужчины. Все пациентки были разделены на две группы: 1- контроль (А) и 2- женщины с привычным невынашиванием беременности (В) Всем обследуемым было проведено иммунологическое исследование периферической крови методом проточной цитофлюориметрии на аппарате Navios™ (Beckman Coulter, США) с использованием коньюгатов антител: $CD45^+$-PerCP-Cy7 (BC,США); $CD8^+$-PerCP-Cy5.5 (eBioscience, США), CD45RA APC (eBioscience, США), CD62L FITC (eBioscience,США). Статистический анализ осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 9.0. Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При обследовании было установлено достоверное повышение абсолютного количества $CD45RA^+CD62L^+$ (Tn) наивных CD8+лимфоцитов при одновременном повышении абсолютного количества $CD45RA^-CD62L^-$ (Tem) эффекторных клеток памяти $CD8^+$ у пациенток с ПНБ по сравнению с группой контроля. Доказано, что при нормальном течении беременности наивные $CD8^+$ лимфоциты должны увеличиваться, на фоне снижения количества Tem и Temra (Кудряшова А.В., 2014). Однако при ПНБ нами установлено повышение (Tem) эффекторных клеток памяти, которые обладают прямой цитолитической активностью и имеют набор адгезивных и хемотаксических рецепторов, за счет чего эти клетки очень быстро мигрируют, в место имплантации эмбриона, возможно, оказывая негативное действие на аллотрансплантант, вызывая прерывание беременности. Полученные данные требуют дальнейшего изучения и доказывают перспективность данного исследования для более глубокого понимания иммунорегуляторных механизмов ПНБ.

ИЗУЧЕНИЕ $CD4^+$ ЛИМФОЦИТОВ РАЗНОЙ СТАДИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Батурина И.Л., Логинова Ю.В., Новоженина В.С., Никушкина К.В., Зотова М.А., Никонова Т.И., Емельянов И.В., Кох Е.В.

НИИ иммунологии ФГБОУ ВПО «Южно-уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия

В настоящее время известно, что реакции иммунной системы играют важную роль в процессах оплодотворения, имплантации и развития беременности. Установлено, что изменение функциональной активности и дифференцировки клеток иммунной системы уже на ранних сроках беременности могут определять ее тече-

ние. В последние годы было показано, что уровень функциональной активности $CD4^+$ лимфоцитов определяется стадией их дифференцировки, Однако роль их в регуляции иммунного ответа при беременности остается мало изученной. Имеются лишь единичные данные об общем содержании Т-лимфоцитов в крови и в плаценте при неосложненном течении беременности, а также при акушерской патологии, в частности, при гестозе и угрозе прерывания беременности (Кадырова Л.В. и соавт., 2014; Кудрявцев И.В., 2014).

Цель. Определение $CD4^+$ лимфоцитов разной стадии дифференцировки в периферической крови, у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ).

Материалы и методы. На базе НИИ иммунологии ЮУГМУ г. Челябинска в 2016-2017 гг. было проведено комплексное обследование 30 женщин в возрасте от 20 до 36 лет, с диагнозом ПНБ. Диагноз был подтвержден врачами – гинекологами с помощью клинических и инструментальных и молекулярно-генетических методов исследования. Группу контроля составили 30 условно здоровых женщин, имеющих 2-х и более детей от одного мужчины. Все пациентки были разделены на две группы: 1- контроль (А) и 2- женщины с привычным невынашиванием беременности (В) Всем обследуемым было проведено иммунологическое исследование периферической крови методом проточной цитофлюориметрии на аппарате Navios™ (Beckman Coulter, США) с использованием коньюгатов антител: $CD45^+$-PerCP-Cy7 (BC,США), $CD4^+$- PerCP-Cy5.5 (eBioscience, США), $CD8^+$ PerCP-Cy5.5 (eBioscience, США), CD45RA APC (eBioscience, США), CD62L FITC (eBioscience, США). Статистический анализ осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 9.0. Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При обследовании было установлено достоверное повышение абсолютного количества $CD45RA^+CD62L^+$ (Tn) наивных $CD4^+$ лимфоцитов при одновременном снижении абсолютного и относительного количества $CD45RA^-CD62L^-$ (Tem) эффекторных клеток памяти $CD4^+$ у пациенток с ПНБ по сравнению с группой контроля. В настоящее время доказано, что наступление нормальной беременности сопровождается доминированием в крови пула $CD4^+$ Tn на фоне снижения количества Tem и Temra (Сотникова Н.Ю., 2010), что соотносится с нашими данными. Возможно, что при ПНБ имеются другие нарушения иммунной системы, что требует дальнейшего более детального и расширенного изучения.

СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ В СПЕРМОПЛАЗМЕ ПРИ БЕССИМПТОМНОЙ БАКТЕРИОСПЕРМИИ

Вавилов Н.В., Мальцев Н.А., Годовалов А.П.

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, Пермь, Россия

С 1980 г. отмечается неуклонное снижение встречаемости значений «нормы» среди показателей спермограммы. Также удельный вклад мужского фактора в структуру бесплодия составляет 20-45%. Показано, что у мужчин, состоящих в бесплодных браках, зачастую обнаруживается бессимптомная бактериоспермия. Описано как прямое негативное влияние микроорганизмов на качество эякулята, так и опосредованное – через реакции макроорганизма. Как известно, одним из звеньев защиты от инфекции являются гуморальные факторы приобретённого иммунитета, поэтому интерес представляет оценка содержания иммуноглобулинов в зависимости от микробного спектра эякулята при бессимптомной бактериоспермии.

Цель. Оценить содержание иммуноглобулинов классов M, G, A и E в спермоплазме мужчин с бессимптомной бактериоспермией.

Материалы и методы. Проведено исследование эякулята 51 мужчины, обратившихся в клинику по поводу бесплодного брака. Для бактериологического анализа исследуемых образцов готовили десятикратные разведения исходного материала. Бактериологическое исследование выполнено по общепринятой методике(Godovalov A.P., Karpunina T.I., 2016). Для установления концентрации иммуноглобулинов (Ig) класса M (IgM), G (IgG), A (IgA) и E (IgE) использовали иммуноферментный метод (Вектор-Бест, Россия). Общее микробное число выражали в lg КОЕ/мл. Концентрацию Ig и альбумина выражали в мг/г общего белка. Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и t-критерия Стьюдента для непарных данных.

Результаты. Установлено, что у 94% мужчин в эякуляте присутствуют микроорганизмы. Из них у 63% мужчин были обнаружены грамположительные кокки (1-я группа; 4,53±0,24 lg КОЕ/мл), в трети случаев (31%) – грамотрицательные палочки (2-я группа; 5,38±0,30 lg КОЕ/мл, $p < 0,05$ к 1-й группе) и только у 6% мужчин рост микрофлоры отсутствовал (3-я группа). Показано, что у мужчин 3-й группы концентрация белка в спермоплазме составила 89,0±5,1 мг/мл, что существенно выше, чем в 1-й (58,9±2,7 мг/мл; $p < 0,05$) и 2-й группах (57,3±3,9 мг/мл; $p < 0,05$). Доля альбумина в общей белковой фракции во 2-й группе статистически значимо выше, чем в 1-й, однако обе группы не отличались по уровню этого белка от показателей 3-й группы. Наибольший уровень IgG и IgM наблюдался при высеве представителей семейства *Enterobacteriaceae* (табл.). В противоположность этому максимальный уровень IgA обнаружен в 3-й группе, где в образцах спермоплазмы отсутствовал рост условно патогенной микрофлоры (табл.). Иммуноглобулины класса E не обнаружены ни в одной пробе.

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В СПЕРМОПЛАЗМЕ МУЖЧИН С БЕССИМПТОМНОЙ БАКТЕРИОСПЕРМИЕЙ

Группы	Концентрация иммуноглобулинов, мг/г белка		
	IgG	IgM	IgA
1	206,6±13,5*,#	3,7±0,5*	35,8±3,2*,#
2	261,9±23,0#	5,6±0,7#	27,3±2,6#
3	154,5±24,6	2,4±0,7	72,8±10,7

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с данными 2-й группы, # – $p < 0,05$ при сравнении с данными 3-й группы.

Повышение концентраций IgM и альбумина во 2-й группе можно объяснить более выраженным действием грамотрицательной флоры на микроциркуляторное русло, в результате чего усиливается транссудация таких «тя-

жёлых» молекул, однако данный механизм требует дальнейшего изучения.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали, что, несмотря на отсутствие клиники, при бессимптомной бактериоспермии наблюдается секреция иммуноглоублинов классов M и G в спермоплазму, а уровень иммуноглобулина A существенно снижается.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта «р_а 16-44-590429».

ПРОДУКЦИЯ *IN VITRO* ЦИТОКИНОВ Th1/Th2-ТИПА КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН С ИДИОПАТИЧЕСКИМ ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИММУНОЦИТОТЕРАПИИ

Вторушина В.В., Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К.

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Патогенез идиопатического привычного выкидыша (ПВ) связывают с дисбалансом иммунных реакций, происходящих между иммунной системой матери и фетальными клетками, который приводит к нарушению формирования толерантности к аллоантигенам плода и, следовательно, к отторжению плода на ранних сроках гестации. Признание иммунного генеза ранних потерь, с одной стороны, способствует поиску маркеров нарушенной толерантности, а с другой, поискам методов иммунокоригирующей терапии, самым дискуссионным из которых является иммуноцитотерапия (ИЦТ). Противоречивость выводов об эффективности ИЦТ связана с разнообразием методов подготовки клеток для введения, протоколов иммунизации, неоднородностью выборок пациентов для терапии. Сформулированы различные гипотезы о механизмах ее иммуномодулирующего действия. Наиболее распространенной была гипотеза о необходимости смены активного иммунного ответа провоспалительной направленности (Th1-типа), на фоне которого беременность у женщин с ПВ не пролонгируется, на ответ противовоспалительной направленности (Th2-типа). При отсутствии четких подтверждений этой гипотезы становится очевидной необходимость исследований соотношения Th1-типа и Th2-типа ответов на ИЦТ у женщин с привычным выкидышем при разных исходах данной беременности.

Целью настоящей работы была оценка цитокиновой продукции митоген-стимулированными *in vitro* клетками цельной периферической крови пациенток с идиопатическим ПВ после предгестационной ИЦТ и в I триместре наступившей беременности.

В исследование были включены 26 пациенток с ПВ, 12 фертильных женщин вне беременности и 6 женщин в 12 недель физиологической беременности. Предгестационная ИЦТ проводилась дважды с интервалом в один месяц на 5-9 день менструального цикла, заключалась во внутрикожном введении 50 млн клеток лейкоцитарной взвеси партнера в ладонную поверхность предплечья в 10-12 точек. Во время наступившей беременности ИЦТ проводили на сроке 5-6 и 8-9 недель гестации. Забор периферической крови производили вне беременности до проведения ИЦТ и после 2-х процедур ИЦТ на 18-22 день менструального цикла, во время беременности – на сроках 5-6, 8-9 и 12 недель. Для получения супернатантов клеток цельной крови использовали набор «Цитокин-стимул-бест» (Вектор-Бест, Россия). В соответствии с рекомендацией производителя стимулирование цельной крови осуществлялось в CO_2-инкубаторе при 37 °C в течение 24-х часов. Концентрацию цитокинов провоспалительной (IFNγ, TNFα IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12p70) и противовоспалительной (IL-4, IL-10) направленности оценивали с помощью мультиплексного анализа с использованием стандартного набора Human Th1/Th2 11-plex Ready-to-Use Kit (eBioscience, США) на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Расчет результатов производили с помощью программы FlowCytomix-Pro-3.0.

Согласно полученным нами результатам до проведения ИЦТ у женщин с ПВ продукция TNFα, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 была значимо ниже, чем у женщин контрольной группы, а продукция IFNγ имела выраженную тенденцию к снижению. Проведение 2-х процедур ИЦТ в качестве предгестационной подготовки не оказало влияния на уровень продукции цитокинов у женщин с ПВ. При этом сохранились отличия, выявленные до ИЦТ, от продукции цитокинов у женщин контрольной группы – продукция TNFα, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 осталась сниженной, а уровень IL-4 был значимо ниже. В 5-6 недель наступившей беременности после предгестационной ИЦТ у пациенток с ПВ не наблюдалось изменений в характере цитокиновой продукции по сравнению с результатами, полученными после 2-ой процедуры ИЦТ вне беременности. После проведения 2-х процедур ИЦТ в I триместре беременности при обследовании в 8-9 и 12 недель гестации у женщин с ПВ достоверно преобладала продукция IFNγ по сравнению с результатами после 2-ой процедуры ИЦТ вне беременности.

Полученные результаты указывают на преобладание Th2-направленности иммунного ответа у женщин с идиопатическим привычным выкидышем до назначения иммуноцитотерапии. Проведение иммуноцитотерапии в качестве предгестационной подготовки и во время I триместра беременности приводит к преобладанию Th1-типа цитокиновой продукции, необходимой для успешной пролонгации беременности. Для понимания значимости иммуноцитотерапии в программе лечения пациенток с идиопатическим привычным выкидышем требуется проведение дальнейших исследований.

ВЛИЯНИЕ КАРНИТИНА НА ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ ПРИ БЕСПЛОДИИ

Галимова Э.Ф., Гайсина А.Р., Травников О.Ю., Хайбуллина З.Г., Баймурзина Ю.Л., Гайсина А.Ф., Галимов Ш.Н.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Введение. Группу информативных маркеров репродуктивной функции образуют цитокины и родственные соединения – хемокины и ростовые факторы. Большинство известных цитокинов экспрессируется в зрелом яичке независимо от воспаления или активации иммунных процессов, т.е. их функции не ограничиваются регуляцией иммунитета. Цитокины важны для зачатия посредством как прямых воздействий на зародышевые клетки, эмбрион и негемопоэтические структуры в гонадах и матке, так и косвенного влияния путем создания иммунологически восприимчивой среды для образования гамет,

имплантации и развития оплодотворенной яйцеклетки. Ранее нами был выявлен дефицит и дисбаланс фактора стромальных клеток SDF-1α и трансформирующего фактора роста TGF-β в сыворотке крови и семенной плазме бесплодных пациентов. Понимание, какие цитокины и каким образом вовлечены в снижение фертилизационного потенциала эякулята, принципиально для дизайна терапии репродуктивной патологии различного происхождения, в том числе идиопатических форм мужского бесплодия.

Цель. Оценка влияния препарата карнитина на уровень некоторых хемокинов и факторов роста в семенной плазме при инфертильности неясного генеза.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 69 мужчин в возрасте 23-39 лет, состоящих в бесплодном браке от 1 года до 8 лет (основная группа). Пациенты получали L-карнитина тартрат (по 0,5 г дважды в сутки перорально) в течение 3 мес., что соответствует продолжительности сперматогенеза. Группу сравнения (контроль) составили 30 фертильных мужчин, имеющих 1-3 здоровых детей. Исследование спермы проводили по протоколу Всемирной организации здравоохранения (2010). В семенной плазме определяли уровень цитокинов иммуноферментным методом с помощью наборов фирмы BCM Diagnost (США) по стандартному протоколу согласно рекомендациям производителя. Для статистической обработки использовали пакет программ MS Excel 2003 SPSS 12.0 для Windows. О достоверности различий между средними величинами судили по t-критерию Стьюдента.

Результаты. При анализе спермограмм пациентов при приеме препарата статистически значимых изменений концентрации сперматозоидов, содержания патологических форм и двигательной активности установлено не было, несмотря на выраженную тенденцию к нормализации последнего показателя, что не соответствует литературным данным о положительном эффекте карнитина на моторику и другие свойства гамет.

Особенностью цитокинового статуса семенной жидкости фертильных пациентов явилось преобладание хемокинов и ростовых факторов (SDF-1α, IL-8, IL-7 и TGF-β), превалирование уровня отдельных противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-5) и относительно низкое содержание провоспалительных медиаторов (IL-1β, IL-18 и TNFα). Доминирование фактора стромальных клеток и трансформирующего фактора роста обеспечивает создание привилегированного иммунного положения сперматогенного эпителия и низкую иммуногенность эякулята, которые ранее связывали главным образом с гематотестикулярным барьером. У бесплодных пациентов обнаружены выраженные сдвиги цитокинового зеркала семенной плазмы: снижение концентрации и нарушение соотношения SDF-1α и TGF-β, регуляторов иммунных/пролиферативных процессов в гаметах, причастных также к индукции молекулярных и клеточных изменений в эндометрии при имплантации. Что касается провоспалительных цитокинов, то увеличения их содержания, которое является серьезным препятствием для осуществления основной функции сперматозоидов, не найдено.

Для коррекции выявленных изменений нами был использован L-карнитин, обладающий выраженной антиоксидантной, мембранопротекторной и липотропной активностью. Цитокиновый профиль спермоплазмы пациентов основной группы на фоне препарата претерпевал определенные изменения. Прием карнитина сопровождался статистически значимым увеличением концентрации SDF-1α, IL-7 и TGF-β практически до показателей фертильных мужчин. Нормализация уровня этих цитокинов имеет первостепенное значение для восстановления оплодотворяющей способности сперматозоидов, поскольку им принадлежит ключевая роль в формировании толерантности половых клеток и повышении рецептивности матки к оплодотворенной яйцеклетке.

Заключение. Таким образом, карнитин является эффективным средством коррекции цитокинового статуса эякулята, что позволяет рекомендовать его включение в качестве базисного компонента эмпирической терапии идиопатического бесплодия.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭНДОГЕННЫМ МЕЛАТОНИНОМ Т-КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Th17 И Treg В ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ

Глебездина Н.С.[1], Олина А.А.[2], Некрасова И.В.[1], Куклина Е.М.[1]

[1] Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, Пермь, Россия

Эпифизарный гормон мелатонин регулирует широкий спектр биологических реакций, в том числе играет важную роль во время беременности: будучи эффективным антиоксидантом, он защищает ткани плода и плаценты от окислительных повреждений. В то же время, гормон является эффективным иммунорегулятором, и изменение его уровня в период гестации должно сказываться на активности иммунных процессов. Особый интерес представляет роль мелатонина в контроле баланса двух Т-клеточных субпопуляций, Th17 и Treg: с одной стороны, этот баланс важен для успешного развития беременности; с другой стороны, клетки Th17 и Tregs находятся под непосредственным контролем мелатонина, поскольку экспрессируют специфические мембранные рецепторы для гормона, MT1 и MT2, а один из двух дифференцировочных факторов для Th17 – RORa – эффективно регулируется мелатонином и до недавнего времени рассматривался как третий, внутриклеточный, рецептор для данного гормона.

Цель. Оценить роль эндогенного мелатонина в регуляции дифференцировки Th17/Treg на разных стадиях беременности.

Объектами исследования служили лейкоциты женщин, находящихся в I и III триместрах беременности, и лейкоциты здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. Уровень и активность Th17 и Treg оценивали *ex vivo* и *in vitro*, в ответ на поликлональную активацию (анти-CD3/CD28), – по экспрессии маркеров дифференцировки Th17/Treg – транскрипционных факторов RORγt и FoxP3, а также по продукции ключевых цитокинов этих клеток, IL-17A и TGF-β. Вклад эндогенного мелатонина в дифференцировку определяли при культивировании лимфоцитов в присутствии аутологичной сыворотки (как источника гормона) на фоне блокады мембранных рецепторов для мелатонина, MT1/MT2. Одновременно *ex vivo* определялись уровень мелатонина в сыворотке, а также экспрессия $CD4^+$Т-лимфоцитами ключевого мембранного рецептора для мелатонина, MT1, и мелатонин-регулируемого фактора RORa.

Установлено, что уровень мелатонина в сыворотке крови увеличивается к III триместру беременности (концентрация мелатонина, Me ($Q_{0,25}$-$U_{0,75}$), пг/мл: небеременные – 21,37 (18,69; 38,47), III триместр – 48,59 (42,41; 135,85); $p < 0,05$). Оценка уровня экспрессии мелатонинового рецептора, MT1, не выявила различий в группах беременных и небеременных женщин, однако показала достоверное снижение процента RORa в ходе беременности (процент $CD4^+ROR\alpha^+$ клеток: небеременные – 1,03 (0,50; 1,58); I триместр – 0,94 (0,76; 1,35); III триместр – 0,50 (0,44; 0,78), $p < 0,05$ в сопоставлении с беременными I триместра). Одновременно в ходе гестации изменялось соотношение уровня и активности Th17/Treg, что подтверждалось изменением баланса как самих клеток ($CD4^+ROR\gamma t^+$/$CD4^+FoxP3^+$), так и их продуктов, IL-17A/TGF-β в периферической крови. Анализ роли эндогенного мелатонина в контроле дифференцировки Th17 и Treg *in vitro* в ответ на поликлональную активацию у небеременных женщин выявил позитивное действие гормона на соотношение Th17/Treg, опосредованное сигналами с мембранных рецепторов для гормона (отношение $CD4^+ROR\gamma t^+$/$CD4^+FoxP3^+$Т-клеток: активированная культура – 3,76 (2,50; 4,57); активированная культура на фоне блокады MT1/MT2 – 1,84 (1,67; 3,55), $p < 0,05$). Для беременных показано участие эндогенного мелатонина непосредственно в активации $CD4^+ROR\gamma t^+$ (процент $CD4^+ROR\gamma t^+$ клеток в активированной культуре: небеременные – 2,48 (2,10; 2,95); I триместр – 1,68 (1,36; 3,66); III триместр – 2,66 (2,20; 3,10); в активированной культуре на фоне блокады MT1/MT2: небеременные – 1,47 (1,16; 1,85), $p < 0,05$; I триместр – 1,32 (0,92; 1,86), $p < 0,05$; III триместр – 1,79 (1,31; 2,20), $p < 0,05$) и $CD4^+FoxP3^+$Т-клеток (процент $CD4^+FoxP3^+$ клеток в активированной культуре: I триместр – 0,24 (0,21; 0,34); III триместр – 0,45 (0,35; 0,57); в активированной культуре на фоне блокады MT1/MT2: I триместр – 0,18 (0,12; 0,25), $p < 0,05$; III триместр – 0,34 (0,23; 0,42), $p < 0,05$). В целом такие же закономерности показаны и для цитокинов в культуральных супернатантах.

Полученные данные указывают на эффективную регуляцию эндогенным мелатонином исследуемых Т-клеточных субпопуляций Treg и Th17 с более выраженным влиянием на последние, и на участие в этом процессе мембранных рецепторов для гормона.

АНАЛИЗ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *HLA-G* У ЖЕНЩИН С РИСКОМ РАННИХ САМОПРОИЗВОЛЬНЫХ ВЫКИДЫШЕЙ

Гордеева Л.А.[1], Воронина Е.Н.[2], Оскорбина О.С.[1], Оленникова Р.В.[3], Нерсесян С.Л.[3]

[1] ФГБУН «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» РАН (Институт экологии человека СО РАН), Кемерово, Россия
[2] ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, Новосибирск, Россия
[3] ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», Кемерово, Россия

При патологии беременности (невынашивание, преэклампсия) наблюдается снижение уровня экспрессии неклассических антигенов Главного комплекса гистосовместимости человека – HLA-G в плаценте и в материнском кровотоке, это приводит к активации цитотоксических эффектов иммунной системы матери. Полиморфизм в гене *HLA-G* оказывает влияние на биологические функции молекул HLA-G, связанные с особенностями продукции их изоформ, взаимодействия с клеточными рецепторами и модуляции иммунного ответа.

Цель. Изучить ассоциации полиморфизма в кодирующей (Thr31Ser, rs41551813; Leu110Ile, rs12722477; *I*597 ΔC, rs41557518) и в 3'-нетранслируемой (3'-UTR, 14 bp Ins/Del, rs66554220) области гена *HLA-G* у женщин с риском развития ранних самопроизвольных выкидышей.

Материалы и методы. Исследуемые выборки составили женщины с двумя самопроизвольными выкидышами (n = 75, группа I) и тремя и более выкидышами (n = 37, группа II) до 12 недель беременности. Основным условием включения таких женщин в исследование было отсутствие мед. абортов, внематочных беременностей и родов. Средний возраст женщин был 30,0±4,7 (SD) лет. Группу сравнения (контроль) составили образцы ДНК 233 репродуктивно здоровых женщин, имеющих или вынашивающих ребенка без врожденных аномалий развития и не имеющих самопроизвольных выкидышей в анамнезе. Средний возраст женщин в группе был 28,9±4,3 (SD) лет. Типирование *HLA-G* Thr31Ser (rs41551813) в экзоне 2, *HLA-G* Leu110Ile (rs12722477) и *HLA-G I*597 ΔC (rs41557518) в экзоне 3 проводили методом асимметричной ПЦР в режиме реального времени. Полиморфизм гена *HLA-G* (14 bp Ins/Del, rs66554220) определяли с помощью электрофоретического разделения продуктов амплификации. Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ GenABEL, Genetics программного обеспечения R-project (www.r-project.org). Соответствие частот генотипов гена *HLA-G* равновесию Харди-Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. Нулевую гипотезу отвергали при $P \le 0,05$. Отношение шансов (OR) и его доверительный интервал (95%CI) оценивали с помощью логистического регрессионного анализа для аддитивной модели наследования признака.

Результаты. Распределение частот генотипов rs41551813, rs12722477, rs41557518 и rs66554220 в контроле и среди женщин групп I и II соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($P > 0,05$). Выявлена ассоциация полиморфизма Leu110Ile (rs12722477) гена *HLA-G* у женщин с двумя выкидышами (аллель 110Ile: OR = 3,04 [1,71-5,39]; $P_c = 0,001$). Аллель Ins (14 bp Ins/Del, rs66554220) в два раза увеличивал у женщин риск трех и более выкидышей (OR = 2,15 [1,28-3,62]; $P_c = 0,03$). Статистически значимые ассоциации полиморфизмов Thr31Ser (rs41551813) и 1597 ΔC (rs41557518) гена *HLA-G* у женщин с самопроизвольными выкидышами отсутствовали.

Заключение. Полученные нами результаты указывают на то, что полиморфные локусы Leu110Ile (rs12722477) и 14 bp Ins/Del (rs66554220) у женщин могут оказывать влияние на риск развития ранних самопроизвольных выкидышей во время беременности.

ДИАГНОСТИКА РЕЗУС-КОНФЛИКТА И ТАКТИКА ВЕДЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Дударева М.В., Авруцкая В.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии», Ростов-на-Дону, Россия

Резус-конфликт – иммунологическая несовместимость по резус-фактору крови резус-отрицательной матери и резус-положительного плода, характеризующаяся

сенсибилизацией материнского организма. Целью наблюдения беременных при резус-иммунизации является: обследование для выявления сенсибилизации, проведение профилактики резус иммунизации, ранняя диагностика гемолитической болезни плода и ее коррекция, а также определение наиболее оптимальных сроков для родоразрешения. При наличии любого титра антител беременность считается резус сенсибилизированной. Если антитела обнаружены впервые, то определяют их класс. Вероятность возникновения гемолитической болезни новорожденного зависит от различных факторов: материнской аллоимунизации, трансплацентарного пассажа IgG антител к плоду, деструкции эритроцитов плода.

В настоящее время нами используется метод для выявления принадлежности IgG антител системы Резус к субклассам IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, так как риск развития гемолиза при гемолитической анемии зависит как от количества IgG и /или комплемента, покрывающих эритроциты, так и от субклассов этих IgG. За период 2012-2015 годы было обследовано 78 беременных с сенсибилизацией по резус-фактору. Проведено определение принадлежности Rh-антител к субклассам IgG. По полученным данным нами сформированы 2 клинические группы. Первую группу составили пациенты, у которых Rh-антитела принадлежали к субклассам IgG1 и IgG3 (n = 63). Вторую группу составили пациенты, у которых Rh-антитела принадлежали к субклассам IgG2 и IgG4 (n = 15). Всем женщинам с резус-сенсибилизацией, имеющим риск развития анемии плода, проводилось допплерометрическое исследование пиковой систолической скорости кровотока в средней мозговой артерии (ПСС СМА) с учетом показателей для соответствующего срока беременности. Ретроспективно установлено, что у пациенток второй группы признаков анемизации плода во время беременности не обнаружено. У 21 пациентки первой группы по результатам допплерометрии установлено превышение ПСС СМА более 1,5 МоМ, которое потребовало проведение внутриутробной внутрисосудистой гемотрансфузии. 15 пациенток первой группы родоразрешены в сроке 34-35 недель гестации, по состоянию плода. В послеродовом периоде 47 новорожденным от матерей первой группы потребовалось заменное переливание крови.

Таким образом, у пациенток с принадлежностью Rh-антител к субклассам IgG2 и IgG4 не наблюдалось гемолиза эритроцитов, т.к. данные иммуноглобулины не способны активировать комплемент, не вызывают разрушения эритроцитов и не вызывают гемолитическую болезнь новорожденных.

УРОВЕНЬ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ЖЕНЩИН С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Ешимбетова Г.З., Култаева Р.Ш.

Ташкентский институт усовершенствования врачей Министерства здравоохранения РУз, Такент, Узбекистан

Преэклампсия (ПЭ) является актуальной проблемой современного акушерства и занимает ведущее место в структуре материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. По данным различных авторов, частота развития преэклампсии у беременных в нашей стране колеблется от 8 до 20% и не имеет тенденции к снижению. Показано, что патогенез преэклампсии укладывается в синдром системного воспалительного ответа с нарушениями в иммунной системе и дисбалансом цитокиновой регуляции. Целью исследования явилось изучение провоспалительных (IL-1β, IL-8) и противовоспалительных (IL-4) цитокинов у женщин с преэклампсией различной степени тяжести. Обследовано 69 беременных женщин с ПЭ в возрасте от 24 до 36 лет. Из них у 47 –легкая степень ПЭ и у 22 женщин- тяжелая степень. 23 женщин с физиологически протекающей беременностью составили контрольную группу. Изучали уровни про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-8 и IL-4) в сыворотке крови методом ИФА. У беременных с ПЭ легкой степени при поступлении в стационар в сыворотке крови выявлено повышение уровня IL-1β в 1,3 раза (244,6±19,7 пкг/мл, против 185,3±18,9 пкг/мл, $p < 0,05$), IL-8 – в 7 раза (138,4±9,7 пкг/мл, против 19,5± 1,7 пкг/мл, $p < 0,001$) и снижение уровня IL-4 в 2 раза (67,5±6,8 пкг/мл против 140,6±12,6 пкг/мл, $p < 0,01$). А у беременных женщин с ПЭ тяжелой степени эти изменения синтеза цитокинов были более выраженными (IL-1β – 280,5±21,3 пкг/мл, IL-8 – 224,7±17,2 пкг/мл, IL-4 – 33,2±2,3 пкг/мл) ($p < 0,01$-$0,001$).

Таким образом, высокий уровень продукции провоспалительных цитокинов при осложненной беременности свидетельствует об активации гуморального фактора иммунной системы, так как высвобождение иммунорегуляторных факторов, участвующих в патогенезе развития воспалительных реакций (IL-1β, IL-8), характеризует прежде всего функциональное состояние мононуклеарных фагоцитов. Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что сохранение динамического равновесия в системе цитокинов играет важную роль для нормального развития беременности. Процесс изменения уровня цитокинов при неосложненной беременности является важным звеном адаптационной реакции организма беременной женщины. Цитокины Th2-типа способствуют нормальной дифференцировке трофобласта и его полноценной инвазии и, следовательно, опосредуют пролонгирование физиологической беременности. Переключение же на синтез цитокинов Th1-типа и их усиленная продукция приводят к нарушению дифференцировки и инвазии трофобласта с развитием патологии беременности.

КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ НА СИСТЕМНОМ И ЛОКАЛЬНОМ УРОВНЕ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЭНДОМЕТРИТЕ

Конопля А.А., Гавриш С.А., Быстрова Н.А.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. При хронических воспалительных заболеваниях органов женской половой сферы основным пусковым механизмом в развитии иммунного воспаления является микробная инвазия. При этом важное место занимает глубокое изучение состояния функционирования клеточного и гуморального факторов иммунитета, т.к. характер течения и завершения воспалительных заболеваний женских половых органов напрямую зависит от состояния иммуногенеза

Цель и задачи. Установить эффективность фармакологической коррекции иммунных нарушений на системном и местном уровне при хроническом эндометрите (ХЭ).

Материалы и методы. Под наблюдением в гинекологическом отделении Курского городского родильного дома

находились 39 пациенток репродуктивного возраста (18-35 лет) с верифицированным диагнозом: ХЭ в стадии неполной ремиссии. Женщины были разделены на две равные группы, рандомизированы по возрасту, минимальным сопутствующим заболеваниям в стадии ремиссии, прогнозируемой тяжести заболевания, всем было проведено эндоскопическое оперативное вмешательство по поводу эндометрит-ассоциированного бесплодия. В послеоперационном периоде у половины пациенток проводили традиционное лечение, а вторая часть больных дополнительно получала Гепон и Цитофлавин. Иммунные нарушения оценивали по показателям в циркулирующей крови функционально-метаболической активности нейтрофилов, уровню в плазме крови и вагинально-цервикальном смыве IgM, G, A, sIgA, цитокинов, компонентов комплемента и ингибиторов.

Результаты. До лечения у пациенток с ХЭ установлено повышение в плазме крови уровня цитокинов: IFNγ, G-CSF, провоспалительных (TNFα, IL-1β, IL-8, IL-18) и противовоспалительных (IL-4, IL-10), компонентов комплемента C3, C4, C5, C5a и C1-ингибитора. Кроме этого, выявлен дисбаланс в содержании иммуноглобулинов (повышение IgM, снижение G и A), снижение активности и интенсивности фагоцитоза (снижение ФИ, ФЧ, ИАФ) с одновременной активацией кислородзависимых систем полиморфно-ядерных лейкоцитов (повышение НСТ-сп., НСТ-стим., ФРН). Проведенное комплексное стандартное лечение практически не изменило параметры функционально-метаболической активности нейтрофилов, частично нормализовало, но не до уровня здоровых доноров, содержание TNFα, IL-1β, IL-8, IFNγ, C3, C4, C5a-компонентов комплемента и IgA, еще в большей степени повышало уровень противовоспалительных цитокинов, C1-ингибитора системы комплемента и IgM. Применение в стандартном лечении Гепона и Цитофлавина дополнительно корригировало, но не до значений доноров, содержание в плазме крови TNFα, IL-8, IL-4, IFNγ, IgM, активность кислород-зависимых систем нейтрофилов. На местном уровне в вагинально-цервикальном смыве установлено также, как в плазме крови, повышение уровня TNFα, IL-8, C3 и C4, но, в отличие от системного уровня, снижение противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10), C1-ингибитора системы комплемента. Кроме этого, выявлено снижение концентрации секреторного иммуноглобулина sIgA. Стандартное лечение корригирует содержание всех исследованных цитокинов, C3-компонента комплемента, значительно повышает концентрацию sIgA, но не влияет на уровень C4 и C1-ингибитора системы комплемента. Применение Гепона и Цитофлавина дополнительно приближает, но не до уровня нормы, содержание в вагинально-цервикальном смыве IL-8, C4-компонента комплемента и в еще большей степени уровень противовоспалительных цитокинов.

Заключение. Таким образом, при количественном сопоставлении числа нарушенных лабораторных показателей с делением глубины нарушений по степеням установлено, что до начала лечения исследовано 42, из них нарушенными оказались 41 (97,6%), из которых 2-ю и 3-ю степень нарушений имели соответственно 26,8% и 51,2%, что требует обязательной фармакологической коррекции. После проведения стандартного лечения корригировано 63,4% показателей и остались без изменений 36,6%. Следует отметить невысокую качественную сторону фармакотерапии стандартного лечения, т. к. после этого показателей, имеющих 2-ю степень нарушений осталось 34,1% и 3-ю 43,9%. Эффективность использования Гепона и Цитофлавина более оказалась более высокой, т. к. снизила количество неизмененных показателей до 14,6% и повысила корригированных до 80,5%, при этом изменений 2-й и 3-й степени соответственно осталось 31,7% и 36,6%.

АССОЦИАЦИИ АНТИТЕЛ КЛАССА А К ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

Красильникова К.С., Аверьянов А.В., Глушков А.Н.

Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

В связи с широким распространением врождённых пороков развития плода (ВПРП) и других патологических состояний у женщин проблемы иммунологии беременности остаются актуальными по сей день. Особый интерес представляют специфические иммунные реакции на половые гормоны. В многочисленных экспериментах показано существенное влияние активной и пассивной иммунизации различных видов животных против эстрадиола (Es) и прогестерона (Pg) на содержание этих гормонов в сыворотке крови, яичниках и матке а также на саму беременность.

Цель. Исследовать ассоциации антител (АТ) класса А к Es и Pg с врожденными пороками развития плода у беременных женщин.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 283 женщины во II триместре беременности (13-27 недель). По результатам УЗИ на сроке 10-13 недель 101 женщина была отнесена в группу с ВПРП и 186 женщин – в группу с физиологическим течением беременности (ФБ). Материалом для исследования послужила сыворотка венозной крови. IgA-Es и IgA-Pg определяли методом неконкурентного ИФА в собственной модификации с использованием коньюгатов Es- и Pg-BSA. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 с использованием критерия $\chi 2$ с поправкой Йетса для непрерывной вариации. Диагностические границы – пороговый уровень АТ между нормой и патологией – определяли при помощи ROC-анализа.

Результаты. Искомые АТ были обнаружены как у женщин с ФБ, так и с ВПРП. При помощи ROC-анализа были выявлены пограничные значения уровней IgA-Es и IgA-Pg, по которым сравниваемые группы имели наиболее значимые различия. Таковыми оказались: для IgA-Es = 3, для IgA-Pg = 2.

При анализе искомых ассоциаций каждого из них по-отдельности без учёта другого выяснилось, что число случаев с высоким уровнем IgA-Es > 3 у женщин с ВПРП (22,8%) не отличается от такового при ФБ (28,6%, p = 0,35) (табл.). Повышение уровней IgA-Pg > 2 при ВПРП обнаруживали значительно реже, чем в группе сравнения (21,8% против 39,6% соответственно, p = 0,003), при этом OR снижался до 0,4.

Учитывая то, что в каждом отдельном случае возможны различные сочетания уровней двух исследуемых АТ, мы исследовали четыре возможные комбинациями. Отсутствие или низкие уровни IgA-Es ≤ 3, и IgA-Pg ≤ 2 у женщин с ВПРП встречались значимо чаще (72,3%), чем при ФБ (58,8%, p = 0,03). Иными словами отсутствие АТ к ис-

ТАБЛИЦА. ЧИСЛО (N) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (≤) И ВЫСОКИХ (>) УРОВНЕЙ IgA-ES И IgA-Pg И ИХ КОМБИНАЦИЙ У ЖЕНЩИН С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ (ФБ) И С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА (ВПРП) (К ТЕЗИСАМ КРАСИЛЬНИКОВОЙ К.С. И ДР.)

Сочетание АТ	ФБ (n/%)	ВПРП (n/%)	χ^2 (p)	OR (CI 95%)
IgA-Es ≤ 3	130/71,4	78/77,2	0,8(0,35)	
IgA-Es > 3	52/28,6	23/22,8		
IgA-Pg ≤ 2	110/60,4	79/78,2	8,47 (0,003)	2,35 (1,3-4,1)
IgA-Pg > 2	72/39,6	22/21,8		0,4 (0,2-0,7)
IgA-Es ≤ 3, IgA-Pg ≤ 2	107/58,8	73/72,3	4,5 (0,03)	1,8 (1,1-3)
IgA-Es > 3, IgA-Pg ≤ 2	3/1,6	6/6	1,4 (0,23)	
IgA-Es ≤ 3, IgA-Pg > 2	23/12,6	5/4,9	4,4 (0,03)	0,32 (0,1-0,8)
IgA-Es > 3, IgA-Pg > 2	49/30	17/16,8	3,9 (0,04)	0,5 (0,2-0,9)

следуемым гормонам ассоциировано с повышением риска ВПРП. Частота встречаемости высоких уровней только IgA-Es при отсутствии IgA-Pg (IgA-Es > 3, IgA-Pg ≤ 2) в сравнении с комбинацией отсутствия обоих АТ (IgA-Es ≤ 3,IgA-Pg ≤ 2) не отличалась значимо при ВПРП и ФБ (p = 0,23). То есть IgA-Es сами по себе без IgA-Pg не имели взаимосвязи с ВПРП. Повышение уровней только IgA-Pg без IgA-Es (IgA-Es ≤ 3, IgA-Pg > 2) обнаружено значимо реже при ВПРП (4,9%), чем при ФБ (12,6%), со снижением OR до 0,32. Одновременное повышение уровней АТ (IgA-Es > 3,IgA-Pg > 2) встречалось при ВПРП значимо реже, чем при ФБ (16,8% против 30%, p = 0,04) с OR = 0,5.

Таким образом, образование IgA-Pg, вероятно, способствует снижению риска развития ВПРП.

ОСОБЕННОСТИ СЫВОРОТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ DcR3 НА РАННИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ

Крошкина Н.В.[1], Батрак Н.В.[1, 2]

[1] ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

Введение. Одной из важнейших проблем привычного невынашивания беременности является нарушение механизмов иммунологической регуляции фетоплацентарного взаимодействия. При этом центральное место в обеспечении процессов имплантации, инвазии трофобласта, трансформации спиральных артерий, неспецифической защиты от патогенных факторов занимает апоптоз.

Цель и задачи. Целью нашего исследования было изучение особенностей содержания DcR3 в периферической крови у женщин с угрожающим выкидышем и привычным невынашиванием в анамнезе.

Материалы и методы. Основную группу составили 50 женщин с клиникой угрозы прерывания беременности в ранние сроки и привычным невынашиванием. Контрольную группу составили 30 женщин без признаков угрозы прерывания беременности и привычного невынашивания. Содержание DcR3 в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Для выявления особенностей сывороточного содержания DcR3 при угрозе прерывания беременности на ранних сроках и неосложненном течении гестации мы проанализировали частоту встречаемости положительных и отрицательных результатов сывороточного содержания DcR3 у женщин основной и контрольной групп. При оценке содержания DcR3 в сыворотке крови, учитывая предел чувствительности тест-системы 0,3 нг/мл, была установлена достоверно большая частота встречаемости положительных результатов данного показателя в контрольной группе женщин, при этом медиана изучаемого показателя имела тенденцию к повышению в контрольной группе женщин. Заслуживает особого внимания вопрос о взаимосвязи сывороточного содержания DcR3 и развитием плацентарной недостаточности. Нами было установлено, что у женщин как основной, так и контрольной групп развитие плацентарной недостаточности во второй половине беременности было ассоциировано с изначально более высоким содержанием DcR3 в сыворотке крови, чем у женщин без плацентарной недостаточности.

Заключение. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о меньшей вовлеченности «рецептора-ловушки» DcR3 в регуляцию апоптоза на системном уровне при угрозе невынашивания. Вместе с тем, повышение сывороточного содержания DcR3 на ранних сроках беременности было отмечено при развитии плацентарной недостаточности в обеих обследованных группах. Известно, что молекулы DcR3 экспрессируются на клетках синцитио-, цитотрофобласта, эндотелии плаценты. Кроме того, было показано, что DcR3 способен регулировать ангиогенез. Вероятно, участие DcR3 в развитии плацентарной недостаточности определяется нарушением процессов апоптоза при формировании сосудов плаценты.

ДИНАМИКА ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОДАХ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Крукиер И.И., Авруцкая В.В., Левкович М.А., Григорянц А.А., Никашина А.А.

ФГБУ «Ростовский НИИ акушерства и педиатрии» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Нарушение нормального развития гестации во многом зависит от продукции цитокинов, стимулирующих пролиферацию и инвазию трофобласта, контролирующих рост, развитие и регресс сосудов. Указанные процессы в свою

очередь могут сопровождаться формированием различных осложнений беременности, в том числе и сахарным диабетом 1 типа (СД1), являющимся крайне неблагоприятным состоянием как для матери, так и для плода.

Известно, что цитокины участвуют в межклеточных и межсистемных взаимодействиях, дифференцировке, функциональной активности клеток и других процессах. К числу данных полипептидов относятся, прежде всего, интерлейкины, хемокины, факторы роста и другие представители этого типа регуляторов.

Целью настоящей работы явилось изучение содержания цитокинов: фактора некроза опухолей α (TNFα) и интерлейкина 1β (IL-1β) в сыворотке крови и околоплодных водах (ОВ) у беременных женщин с СД1.

Обследовано 45 женщин, из которых у 20 беременность и роды протекали без осложнений (контрольная группа), а у 25 был диагностирован СД1 (основная группа). Материалом исследования служили сыворотка крови, взятая накануне и после родов, и ОВ. Уровень цитокинов (TNFα и IL-1β) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов R&D system (USA).

При осложненной СД1 беременности генерация изученных цитокинов в сыворотке крови имела свои особенности. Так, содержание TNFα, запускающего каскад провоспалительных цитокинов, было повышено накануне родов на 51% ($p < 0,01$), а после родов, напротив, снижалось на 47% ($p < 0,05$). Уровень IL-1β до родов имел тенденцию к повышению, а после родов снижался при данной патологии на 67% ($p < 0,01$) по сравнению с физиологической беременностью.

Современное представление о составе и роли ОВ позволяет с высокой значимостью использовать их для диагностики состояния плода и новорожденного. Так, в них по сравнению с физиологическими показателями были увеличены уровни TNFα в 1,7 раза ($p < 0,01$), IL-1β – на 50% ($p < 0,05$).

Проведенный нами сравнительный анализ содержания цитокинов в сыворотке крови и ОВ у женщин с СД1, позволил сделать заключение о наличии отрицательной корреляционной связи между ними ($r = -0,78$). Это подтверждает взаимосвязь системных и локальных механизмов регуляции гестационных процессов.

Из представленных данных следует, что изменение продукции цитокинов в сыворотке крови и ОВ при осложненной беременности до родов однонаправлено, хотя степень изменений различна, а после родов – разнонаправлено.

Таким образом, состояние интерлейкинового баланса или дисбаланса в гестационных биосредах имеет высокую информативную ценность для суждения о течении беременности и о внутриутробном развитии плода.

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН С ГИПЕРТЕНЗИВНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Кудряшова А.В., Панова И.А., Рокотянская Е.А.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, г. Иваново, Россия

Введение. По данным литературы известно, что развитие гипертензии во многом определяется воспалительными реакциями в различных структурах больших и малых сосудов. При этом у беременных женщин с гипертензивными расстройствами состав лейкоцитарного инфильтрата стенок сосудов значительно отличается от такового у больных с хронической артериальной гипертензией (ХАГ). В ряде исследований была показана значимость лимфоцитов, в развитии ХАГ, в то время как при преэклампсии (ПЭ) на первый план выступают реакции нейтрофилов, естественных киллеров(ЕК) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ).

Цель. На основании изучения характера экспрессии молекул адгезии, выявить особенности трансмиграционного потенциала лимфоцитов периферической крови у беременных женщин с гипертензивными расстройствами различного генеза.

Материалы и методы. обследовали беременных женщин в 22-34 недели гестации. Из них 53 – с неосложненной беременностью (контроль), 34 – с ХАГ, 40 – с ПЭ, присоединившейся к ХАГ (ХАГ+ПЭ), 78 женщин с ПЭ (45 с умеренной ПЭ – УПЭ и 33 с тяжелой ПЭ – ТПЭ). В периферической крови методом проточной цитофлуориметрии определяли уровень $CD11b^+$, $CD11c^+$, $CD31^+$, $CD62L^+$, $CD99^+$ лимфоцитов, в популяциях $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов исследовали относительное содержание $CD31^+$, $CD62L^+$, $CD99^+$ клеток.

Результаты. Проведенные исследования выявили достоверное снижение содержания $CD62L^+$ периферических лимфоцитов, а также уровня CD62L-позитивных клеток в популяции $CD4^+$ лимфоцитов в группах ХАГ, ХАГ+ПЭ, ПЭ по сравнению с показателями при неосложненной беременности. Отличительной чертой групп ХАГ и ХАГ+ПЭ было – снижение уровня $CD11c^+$ лимфоцитов, в то время как в группе ПЭ и в подгруппе ТПЭ данный показатель был достоверно выше, чем в контрольной группе. Наряду с этим в группах ПЭ и ХАГ+ПЭ, и в подгруппе ТПЭ, в периферической крови достоверно возрастало содержание $CD11b^+$ лимфоцитов. Содержание $CD31^+$ клеток в популяции лимфоцитов во всех исследуемых группах женщин с гипертензивными расстройствами при беременности не имело достоверных различий по сравнению с показателями при неосложненной беременности, однако, в популяции $CD8^+$ лимфоцитов отмечалось снижение уровня $CD31^+$ клеток в группах ПЭ и ХАГ+ПЭ, в подгруппах УПЭ и ТПЭ. Причем при тяжелой преэклампсии уровень $CD31^+$ клеток снижался и в популяции $CD4^+$ лимфоцитов по сравнению с контролем. Уровень $CD99^+$ клеток в популяции $CD8^+$ лимфоцитов в группах ПЭ и ХАГ+ПЭ был достоверно снижен по сравнению с таковым в группе с ХАГ.

Заключение. Выявленные закономерности изменений в экспрессии молекул адгезии могут определять различия в патогенетической значимости лимфоцитов и их популяцийпри ХАГ и при ПЭ у беременных. Во всех исследованных группах снижалось содержание клеток экспрессирующих L-селектин,обеспечивающего начальное прикрепление и роллинг лимфоцитов по стенке сосудов, в наибольшей степени в популяции Th. Возможно, данный факт определялся усилением дифференцировки Th до высокоэффекторных стадий, не экспрессирующих молекулы L-селектина, с последующей задержкой в системном кровотоке и участием этих клеток в развитии SIRS. В то же время в группах с преэклампсией лимфоциты усиливали экспрессию молекул, способствующих плотному прикреплению к эндотелию (CD11b, CD11c), но снижали экспрессию молекул, обеспечивающих экстравазацию клеток в более глубокие структуры стенки сосуда (CD31, CD99). Так как молекулы CD11b и CD11c в большей степени экспрессируются ЦТЛ и ЕК, а снижение уровня $CD31^+$ и $CD99^+$ клеток

в основном было отмечено в популяции ЦТЛ, можно предположить, что такое соотношение экспрессии молекул адгезии способствовало развитию цитотоксических реакций в эндотелии сосудов, в максимальной степени проявляющихся при тяжелой форме преэклампсии.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СИСТЕМЫ МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (M-CSF) У ЖЕНЩИН С ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ФОРМОЙ БЕСПЛОДИЯ

Лапштаева А.В., Радаева О.А., Новикова Л.В.

ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, Россия

Введение. Роль цитокинов в основных репродуктивных процессах: фолликулогенезе, овуляции, оплодотворении и имплантации плодного яйца не вызывает сомнения. Однако в классических рекомендациях по ведению пациенток с бесплодием клинико-патогенетическая значимость данных факторов недооценена. Ввиду достаточно низкой результативности и высокой стоимости проведения экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) возникает необходимость в новых исследованиях иммуноопосредованных механизмов наступления беременности.

Цель. Изучить взаимосвязь сывороточного уровня M-CSF и полиморфных вариантов гена его рецептора CSF1R с наступлением беременности при проведении процедуры ЭКО у женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия.

Материалы и методы. Проведено комплексное обследование 120 женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия (возраст – 35,2±2,5 лет), с коротким протоколом ЭКО, завершившимся переносом эмбрионов. Контрольная группа – 100 здоровых женщин с доказанной фертильностью, сопоставимых по возрасту. Первичным результатом считали наступление беременности по результатам УЗИ, проведенного через 14 дней после получения положительного результата ХГЧ. Концентрацию M-CSF определяли иммуноферментным методом с помощью тест-систем производства R&D Systems (США). Материалом для генетического исследования служили образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов венозной крови женщин на автоматической станции QIAcube с использованием набора реагентов QIAamp DNA MiniKit (оборудование и реактивы производства QIAGEN, Германия). В гене CSF1R методом ПЦР с последующим секвенированием исследовали следующие полиморфные маркеры: rs3216780 и динуклеотидный полиморфизм rs386693509 в 3'UTR области гена. В качестве референсной использовали нуклеотидную последовательность NG_012303.1. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения.

Результаты. Анализ содержания M-CSF в сыворотке крови женщин с трубно-перитонеальным бесплодием показал значимое его увеличение ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой 326 (5,8) пг/мл и 56 (1,3) пг/мл соответственно. При интерквартильном анализе распределения сывороточных концентраций M-CSF и эффективности цикла ЭКО выявлено, что у женщин, относящихся ко II квартилю повышения M-CSF ([241-320 пг/мл], 44 чел.) частота наступления беременности была максимальной – 59% (26 чел.). У женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия не выявлено достоверных различий в распределении полиморфных вариантов в rs386693509 в 3'UTR области гена CSF1R (TC/TC – 59,2% (71 чел.), CA/CA – 6,6% (8 чел.), TC/CA– 34,2% (41 чел.)) и в rs3216780 в 3'UTR области гена CSF1R (G/G – 40% (48 чел.), DEL/G – 54,2% (65 чел.), DEL/DEL– 5,8% (7 чел.)), по сравнению со здоровыми женщинами (TC/TC – 62% (62 чел.), CA/CA – 10% (10 чел.), TC/CA – 28% (28 чел.)), и (G/G – 33% (33 чел.), DEL/G – 59% (59 чел.), DEL/DEL – 8% (8 чел.)), $\chi^2 = 1,47$, $p > 0,05$ и $\chi^2 = 1,33$, $p > 0,05$ соответственно. Следовательно, генотипы TC/CA (OR = 9,66, 95% ДИ = [3,95-23,6], $p < 0,05$) и DEL/G (OR = 9,12, 95% ДИ = [3,22-25,8], $p < 0,05$) выступают как условно прогностически благоприятные для наступления беременности при проведении процедуры ЭКО. При моноанализе на основе выбранных генетических характеристик вероятность наступления беременности у женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия в результате проведения протокола ЭКО определяется с низкой чувствительностью – 40%, но высокой специфичностью – 82%. Ввиду того что благоприятный исход процедуры ЭКО ассоциирован с концентрацией M-CSF 241-320 пг/мл и генотипами TC/CA в rs386693509 и DEL/G в rs3216780 в 3'UTR области гена CSF1R при их одновременном анализе специфичность при определении вероятности наступления беременности возрастает до 87%, а чувствительность – 79%

Заключение. Анализ уровня M-CSF с учетом генетических особенностей женщин с трубно-перитонеальным бесплодием открывает перспективы персонализированного подхода при определении вероятности наступления беременности в результате цикла ЭКО.

ПАССИВНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ СТЕРИЛЬНОСТИ

Левкова Е.А.[1], Савин С.З.[2], Емельянова Э.Б.[3], Смиренина И.В.[4], Гребеняк О.А.[4], Пушкарь В.А.[5]

[1] Социально-гуманитарный институт ФГОУ ВО «Дальневосточный государственный университет путей сообщений», Хабаровск, Россия
[2] Вычислительный Центр ДВО РАН, Хабаровск, Россия
[3] ГБУЗ «Городская клиническая больница имени С.П. Боткина» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия
[4] КГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения» Хабаровск, Россия
[5] ООО «Иммунореабилитационный центр», Хабаровск, Россия

Введение. Сокращение численности населения Российской Федерации рассматривается сейчас как угроза национальной безопасности России. Отсутствие воспроизводства населения уже в ближайшем будущем приведет к сокращению трудоспособной доли населения и увеличению доли населения пенсионного возраста. Это вызовет увеличение нагрузки на социальные статьи бюджета, снижение темпов экономического роста и деградацию общества. По данным Министерства здравоохранения РФ, бесплодные браки составляют 17% от всех брачных пар, около 6 млн супружеских пар бесплодны. Из общих причин бесплодия в браке на патологию иммунной системы приходится более 10%. Наиболее значимыми факторами в решении проблемы бесплодного брака являются детализация причин бесплодного брака и способов их устранения.

Цель и задачи. Применение пассивной иммунотерапии для лечения пациенток с различными формами

бесплодия. Ключевая задача исследования – провести лечение женщин с различными формами бесплодия с применением пассивных методов иммунотерапии – иммуноглобулинов класса G, исходя из общепринятой концепции иммунологической толерантности и особенностей ее формирования во время беременности.

Материалы и методы. Длительность про- и ретроспективных исследований по применению пассивной иммунотерапии у пациенток с различными формами бесплодия составила 17 лет. Для клинико-статистического исследования была выбрана когорта женщин в количестве 46 чел. Возрастной диапазон женщин 28-42 года. Диагноз N97 был установлен у 37 пациенток (80,43%). Общий объем пассивной иммунотерапии составлял не менее 300 мл для внутривенного введения. Параметры иммунной системы определяли по рекомендациям (Петров Р.В. Иммунология и иммуногенетика. М.: Медицина, 1976. 336 с.). Показания для применения пассивной иммунотерапии: длительность бесплодия более 1 года; увеличение цитолитического потенциала ($CD3^-CD16^+$,$CD56^+$) от нормы 9% в 1,5 раза; снижение иммуноглобулина G (норма взрослого человека с 18 до 60 лет – 14+2 г/л); значительная инфекционная контаминация, особенно по инфекциям семейства герпес; сходство родителей по вариантам генов HLA класса II гистосовместимости (Сидельникова В.М., 2013).

Результаты. Применение пассивной иммунотерапии в комплексном лечении у 44 женщин привело к наступлению беременности. В процессе использования пассивной иммунотерапии не зафиксированы местные и системные осложнения, в том числе аллергического характера.

Заключение. Использование пассивной иммунотерапии, с учетом критериев назначения, позволяет добиться положительных результатов в комплексном лечении пациенток с различными формами бесплодия в 95,6% случаев.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК ПАМЯТИ В ПОПУЛЯЦИИ $CD8^+$ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ УГРОЗЕ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДОВ

Мишарина Л.В., Борзова Н.Ю., Васин И.А.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н.Городкова» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

Введение. В настоящее время в связи с широким развитием возможностей иммунологии репродукции изучение иммунологических аспектов беременности и ее прерывания стало одним из самых актуальных и перспективных, и все больше исследователей приходят к выводу о значительной роли скоординированной работы врожденной и адаптивной систем иммунитета в развитии невынашивания беременности. Важным механизмом иммунорегуляции при беременности является активация Т-лимфоцитов и изменение характера их дифференцировки. В процессе формирования «иммунологической памяти» клетки проходят 4 стадии дифференцировки, которые получили название наивных клеток, центральных клеток памяти, претерминально-дифференцированных эффекторных клеток памяти и терминально-дифференцированных клеток памяти, характеризующихся различной экспрессией молекул. Однако до сих пор нет данных о характере дифференцировки $CD8^+$ лимфоцитов при угрозе преждевременных родов.

Цель и задачи. Целью исследования было установить особенности дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в периферической крови пациенток с угрожающими преждевременными родами в сроке гестации 25-33 недели 6 дней для уточнения механизмов развития невынашивания беременности.

Материалы и методы. Было проведено обследование 12 женщин с угрожающими преждевременными родами (основная группа) в 25-33 недели 6 дней и 15 женщин с неосложненным течением беременности в эти же сроки гестации (контрольная группа). Материалом для исследования служила периферическая кровь. Методом многоцветной проточной цитометрии определяли содержания наивных, центральных, претерминально-дифференцированных и терминально-дифференцированных клеток памяти в популяции ЦТЛ ($CD8^+$).

Результаты. По предварительным данным у всех пациенток с угрозой преждевременных родов в периферической крови было выявлено статистически значимое повышение уровня претерминально-дифференцированных клеток памяти в популяции $CD8^+$ лимфоцитов по сравнения с аналогичным показателем группы женщин с неосложненным течением беременности. Анализируя данные содержания наивных клеток, центральных и терминально-дифференцированных клеток памяти в популяции цитотоксических Т-лимфоцитов мы не выявили достоверных различий между сравниваемыми группами.

Заключение. Таким образом, для женщин с угрожающими преждевременными родами характерен сдвиг системной дифференцировки $CD8^+$лимфоцитов в сторону увеличения пула претерминально-дифференцированных клеток памяти. Можно предположить, что нарушение дифференцировки лимфоцитов может вести к изменению иммунорегуляции, определяя неадекватный иммунный ответ матери на антигены плода, приводя тем самым к формированию патологии беременности. Образование зрелых эффекторных клеток, по данным литературы, определяется длительным характером стимуляции клетки через комплекс TCR/CD3/CD2 специфическим антигеном, особым цитокиновым и гормональным микроокружением. Можно предположить, что эти факторы сыграли ведущую роль в увеличении пула претерминально-дифференцированных цитотоксических Т-лимфоцитов при угрозе преждевременных родов.

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИЕЙ В РЕЗУЛЬТАТЕ ИММУНОКОРРИГИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ

Мусаходжаева Д.А., Каландарова А.Н.

Республиканский научный центр иммунологии Министерства здравоохранения РУз, Нукусский филиал скрининг центра, Ташкент, Нукус, Узбекистан

В структуре гинекологических заболеваний патология шейки матки составляет 17-48%. Причиной возникновения патологических состояний шейки матки могут быть воспалительные заболевания органов малого таза, инфекционные процессы, сопровождающиеся персистенцией возбудителя в генитальном тракте и т.д. Заболевания шейки матки сопровождаются иммунологическими изменениями, как репродуктивной сферы, так и иммуно-

логическими сдвигами системного иммунитета, что предполагает применение иммуномодулирующих лекарственных средств в гинекологической практике.

Целью данного исследования явилось изучить динамику иммунологических параметров в результате комплексного лечения с включением иммунокорригирующей терапии у женщин с различной степенью ЦИН. Было обследовано 58 женщин с ЦИН I и II степени, проживающие в регионе Приаралья. Возраст обследованных женщин был в пределах 20-40 лет. Иммунологические исследования проводили до и после лечения изучением количества лимфоцитов с фенотипом CD3, CD4, CD8, CD16, CD20 с помощью моноклональных антител серии LT (Ин-т иммунологии, ТОО «Сорбент», Москва, Россия). Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли с использованием латексных частиц. Уровень иммуноглобулинов определяли методом радиальной иммунодиффузии по Manchini (моноспецифические сыворотки института им. Н.Ф. Гамалеи, Москва). В качестве корригирующего препарата использовали Эндоферон (ГАК «УЗФАРМСАНОАТ» РУз) и Циклоферон. В зависимости от вида лечения все больные были разделены на две группы: I группу составили 25 женщин, которым назначали Циклоферон в/м по схеме. II группу составили 33 пациентки, которым назначали Эндоферон в/м по схеме: по 2 мл на 1, 2, 4, 6 и 8 день лечения. При показании проводилась лазеровапоризация патологических участков шейки матки, влагалища, наружных половых органов и кондилом. Через 1 месяц курс лечения проводился повторно. Было выявлено, что при ЦИН у женщин наблюдается уменьшение числа $CD4^+$Т-клеток ($P < 0,05$), повышение содержания $CD8^+$Т-клеток ($p < 0,05$), депрессия иммунорегуляторного индекса $CD4^+/CD8^+$ ($p < 0,01$). Повышение числа $CD8^+$ клеток, по-видимому, связано с усилением цитотоксической активности в зоне дисплазии шейки матки. Уровень $CD16^+$ и $CD20^+$ клеток у женщин с ЦИН был достоверно повышенным по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,01$).

При исследовании гуморального звена иммунитета у обследованных женщин отмечено повышение уровня IgM ($P < 0,01$) и сниженный уровень IgG и IgA ($p < 0,05$). Фагоцитарная активность нейтрофилов у женщин с ЦИН была сниженной в 1,3 раза ($p < 0,05$). Степень выраженности количественного дефицита активно фагоцитирующих нейтрофилов была прямо пропорциональна усугублению тяжести ЦИН. Повторное исследование по изучению некоторых параметров иммунной системы показало, что лечение с включением Циклоферона способствовало положительной динамике изученных параметров. Сравнительный анализ проведенных исследований показал, что под влиянием применения Эндоферона наблюдалось восстановление содержания в крови $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ лимфоцитов, а так же индекса иммунорегуляции ($CD4^+/CD8^+$), приблизилось к норме и процентное содержание фагоцитарной активности нейтрофилов. На этом же фоне уровень $CD16^+$ клеток достоверно снизился ($P < 0,01$). Положительная динамика наблюдалась и в содержании иммуноглобулинов основных классов ($P < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о повышении иммунологической эффективности проведенного комплексного лечения с включением иммунокорригирующих препаратов у женщин с ЦИН. Клиническая эффективность как Циклоферона, так и Эндоферона проявилось в улучшении состояния.

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКТИВНОГО МОДУЛЯТОРА РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА НА ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МАКРОФАГОВ ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С ЛЕЙОМИОМОЙ МАТКИ БОЛЬШИХ РАЗМЕРОВ

Нагорный С.Н., Воронин Д.Н., Малышкина А.И., Анциферова Ю.С., Кирсанов А.Н.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н.Городкова» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

Введение. Развитие и рост лейомиомы матки, доброкачественной опухоли миометрия, происходит на фоне выраженных нарушений иммунного ответа в эндометрии, непосредственно прилегающем к миометрию. Предполагают, что триггерным фактором, запускающим патологический процесс в миометрии, является прогестерон, которые через свои рецепторы регулируют в опухоли транскрипционную активность генов, ассоциированных с клеточной пролиферацией. В связи с этим, в последнее время интенсивно разрабатываются медикаментозные препараты, относящиеся к классу селективных модуляторов рецепторов прогестерона, применение которых, блокируя действие прогестерона, позволило бы добиться уменьшения размеров опухоли. Однако механизм действия этих препаратов изучен недостаточно. Нет данных о влиянии модуляторов рецепторов прогестерона на состояние и функцию фагоцитов эндометрия.

Цель и задачи. Целью исследования было установить влияние селективного модулятора рецепторов прогестерона – улипристала ацетата на уровень М1 и М2 макрофагов в эндометрии пациенток с лейомиомой матки больших размеров.

Материалы и методы. Было обследовано 37 пациенток с лейомиомой матки, из них 20 пациенток прошли курс предоперационной подготовки, получая в течение 3 месяцев 5 мг улипристала ацетата ежедневно, 17 пациенток были без предоперационной подготовки. Всем женщинам проводилось оперативное лечение лейомиомы матки. Материалом для исследования служили взятые в ходе операции биоптаты ткани миоматозных узлов и эндометрия, расположенного непосредственно под миоматозным узлом и локализованного вдали от опухоли. У пациенток, получавших улипристала ацетат, эндометрий брался дважды – до начала лечения и в ходе операции. Эндометрий 10 фертильных здоровых пациенток использовали в качестве контроля. Из эндометрия выделяли популяцию мононуклеарных клеток. Уровень М1 ($IL\text{-}12^+$, $IL\text{-}1\beta^+$, $IFN\gamma^+$) и М2 ($TGF\text{-}\beta1^+$, $IL\text{-}10^+$, $CD163^+$) эндометриальных макрофагов определяли с помощью моноклональных антител методом проточной цитометрии. Кроме того, методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени в миоматозных узлах определяли экспрессию Ki-67.

Результаты. Отличительной чертой эндометрия различной локализации при лейомиоме матки больших размеров было повышенное по сравнению с контрольной группой содержание $IL\text{-}10^+$, $IL\text{-}1\beta^+$ и $IFN\gamma^+$ макрофагов. При этом пациентки с пролиферирующими $Ki\text{-}67^+$ миоматозными узлами характеризовались высоким уровнем $TGF\text{-}\beta1^+$, $CD163^+$ макрофагов и сниженным содержанием $IL\text{-}12^+$ и $IFN\gamma^+$ макрофагов в эндометрии, тогда как при лейомиомах с низкой пролиферативной активностью ($Ki\text{-}67^-$) отмечался высокий уровень $IL\text{-}1\beta^+$ и $IFN\gamma^+$ эндометриальных макрофагов. Таким образом, проли-

ферративная активность клеток лейомиомы коррелирует с содержанием М1 и М2 макрофагов в эндометрии, что свидетельствует о возможном вовлечении эндометриальных макрофагов в регуляцию роста лейомиомы матки. Терапия улипристала ацетатом позволила в целом добиться уменьшения размеров опухоли, однако значимые изменения отмечались только у 60% пациенток, тогда как в 40% случаев размеры опухоли не изменялись или даже увеличивались. Связи динамики размеров узлов с активностью пролиферации опухолевых клеток мы не выявили. Анализ популяционного состава эндометриальных макрофагов показал, что уменьшение размеров опухоли в результате лечения происходило в тех случаях, когда в эндометрии изначально было повышено количество TGF-β1$^+$ макрофагов, а после лечения в эндометрии, расположенном в непосредственной близости от опухоли, увеличивалось содержание IFNγ$^+$ и CD163$^+$ макрофагов. У тех пациенток, у которых происходило увеличение размеров миомы матки после лечения улипристала ацетатом, изначально в эндометрии, локализованном в непосредственной близости от опухоли, отмечалось максимально высокое содержание IL-10$^+$, CD163$^+$ и IFNγ$^+$ макрофагов при низком уровне IL-12$^+$ макрофагов. После лечения у этих пациенток падало содержание CD163$^+$ и TGF-β1$^+$ макрофагов вдали от узла и повышался уровень IL-12$^+$ клеток вблизи от опухоли.

Заключение. Таким образом, эффективность терапии улипристала ацетатом зависит от изначального иммунологического фона в эндометрии. Уменьшение размеров узлов происходит в тех случаях, когда лечение приводит к сбалансированной активации М1 и М2 пулов макрофагов, тогда как увеличение размеров опухоли наблюдается при активации провоспалительных М1 клеток. (Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-05042).

ЗАВИСИМОСТЬ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ЖЕНЩИНЫ ОТ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ ПОЛОВОГО ПАРТНЕРА

Николаева М.А., Бабаян А.А., Степанова Е.О., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Иванец Т.Ю., Ванько Л.В.

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

В многочисленных экспериментальных исследованиях было установлено, что семенная плазма (СП) оказывает иммуномодулирующее действие на функции эндометрия, в связи с чем и были предприняты попытки использовать введение СП в репродуктивный тракт женщин для усиления рецептивности эндометрия и повышения эффективности программы ЭКО. Однако до сих пор не удалось подтвердить позитивное влияние введения СП партнера в цикле ЭКО/ИКСИ. Результаты экспериментальных исследований подтверждают, что содержащийся в СП трансформирующий фактор роста β1 (TGF-β1) является ключевым фактором формирования иммунной толерантности матери к антигенам плода, влияя на уровень регуляторных Т-клеток (Treг). Мы предположили, что эффекты введения СП могут определяться не только содержанием TGF-β1, но и уровнем других цитокинов, возможно, препятствующих реализации эффектов TGF-β1. Ранее установлено, что антагонизм в отношении к TGF-β1 проявляет интерлейкин-18 (IL-18)

Целью настоящего исследования явилось определение прогностической значимости определения содержания TGF-β1 и IL-18 в СП полового партнера при оценке эффективности лечения методом ЭКО/ИКСИ и зависимости между содержанием TGF-β1 и IL-18 в СП полового партнера и уровнем Treг с фенотипом CD4$^+$CD25^{high}CD127$^{low/-}$ в периферической крови пациенток.

В исследование были включены супружеские пары (n = 71), проходившие лечение бесплодия методом ЭКО/ИКСИ, дополненного интравагинальным введением СП партнера в день проведения трансвагинальной пункции (ТВП). Содержание в СП цитокинов TGF-β1 и IL-18 оценивали с использованием наборов Human TGF-β1 и IL-18 FlowCytomix Simplex Kits (Bender MedSystems, Vienna, Австрия). Забор крови проводили в день проведения ТВП яичников. Для оценки процентного содержания Treg среди CD4$^+$ лимфоцитов использовали стандартный набор моноклональных антител (Human Regulatory T Cell Cocktail, Becton Dickinson, США). Количественную оценку концентраций цитокинов и уровня Treg-клеток проводили с помощью проточного цитофлюориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

У пациенток с успешным исходом лечения концентрация IL-18 в СП партнера была статистически значимо ниже по сравнению с аналогичным показателем половых партнеров женщин, у которых беременность не наступила (p = 0,018). Концентрация TGF-β1 в СП партнеров пациенток с успешным и неудачным исходами программы ЭКО/ИКСИ не различалась. В то же время соотношение TGF-β1/IL-18 в группе пациенток с успешным исходом лечения было значимо выше по сравнению с аналогичным показателем в группе женщин с неудачной попыткой ЭКО и составило 470±228 и 363±146, соответственно (p = 0,02). С помощью ROC-анализа было показано, что наиболее значимым предиктором успеха программы ЭКО/ИКСИ является общее содержание IL-18 в эякуляте (AUC = 75%, чувствительность и специфичность теста – 94% и 51%, соответственно). В группе пациенток, эякулят половых партнеров которых содержал относительно низкое количество IL-18 (≤ 1432,4 пг) частота наступления беременности была в 6,7 раз выше по сравнению с пациентками, в СП половых партнеров которых отмечался относительно высокий уровень IL-18 (> 1432,4 пг), и составляла 61,2% и 9,1% соответственно (p < 0,0001).

Была обнаружена позитивная корреляционная зависимость между содержанием Treg клеток в день ТВП как от концентрации IL-18 (r = 0,47; p = 0,01), так и от общего количества IL-18 в эякуляте (r = 0,42; p = 0,02). При оценке корреляционной связи между содержанием Treg клеток в периферической крови пациенток в день ТВП и соотношением TGF-β1/IL-18 в СП половых партнеров отмечалась статистически значимая обратная корреляционная зависимость (r = -0,52; p = 0,008). У пациенток с наступившей беременностью было выявлено снижение доли Treg среди CD4$^+$ лимфоцитов по сравнению с пациентками с неудачной попыткой ЭКО/ИКСИ (P = 0,0045) – медиана составила 5,0% (3,0-7,6%) и 6,7% (3,8-14,2%) соответственно.

Таким образом, успешная имплантация при проведении программы ЭКО с применением аппликации СП происходит на фоне снижения содержания Treg периферической крови в день трансвагинальной пункции, возможно, обусловленной усилением миграции Treg в региональные лимфоузлы или матку. Изменения Т-клеточного звена иммунитета, в свою очередь, определяются цитокиновым профилем СП, поступающей в репродуктивный тракт женщины. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения клинической значимости полученных результатов.

ВЛИЯНИЕ АНТИГИПЕРТЕНЗИВНОЙ ТЕРАПИИ НА ЭКСПРЕССИЮ L-СЕЛЕКТИНА И CX3CR1 ЛЕЙКОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ГИПЕРТЕНЗИВНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ

Панова И.А., Кудряшова А.В., Рокотянская Е.А., Парейшвили В.В.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

Введение. Проведение адекватной антигипертензивной терапии в период беременности должно способствовать максимальному снижению общего риска сердечно-сосудистых и церебрально-сосудистых заболеваний в будущем, неблагоприятных перинатальных исходов. В настоящее время появляется все больше данных об ассоциации различных форм гипертензивных расстройств с развитием внутрисосудистой воспалительной реакции. Это определяет необходимость оценки влияния антигипертензивной терапии у беременных на функциональную активность клеток врожденного иммунитета, в том числе миграционную.

Цель. Оценить изменения в экспрессии L-селектина и рецептора фракталкина моноцитами и нейтрофилами у беременных женщин с артериальной гипертензией при различных видах антигипертензивной терапии.

Материалы и методы. Обследовано 55 женщин с артериальной гипертензией в сроке от 22 до 36 недель беременности: 1 группу составили 25 пациенток с существовавшей ранее АГ (код по МКБ-Х О10.0); 2 – 30 женщин с преэклампсией средней степени тяжести (код по МКБ-Х О14.0) и с ХАГ и присоединившейся ПЭ (код по МКБ-10 О11). Группу контроля составили 50 женщин без АГ. Исследование проводилось до и на 5-е сутки после начала гипотензивной терапии. В каждой группе были выделены подгруппы: 1 – получавшие монотерапию (альфа2-адреномиметики), 2 – получавшие комбинацию препаратов (альфа2-адреномиметики, блокаторы кальциевых каналов и/или β-адреноблокаторы). В периферической крови беременных определяли относительное содержание моноцитов и нейтрофилов экспрессирующих рецептор фракталкина CX3CR1, а также молекулы L-селектина – CD62L.

Результаты. В группе женщин с ХАГ исходный уровень CD62L-позитивных клеток в популяциях моноцитов и нейтрофилов не отличался от показателей в контрольной группе, но имел тенденцию к повышению в популяции нейтрофилов на 5 день лечения независимо от вида терапии. В популяции моноцитов в группе ХАГ только комплексная терапия определяла тенденцию к повышению уровня $CD62L^+$ моноцитов. В группе с преэклампсией исходный уровень $CD62L^+$ моноцитов и нейтрофилов был достоверно снижен по сравнению с показателями в контрольной группе. Проводимое лечение не оказывало значительного влияния на относительное содержание $CD62L^+$ моноцитов, но определяло тенденцию к повышению уровня $CD62L^+$ нейтрофилов при монотерапии и достоверно повышало данный показатель до нормативных значений при комбинированной терапии. Исходное содержание CX3CR1 клеток в группе ХАГ имело тенденцию к снижению в популяции моноцитов, и было достоверно сниженным в популяции нейтрофилов. В этой группе оба вида терапии не вызывали значимых изменений в содержании $CX3CR1^+$ моноцитов и нейтрофилов. В группе с ПЭ до лечения уровень $CX3CR1^+$ клеток был сниженным только в популяции нейтрофилов. Монотерапия при ПЭ определяла достоверное снижение уровня $CX3CR1^+$ моноцитов и тенденцию к снижению в популяции нейтрофилов, в то время как комплексная терапия сочеталась с достоверным снижением содержания $CX3CR1^+$ нейтрофилов и тенденцией к снижению в популяции моноцитов.

Заключение. Выбор антигипертензивного препарата для беременной женщины с учетом влияния на плацентарный кровоток, требует анализа всех плюсов и минусов предполагаемого лечения. Полученные результаты позволяют оценить воздействие терапии на процессы инициации воспаления, определяемые адгезией клеток к эндотелию сосудов и последующему хемотаксису. Известно, что элюция L-селектина под действием медиаторов воспаления позволяет лейкоцитам разорвать связь с клетками эндотелия и мигрировать в подлежащие ткани. Отмеченные нами изменения могли определяться противовоспалительным эффектом альфа2-адреномиметиков, приводящему к ослаблению адгезии нейтрофилов при всех формах гипертензивных расстройств у беременных и ослаблению хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов при ПЭ. Применений комплексной терапии ПЭ позволяло проявляться позитивным эффектам, в максимальной степени. Таким образом, лучшее понимание ключевых моментов регуляции трансмиграции лейкоцитов может помочь в разработке персонифицированных схем лечения гипертензии у беременных.

ОЦЕНКА ИНДУКЦИИ РЕЦЕПТОРНОГО АПОПТОЗА У FAS-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Плосконос М.В.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Астрахань, Россия
ФГБОУ ВО ВГУВТ «Каспийский институт морского и речного транспорта», Астрахань, Россия

Введение. Апоптозу, как фундаментальному процессу регулирования иммунной системы, принадлежит важная роль в регуляции сперматогенеза. Однако, недостаточно

сведений о факторах, вызывающих апоптоз половых клеток и, как следствие, нарушение фертильности. Известными маркёрами апоптоза являются белки мембраны клеток – рецептор Fas (CD95) и его лиганд FasL, через которые реализуется рецепторный (мембранный) механизм апоптоза. Мнение исследователей касаемо экспрессии Fas и FasL на поверхности зрелых эякуляторных сперматозоидов неоднозначно, что диктует необходимость дальнейших исследований в этом направлении. Кроме того, нет данных об индукции рецепторного апоптоза через Fas-рецептор на сперматозоидах человека.

Цель. Выявить экспрессию Fas-антигена на сперматозоидах мужчин разной фертильности и попытаться индуцировать апоптоз гамет при помощи рекомбинантного FasL.

Материалы и методы. Исследованы эякуляты 46 фертильных и 78 субфертильных мужчин. Определение на сперматозоидах Fas проводили меченными фикоэритрином (PE) моноклональными антителами CD95 (Caltag Lbs.), с последующей флуоресцентной микроскопией. Эякуляты, положительные по Fas, делили на две части: 1) отмытые сперматозоиды инкубировали 4 ч в среде В-2 с 5% CO_2 при 37°С (контроль); 2) сперматозоиды инкубировали 4 ч при тех же условиях, только с добавлением 1 мг/мл рекомбинантного FasL (Kamiya Bi-omedical Company, USA) (опыт). После инкубации документировали апоптоз при помощи конъюгированного с флуорохромом Аннексина-V (AnV-FITC) и йодида пропидия (PI), подсчитывая количество (AnV^+/PI^-)-сперматозоидов на флуоресцентном микроскопе МИКРОМЕД 3 ЛЮМ (Санкт-Петербург).

Результаты. Выявлено, что Fas-экспрессия на сперматозоидах фертильных мужчин наблюдалась почти в 90% случаев (у 41 из 46 мужчин), но количество (Fas^+)-гамет оказалось менее 10%. У 53% обследованных субфертильных мужчин (у 41 из 78) более 10% сперматозоидов оказались Fas-положительными.

Далее эксперимент по индукции рецепторного апоптоза проводили с эякулятами мужчин, в которых выявлены (Fas^+)-гаметы. После 4-часовой инкубации клеток с 1 мг/мл рекомбинантного FasL (опыт) изменение количества (AnV^+/PI^-)-сперматозоидов по сравнению с контролем было стастистически не достоверно ($p > 0,05$).

Заключение. Таким образом, у сперматозоидов мужчин разной фертильности не удалось индуцировать рецепторный апоптоз. Вероятно, Fas-рецепторы на гаметах не активны или не функционируют после эякуляции, а экспрессия Fas-антигена произошла ещё в период сперматогенеза, и (Fas^+)-клетки должны были быть устранены в процессе апоптоза, но по каким-либо причинам механизмы рецепторного апоптоза не были закончены, либо были отложены, либо функционировали неправильно.

Однако выявленные различия в экспрессии Fas-антигена на сперматозоидах фертильных и субфертильных мужчин могут представлять интерес для практической андрологии, так как позволят дополнить диагностический арсенал при исследовании мужской репродуктивной функции.

FAS-АНТИГЕН КАК ПОКАЗАТЕЛЬ КАЧЕСТВА СПЕРМАТОЗОИДОВ

Плосконос М.В.[1, 2], Николаев А.А.[1], Зульбалаева Д.Ф.[3], Бондаренко С.К.[3]

[1] ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Астрахань, Россия
[2] ФГБОУ ВО ВГУВТ «Каспийский институт морского и речного транспорта», Астрахань, Россия
[3] ГБУЗ Астраханской области «Центр охраны здоровья семьи и репродукции», Астрахань, Россия

Введение. Fas(CD95) – клеточный рецептор, по наличию которого судят о готовности клеток к Fas-индуцированному апоптозу. В мужском репродуктивном тракте функции Fas-рецепторно-лигандной системы заключаются в регуляции численности половых клеток на уровне сперматогенеза, в отслеживании разнообразных повреждений и сбоев в процессе сперматогенеза и обеспечении удаления повреждённых клеток, а также в выполнении защиты половых клеток от иммунологических реакций в яичках. При различных нарушениях сперматогенеза могут наблюдаться изменения экспрессии Fas-антигена на половых клетках, отражая активность патологических процессов, протекающих в мужской репродуктивной системе. Данные относительно корреляции между наличием Fas-рецептора на сперматозоидах и некоторыми функционально-морфологическими параметрами эякулятов мужчин, рекомендованными к исследованию Всемирной организацией здравоохранения в доступной нам литературе не встречались.

Цель. Обнаружить взаимосвязь между содержанием в эякулятах бесплодных мужчин Fas-положительных сперматозоидов и нарушениями некоторых функционально-морфологических параметров гамет.

Материалы и методы. Сперматозоиды выделяли из образцов эякулятов 78 субфертильных мужчин (возраст от 25 до 45 лет) отмыванием от семенной плазмы в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4. Для обнаружения Fas использовали моноклональные антитела (CD95-PE, IgG1, Caltag Lbs.), согласно инструкции производителя, с последующей флуоресцентной микроскопией. В качестве основных характеристик сперматозоидов были исследованы подвижность, морфология и концентрация сперматозоидов в эякуляте. Оценка взаимосвязи между исследуемыми показателями осуществлялась путём подсчёта коэффициента корреляции (r) Пирсона.

Результаты. Выявлена достоверная отрицательная корреляция между количеством сперматозоидов, экспрессирующих Fas, и концентрацией гамет ($r = -0,46$; $p < 0,001$); подвижность сперматозоидов положительно коррелировала с содержанием в эякуляте (Fas^+)-клеток ($r = 0,31$; $p < 0,05$); отмечена положительная корреляция количества (Fas^+)-клеток и содержания в эякуляте патологических форм сперматозоидов ($r = 0,4$; $p < 0,01$).

Заключение. Представленные данные показывают, что содержание в эякулятах субфертильных мужчин сперматозоидов с маркёром апоптоза Fas коррелирует с концентрацией, подвижностью и дефектами морфологии гамет. Этот факт позволяет считать экспрессию рецептора апоптогенного сигнала Fas на клетках – фактором, снижающим качество сперматозоидов. Положительная корреляция между количеством (Fas^+)-клеток и подвижностью гамет говорит о том, что часть тех сперматозоидов, которые оценены как активно подвижные у субфертильных пациентов, маркированы Fas и предрасположены

при наличии дополнительных факторов к смерти через апоптоз. (Fas^+)-клетки потенциально уготовлены к гибели по рецепторному механизму апоптоза, когда сигналы к его запуску поступят извне и опосредованы через Fas-рецепторы. Такие меченые клетки способствуют плохому качеству спермы и обнаруживаются раньше нарушений подвижности гамет, что даёт возможность использовать диагностическое определение Fas-антигена для прогнозирования качества половых клеток.

ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО СОСТАВА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА, САЛЬПИНГООФОРИТА ПРИ СОПУТСТВУЮЩЕЙ ДЕПРЕССИИ

Правдин Е.В.

Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия

Введение. Хронические воспалительные заболевания матки и придатков (ХВЗМП) занимают лидирующее положение в структуре гинекологической патологии, сопровождаются многочисленными жалобами, приводят к хронизации воспалительного процесса, серьезным осложнениям и последствиям. Это формирует основу для развития соматогенной депрессии. Установлено, что аффективные расстройства такого типа во многом обусловлены развитием синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) и чаще всего сопровождаются изменениями лейкоцитарного состава периферической крови.

Цель и задачи. Представленная работа посвящена изучению особенностей лейкоцитарного состава периферической крови больных с обострением ХВЗМП в зависимости от тяжести сопутствующей депрессивной симптоматики.

Материалы и методы. Для исследования было отобрано 124 женщины репродуктивного возраста, экстренно поступивших в гинекологическое отделение с диагнозом обострение хронического эндометрита, сальпингоофорита. В первые сутки госпитализации в стационар всем больным проведено комплексное унифицированное гематологического обследование. Кроме того, у всех женщин была проведена количественная оценка аффективных расстройств с помощью шкалы депрессии Бека (ШДБ). Показатель ШДБ ≥ 12 баллов и более свидетельствует о наличии депрессии. Диапазон от 12 до 19 баллов по ШДБ говорит о легкой депрессии. Значения показателя ШДБ 20 баллов и более отражают средне-тяжелые и тяжелые депрессивные расстройства. На основании вышеизложенных критериев, все пациентки были распределены на 3 группы в зависимости от наличия клинически значимой депрессивной симптоматики и ее тяжести. Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных программ SPSS-17.0.

Результаты. Изучение аффективного статуса больных, включенных в исследование, выявил наличие депрессии (ШДБ ≥ 12 баллов) у большинства пациентов (73%). Чаще всего (63 случая, 51%) встречалась легкая депрессия (от 12 до 19 баллов по ШДБ). В 27 случаях (22%) выраженность депрессивной симптоматики соответствовала уровню среднетяжелой и тяжелой депрессии (суммарный балл ШДБ ≥ 20 баллов). Лишь у 34 женщин (27%) показатель ШДБ соответствовал диапазону нормы. Данный факт согласуется с известными представлениями о причинно-следственных связях развития депрессивных состояний у больных с инфекционной патологией. Анализ лейкоцитарного состава крови в общей совокупности обследованных женщин продемонстрировал увеличение относительного и абсолютного содержания палочкоядерных НГ в лейкоцитарной формуле (8,23±0,16%; 0,68±0,02 × 10^9/л), снижение относительного содержания сегментоядерных НГ (54,24±0,22%), ускорение СОЭ (17,44±0,25 мм/час). Результаты корреляционного анализа, проведенные на общей совокупности больных, включенных в обследование, продемонстрировали существенную зависимость тяжести депрессивных расстройств от содержания большинства категорий циркулирующих лейкоцитов и СОЭ. Это проявилось нарастанием больных оценок ШДБ по мере увеличения общего содержания циркулирующих лейкоцитов (r_s = 0,18, p = 0,04), процентного и абсолютного содержания эозинофилов, (r_s = 0,20, p = 0,03; r_s = 0,25, p = 0,005 соответственно), процентного и абсолютного содержания палочкоядерных НГ (r_s = 0,22, p = 0,02; r_s = 0,20, p = 0,02 соответственно) и ускорением СОЭ (r_s = 0,18, p = 0,04). Процент содержания сегментоядерных НГ, наоборот, отрицательно коррелировал с общей тяжестью депрессивных расстройств (r_s = -0,24, p = 0,008). Справедливость этого положения подтвердилось в процессе сопоставительного анализа групп пациентов, сформированных в зависимости от тяжести депрессивных расстройств на фоне обострения ХВЗМП.

Заключение. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что развитие среднетяжелой и тяжелой депрессии у больных с неосложненным обострением ХВЗМП связано с изменением лейкоцитарного состава крови (эозинофилией, нейтрофилезом, сдвигом лейкоцитарной формулы влево и нарастанием количества лимфоцитов).

ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ «ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ – АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА» У БОЛЬНЫХ С ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МАТКИ И ПРИДАТКОВ

Правдин Е.В.

Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия

Введение. Хронические воспалительные заболевания матки и придатков (ХВЗМП) относятся к числу наиболее распространенных форм генитальной патологии женщин и нередко характеризуются тяжелым течением обострений с развитием многочисленных осложнений. Неблагоприятное протекание обострений ХВЗМП обусловлено эскалацией локального экссудативно-деструктивного процесса с тенденцией к его генерализации вплоть до развития гнойного перитонита и даже абдоминального сепсиса. Подобные состояния нередко сопровождаются оксидативным стрессом, приводящим к накоплению продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови. Высокий биодеструктивный потенциал продуктов ПОЛ и их хемоатрактантная активность в отношении нейтрофильных гранулоцитов (НГ) свидетельствуют о важной роли переокисленных липидов в развитии вторичной

альтерации и поддержании лейкоцитарной инфильтрации в очаге воспаления.

Цель и задачи. Представленная работа посвящена изучению системы «Перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» (ПОЛ-АОЗ) у больных с обострением хронических воспалительных заболеваний матки и придатков.

Материалы и методы. Для исследования было отобрано 124 женщины репродуктивного возраста, экстренно поступивших в гинекологическое отделение с диагнозом обострение хронического эндометрита, сальпингоофорита. Для изучения лейкоцитарной инфильтрации в очаге воспаления проводили аспирационную биопсию эндометрия с помощью маточного шприца Брауна. В окрашенных гематоксилином и эозином микропрепаратах осуществлялся подсчет участков гнойного расплавления (некроза), количества экстраваскулярных нейтрофильных гранулоцитов (НГ), макрофагов, лимфоцитов и фибробластов на 1мм^2 среза. Дополнительно учитывали число плазматических клеток, выявляемых окраской по Браше, и объемную плотность коллагеновых волокон, окрашенных по ван Гизон. Уровень продуктов ПОЛ в сыворотке крови определяли спектрофотометрически с раздельной регистрацией липопероксидов в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта. Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.) – E_{232}/E_{220} (относительное содержание диеновых коньюгатов; ДК) и E_{278}/E_{220} (уровень кетодиенов и сопряженных триенов; КД и СТ). Дополнительно проводилась оценка состояния антиоксидантной защиты (АОЗ), о котором судили по содержанию α-токоферола (α-ТК) и церулоплазмина (ЦП) в сыворотке крови. Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных программ SPSS-17.0.

Результаты. Анализ исходного состояния больных с обострением ХВЗМП, включенных в исследование, выявил наличие очагов гнойного расплавления в биоптатах эндометрия, более чем 10-кратное превышение нормальных значений его нейтрофильной инфильтрации и заметное увеличение числа экстраваскулярных макрофагов (на 21-29%), лимфоцитов (на 16-18%) и фибробластов (на 33-45%). Одновременно в сыворотке крови пациенток наблюдалось повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) относительно средних значений нормы. Средние показатели содержания церулоплазмина (ЦП) в сыворотке крови укладывались в пределы нормального диапазона, а концентрация циркулирующего α-токоферола (α-ТК) соответствовала нижней границе нормы.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о формирование дисбаланса в системе «ПОЛ-АОЗ» крови на фоне лейкоцитарной инфильтрации эндометрия при обострении ХВЗМП. Корреляционный анализ продемонстрировал роль относительного дефицита АОЗ в накоплении циркулирующих продуктов ПОЛ. Это проявилось отрицательной корреляцией между концентрацией α-ТК и уровнем изопропанолрастворимых диеновых конъюгат (ДК) (r_s = -0,28; P = 0,002).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60094 мол_а_дк.

МАРКЕРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ И МЕДИАТОРЫ ВОСПАЛЕНИЯ У НОВОРОЖДЕННЫХ ОТ ЖЕНЩИН С ГИПЕРТЕНЗИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ

Ремизова И.И., Чистякова Г.Н., Бычкова С.В., Устьянцева Л.С., Шамова К.П.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

Повышение артериального давления у беременных оказывает непосредственное влияние на формирование основных систем гомеостаза плода и новорожденного, а также в ряде случаев является фактором, программирующим развитие различных патологических состояний в последующие периоды жизни ребенка. В связи с этим, особый интерес представляет изучение влияния гипертензивных состояний в период беременности на функциональную активность эндотелия у новорожденных.

Цель. Оценить функциональную активность эндотелия и продукцию провоспалительных и регуляторных медиаторов у детей от женщин с хронической артериальной гипертензией и пациенток с преэклампсией тяжелой степени.

Материалы и методы. Проведено иммунологическое обследование 67 детей, рожденных от женщин с гипертензивными нарушениями, из них: 1-я группа – 31 новорожденный от женщин с хронической артериальной гипертензией (ХАГ), 2-я группа – 36 детей от пациенток с преэклампсией тяжелой степени. Группу сравнения (3-ю) составили 27 новорожденных от женщин, беременность которых протекала без признаков артериальной гипертензии и закончилась рождением живых доношенных детей. Методом иммуноферментного анализа определяли в пуповинной крови содержание провоспалительных и регуляторных цитокинов, (IL-1β, TNFα, IL-4, IL-10,), концентрацию С-реактивного протеина (CRP) и маркеров эндотелиальной дисфункции (эндотелина-1 – ЭТ-1, стабильных метаболитов оксида азота, гомоцистеина).

Результаты. При сравнительном анализе пуповинной крови, у детей, родившихся от женщин с ХАГ, уровень эндотелина-1 не отличался от показателей группы сравнения, а концентрация общего нитрита и нитрата была достоверно выше, содержание эндогенного NO^{2-} статистически значимо снижено. У новорожденных от женщин с преэклампсией, отмечалось повышение уровня эндотелина-1 (0,42 (0,14-0,56) против 0,11 (0,03-0,21) и 0,09 (0,07-0,3) фмоль/мл, $P_{1-2, 2-3}$ = 0,0001). Значимых различий в содержании стабильных метаболитов оксида азота, не выявлено (NO^{2-} – общий – 7,75 (5,95-11,48) против 11,69 (8,1-16,26) и 6,81 (5,56-10,08), P_{1-3}, = 0,010; NO^{2-} – эндогенный – 0,6 (0,15-1,93) против 0,10 (0,04-0,99) и 0,6 (0,17-2,38) мкмоль/л в 1-й и 3-й группах, P_{1-3} = 0,010; NO^3 – 7,02 (5,06-10,42) против 10,58 (7,28-16,18) и 6,84 (6,01-10,3) мкмоль/л в 1-й и 3-й группах, P_{1-2} = 0,04, P_{1-3} = 0,001 в 1-й и 3-й группах).

Это свидетельствует об отсутствии положительного вазодилатационного эффекта на эндотелий сосудов, в отличие у детей 1-й группы, уровень эндотелина-1, у которых не отличался от показателей группы сравнения. Необходимо отметить, что концентрация гомоцистеина, одного из маркеров эндотелиальной дисфункции, у новорожденных 2-й группы статистически значимо превышала аналогичные параметры детей 1-й и 3-й групп (8,76 (5,59-11,07) против 7,49 (5,54-7,72) и 6,81 (2,47-7,54) мкмоль/л, P_{1-2},

2-3 = 0,010). Изменение показателей функциональной активности эндотелия, выявленное у новорожденных основных групп, сопровождалось нарушением синтеза провоспалительных цитокинов, что может быть обусловлено, как проникновением активированных моноцитов матери в кровоток плода, так и развитием фетального воспалительного ответа. Повышение уровня TNFα, наблюдаемое у всех новорожденных от женщин с гипертензивной патологией (48,27 (24,81-49,58), 33,04 (24,2-39,9) против 21,41 (13,97-25,18) пг/мл в 3-й группе, p = 0,0001), сопровождалось при развитии у матери преэклампсии увеличением концентрации IL-1β – 1,85 (0,93-3,44) против 0,86 (0,67-1,14) пг/мл, $P_{1\text{-}2,\ 2\text{-}3}$ = 0,010; CRP – 0,23 (0,10-0,25) против 0,10 (0,05-0,11) мг/л, $P_{1\text{-}2,\ 2\text{-}3}$ = 0,010; IL-4 – (1,74 (1,57-3,8) против 1,55 (1,48-4,86) пг/мл, $P_{1\text{-}2}$ = 0,010, $P_{1\text{-}3}$ = 0,017), IL-10 (4,53 (3,96-9,14) против 4,06 (3,82-4,92) пг/мл, $P_{2\text{-}3,\ 1\text{-}2}$ = 0,010). Полученные результаты указывают на возможный переход цитокинов через плаценту и проникновении в фетальную циркуляцию и наоборот. У детей 1-й группы значимых различий в содержании данных медиаторов не обнаружено. Выявленные у детей от женщин с преэклампсией положительные корреляционные связи между CRP и NO^{2-} – эндогенным, а также эндотелином-1, отрицательные корреляции между гомоцистеином и NO^{2-} – общим и NO^{2-} эндогенным, позволяют предположить, что одним из неблагоприятных факторов развития эндотелиопатии у этих детей является оксидативный стресс. Таким образом, повышение артериального давления во время беременности, способствует активации эндотелиальных клеток у плода, более выраженной при наличии у матери преэклампсии, что обуславливает высокую частоту развития перинатальной патологии у новорожденных. Определение уровня гомоцистеина и CRP в пуповинной крови может служить дополнительным прогностическим критерием развития патологических состояний у детей в раннем периоде адаптации.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ЕЕ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ И ИСХОДА У ГЛУБОКО-НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Сотникова Н.Ю., Турова А.В., Чаша Т.В.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

Введение. Проблема выхаживания глубоко-недоношенных новорожденных во многом определяется неэффективностью реакций врожденного иммунитета.Недоношенные дети крайне чувствительны к инфекции, что является важным фактором, определяющим их высокую смертность и заболеваемость. Все это требует разработкиновых критериев оценки состояния иммунной системы ребенка, позволяющих в самые первые дни жизни прогнозировать развитие инфекционно-воспалительной патологии (ИВП), степень ее тяжести и исход.

Цель. Выявить наиболее значимые иммунологические критерии ранней диагностики ИВП, прогностические критерии ее тяжести и исхода заболевания у глубоконедоношенных новорожденных с очень низкой (ОНМТ от 500 до 1000 г) и экстремально-низкой (ЭНМТ менее 500 г) массой тела при рождении.

Материалы и методы. Проводилось обследование 74 недоношенных новорожденных 32 недель гестации с ОНМТ и ЭНМТ. Из них 18 детей не имели ИВП, у 56 детей имели ИВП (27 – легкой/средней степени, 29 тяжелой степени, 50 – с локальной ИВП, 6 – с генерализованной ИВП). Выздоровели 38 детей, 10 детей умерли и у 8 детей развилась бронхо-легочная дисплазия (БЛД).

В 1-2 день жизни определяли: показатели общего анализа крови; сывороточный уровень прокальцитонина (ПКТ) и С-реактивного белка (СРБ). Методом проточной цитофлуориметрии в периферической крови в нейтрофильном(Нф) ($CD14^{-}CD45^{+}$) и моноцитарном (Мо) ($CD14^{+}CD45^{+}$) гейтах определяли относительное содержание $TLR2^{+}$, $TLR4^{+}$, $CD16^{+}$, $CD11b^{+}$, $HLA\text{-}DR^{+}$ клеток, в макрофагальном гейте (Мф) ($CD14^{+}CD45^{+}$) фарингеального аспирата – относительное содержание $TLR\text{-}2^{+}$, $TLR\text{-}4^{+}$ клеток.

Результаты. Для всех новорожденных с ИВП независимо от степени тяжести и исхода ИВП было характерным снижение уровня сегменто-ядерных Нф, $TLR4^{+}$ Мо, TLR^{+} и $TLR4^{+}$ Мф, максимально выраженное в группе умерших детей, и не проявляющееся при генерализованной ИВП. В общей группе детей с ИВП отмечалось повышение уровня моноцитов, ПКТ и СРБ в крови, а также снижение содержания $CD16^{+}$ Нф. При летальном исходе ИВП имелось снижение содержания $HLA\text{-}DR^{+}$ Мо, $TLR4^{+}$ Мо относительно показателей выздоровевших детей. При развившейся впоследствии БЛД исследуемые показатели в периферической крови в наименьшей степени отличались от таковых в группе без ИВП. При тяжелой степени ИВП отмечались наибольшие средние значения содержания ПКТ и СРБ. Корреляционный анализ показал, что при благоприятном исходе ИВП имелось максимальное количество положительных связей между исследуемыми показателями (22) по сравнению с группой умерших детей (8). ROC-анализ выявил наиболее значимые критерии ранней диагностики ИВП у новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ: относительное содержание $TLR2^{+} \le 75\%$ и $TLR4^{+} \le 73\%$ Мф в фарингеальном аспирате (AUC = 0,710 и AUC = 0,704), $TLR4^{+} \le 85\%$ Мов крови (AUC = 0,704). К прогностическим критериям неблагоприятного (летального) исхода ИВП следует отнести содержание $HLA\text{-}DR^{+} \le 75\%$ и $TLR4^{+} \le 72\%$ Мо в крови (AUC = 0,946 и AUC = 0,765).

Заключение. Таким образом, низкая патоген-распознающая способность фагоцитов периферической крови и фарингеального аспирата ассоциируется в группе глубоко-недоношенных новорожденных с развитием ИВП, что, вероятно, определяет нарушение каскада инфекционно-воспалительных реакций, направленных на блокирование жизнедеятельности, дезинтеграцию и удаление патогена из организма. Неблагоприятный исход ИВП ассоциируется с максимально выраженным угнетением этой функции периферических и фарингеальныхфагоцитов.

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ЛЕЙОМИОМЫ МАТКИ

Сотникова Н.Ю., Воронин Д.Н., Кирсанов А.Н.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детстваим.В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

Введение. Лейомиома матки является одним из наиболее распространённых гинекологических заболеваний. Она представляет собой доброкачественную гормональ-

но-зависимую опухоль, которая развивается в результате трансформации клеток миометрия и состоит из гладкомышечных клеток и большого количества внеклеточного матрикса. Основную роль в механизмах развития и роста миоматозных узлов в настоящее время отводят половым стероидным гормонам, действие которых на клетки опухоли происходит опосредованно через аутокринную/паракринную индукцию выработки факторов роста, что сопровождается активацией различных внутриклеточных сигнальных путей. Проведение активирующих сигналов от половых стероидных гормонов и факторов роста в клетке происходит преимущественно через PI3K/Akt-mTOR и MAPK/ERK киназы. Однако особенности активации этих киназ в ткани миоматозных узлов различных размеров и с различной интенсивностью клеточной пролиферации не изучены. Особый интерес представляет уточнение характера регуляции активности TGF-β в ткани опухоли, поскольку этому фактору роста отводят ведущую роль в патогенезе лейомиомы матки.

Цель и задачи. Установить роль внутриклеточных PI3K/AKT и MAPK/ERK сигнальных путей в регуляции пролиферативной активности клеток лейомиомы матки и в синтезе в ткани опухоли трансформирующего фактора роста.

Материалы и методы. Был проведен анализ биоптатов ткани неизмененного миометрия (n = 14) и миоматозных узлов (n = 18), полученных в ходе проведения операции по удалению лейомиомы матки лапароскопическим доступом. Уровень экспрессии мРНК маркера клеточной пролиферации Ki67, Akt, ERK и двух изоформ TGF-β – TGF-β1 и TGF-β2 в ткани миометрия и миоматозных узлов оценивали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. Было установлено, что в миоматозных узлах усиливался синтез как Akt, так и ERK по сравнению с неизменённым миометрием. Однако при дифференцированном анализе данных в зависимости от размера опухоли и от уровня экспрессии Ki-67 мы не выявили достоверных различий в синтезе Akt. При этом экспрессия мРНК ERK была значительно повышена в миоматозных узлах больших размеров (6см и более) и достигала самых высоких значений в пролиферирующих Ki67-положительных узлах большого размера. Анализ данных, характеризующих синтез TGF-β в ткани опухоли показал, что в миоматозных узлах отмечалась лишь выраженная тенденция к усилению экспрессии мРНК как TGF-beta-1, так и TGF-beta-2 изоформ. Причем в узлах больших размеров синтез TGF-beta2 был достоверно повышен по сравнению с таковым в узлах меньших размеров. В тех же случаях, когда лейомиома характеризовалась усилением пролиферативной активности, мы отмечали повышение экспрессии в ткани опухоли мРНК обеих изученных изоформ TGF-beta. Известно, что трансформирующий фактор роста не только является стимулятором клеточной пролиферации и васкуляризации в ткани опухоли, но и обладает выраженным иммуносупрессорным действием. Усиление его выработки способствует формированию специфического микроокружения, благоприятного для роста опухолевых клеток. Следует отметить, что направленность синтеза ERK практически всегда совпадала с особенностями синтеза в опухоли TGF-β. Так, в узлах больших размеров мы наблюдали одновременное усиление экспрессии мРНКERK и TGF-β2, а в Ki67$^+$ лейомиомах – повышение экспрессии мРНКERK, TGF-β1 и TGF-β2. По-видимому, аутокринная петля TGF-β, реализующаяся через активацию MAPK/ERK сигнального пути, делает пролиферирующие миоматозные узлы менее зависимыми от половых стероидных гормонов.

Заключение. Таким образом, усиление пролиферации клеток лейомиомы матки ассоциировано с активацией внутриклеточного MAPK/ERK сигнального пути и повышением синтеза TGF-β1 и TGF-β2 в ткани опухоли.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-05042.

НАСТУПЛЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ ПОСЛЕ ПРЕДГЕСТАЦИОННОЙ АЛЛОИММУНИЗАЦИИ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Степанова Е.О., Николаева М.А., Голубева Е.Л., Тетруашвили Н.К., Кречетова Л.В.

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Иммуноцитотерапия (ИЦТ) – процедура иммунизации женщин лейкоцитами их полового партнера с целью индукции толерантности иммунной системы матери к отцовским антигенам плода – широко применяется как обоснованный и эффективный подход предотвращения потерь беременности у пациенток с привычным выкидышем в анамнезе. Принципиальную роль в развитии иммунологической толерантности играет цитокиновый профиль иммунокомпетентных клеток. В ряде исследований показано, что физиологическая беременность развивается на фоне противовоспалительных Th2-реакций. Иммуномодулирующий эффект ИЦТ также связан с Th2-поляризацией иммунного ответа. В то же время, согласно современным представлениям, имплантация и ранние стадии первого триместра физиологической беременности протекают на фоне провоспалительных Th1-реакций, а Th2-фон формируется позднее. Поэтому нельзя исключить, что противовоспалительные реакции, формируемые при ИЦТ, могут препятствовать наступлению беременности. В связи с этим особую актуальность приобретает оценка влияния Th1/Th2-фона на вероятность наступления беременности при проведении предгестационной ИЦТ. Для изучения воздействия различных факторов на имплантацию и ранние стадии беременности широко используется такой показатель, как длительность ожидания наступления планируемой беременности (TTP, time to pregnancy).

Целью настоящего исследования явилась оценка взаимосвязи между сформированным в результате предгестационной ИЦТ балансом Th1- и Th2-цитокинов, продуцируемыхклетками периферической крови женщин, и длительностью ожидания наступления беременности после ИЦТ.

В исследование было включено 37 супружеских пар с диагнозом привычный выкидыш. Всем женщинам перед планируемой беременностью проводилась иммунизация лейкоцитами их полового партнера (ИЦТ). После лечения регистрировали наступление беременности в течение 12 менструальных циклов. Продукцию Th1 (IFNγ, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNFα, IL-1β) и Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) цитокинов после митогенной активации клеток цельной крови женщин с использованием наборов «Цитокин-Стимул-Бест» («Вектор-Бест») оценивали методом проточной цитофлуорометрии с помощью мультиплексного анализа с применением стандартных наборов FlowCytomix™ (eBioscience). Параметр TTP определяли

как количество менструальных циклов, прошедших с момента отмены негормональной контрацепции до наступления беременности.

Из 37 женщин у 27 (73,0%) беременность завершилась своевременным рождением живых детей. Из 27 женщин у 23 (85,2%) беременность наступила в течение 6 циклов после проведения ИЦТ (TTP ≤ 6). У 10 (27,0%) женщин после ИЦТ беременность не наступила.

Наступление желаемой беременности в течение 6 менструальных циклов (TTP ≤ 6) является одной из характеристик фертильности женщин. Отсутствие наступления беременности в течение 12 менструальных циклов рассматривается в качестве критерия бесплодия. Дизайн проведенного исследования обеспечил уникальную возможность оценки предимплантационного иммунологического фона в группе женщин с наступившей беременностью (TTP ≤ 6) и в группе с ненаступившей беременностью. По результатам ретроспективного анализа показатели цитокинового профиля в исследуемых группах до начала ИЦТ не различались. Однако в группе женщин с наступившей беременностью проведение ИЦТ привело к увеличению соотношений IFNγ/IL-4 в 2,1 раза ($p < 0,05$) и TNFα/IL-4 в 2,4 раза ($p < 0,05$). В группе женщин, у которых беременность не наступила, баланс Th1/Th2 цитокинов при проведении ИЦТ не менялся. После проведения ИЦТ соотношение IFNγ/IL-4 в группе женщин с TTP ≤ 6 было в 2,1 раза выше, чем в группе с ненаступившей беременностью ($p = 0,006$). Соотношение TNFα/IL-4 было также в 3,1 раза выше у пациенток с наступившей беременностью ($p = 0,007$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, продуцируемых клетками периферической крови женщин, сформированное в результате предгестационной ИЦТ, может определять длительность ожидания наступления беременности после терапии привычного выкидыша. Терапевтический эффект двукратной предгестационной ИЦТ может наблюдаться лишь при достижении оптимального баланса Th1/Th2-цитокинов после ИЦТ с преобладанием провоспалительного фона при имплантации и на ранних стадиях беременности.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ IL-10 ПРИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДАХ

Супрун С.В.[1], Наговицына Е.Б.[1], Кондрашова Е.А.[2], Морозова О.Н.[3]

[1] Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровск, Россия
[2] Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Перинатальный центр» министерства здравоохранения Хабаровского края, Хабаровск, Россия
[3] Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Родильный дом № 2» министерства здравоохранения Хабаровского края, Хабаровск, Россия

Одной из основных причин преждевременных родов считается преждевременный разрыв плодных оболочек (ПРПО). Особую значимость эта проблема приобрела с изменением критериев живорожденности. Преждевременные роды имеют множество причин как чисто медицинских, так и медико-социальных, однако основным патогенетическим механизмом через который они реализуются является иммунный конфликт матери и плода. В связи с этим особое значение в предотвращении таких осложнений беременности имеет изучение состояния иммунитета у потенциальных матерей.

Основными коммуникативными молекулами иммунной системы являются интерлейкины, но именно поэтому изучение, и главное – интерпретация их уровней в сыворотке крови представляют большие трудности. Отсутствуют общепринятые нормы этих уровней не только для беременных женщин, но и в популяции вообще. Более того, сама возможность установления этих норм вызывает сомнения, т.к. сывороточные уровни интерлейкинов даже у одного человека в течение нескольких дней могут различаться на порядки. И это вполне естественно, поскольку основным местом действия этих коммуникативных молекул являются органы иммунной системы, и в сыворотке мы видим лишь транзиторные уровни вещества. Исходя из выше сказанного, мы считаем более перспективным изучение не сиюминутных, по сути транзиторных уровней интерлейкинов в сыворотке крови, а определение полиморфизмов их генов, которые определяют количество и функциональную полноценность молекул в течении всей жизни. При изучении иммуно-патогенеза преждевременных родов особый интерес вызвали генетические полиморфизмы IL-10 (G1082A, C592A, C819T), который во многом определяет соотношение активностей Т-цитотоксической и В-клеточной системы иммунитета.

Нами обследовано 76 беременных женщин Приамурья: 1 группа (n = 32) – с ПРПО на сроке гестации 26-32 недели, 2 группа (n = 44) – закончившие беременность в срок. Использовался метод клинической молекулярной биологии и диагностической генетики – полимеразной цепной реакции (Real-time PCR).

Сравнительный анализ распространенности аллелей полиморфизмов гена IL-10 в 3-х видах мутаций (G1082A, C592A, C819T) показал достоверные отличия частотных характеристик нормальных и мутантных генотипов в наблюдаемых группах пациенток. Из полученных результатов следует, что у беременных с ПРПО в 1,5 раза чаще встречались мутации C592A, в 3,3 раза – C819T, как в гетеро-, так и гомозиготных вариантах. Третий вид мутации IL-10 (G1082A) при ПРПО отмечен на 17,9% больше, чем в сравниваемой группе беременных, преимущественно за счет увеличения числа гомозиготных вариантов. У женщин группы сравнения процент беременных с отсутствием всех изучаемых нами мутаций гена IL-10 в 4,7 раза больше, чем у пациенток с ПРПО (29,5% и 6,3% соответственно).

Таким образом, проведенное исследование показали, что полиморфизмы гена IL10 (G1082A, C592A, C819T) можно считать предиктивным маркером ПРПО и фактором риска преждевременных родов. Его выявление позволит целенаправленно проводить профилактические мероприятия и минимизировать возможность рождения недоношенных детей.

РАЗЛИЧИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ВОЛОС У ЖЕНЩИН В РЕПРОДУКТИВНОМ И РАННЕМ ПОСТМЕНОПАУЗНОМ ПЕРИОДАХ

Тузанкина И.А., Санникова О.Ю.

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

Существуют достаточно разноречивые и разрозненные сведения о возможностях иммунной системы адап-

тироваться к изменяющимся условиям внутренней среды, таким как менопауза, а также о характере влияния микроэлементозов на организм женщины в критические периоды онтогенеза.

Состояние среды обитания человека взаимосвязано с показателями здоровья и качества жизни. Воздействие микроэлементов на молекулярном, тканевом, клеточном и системном уровне во многом зависит от концентрации и длительности экспозиции токсического вещества, комбинации его с другими факторами, предшествующего состояния здоровья человека и его иммунологических функций.

Резюме. Проведен сравнительный анализ микроэлементного состава волос женщин-жительниц г. Екатеринбурга в репродуктивном периоде (n = 25) и ранней постменопаузе (n = 38). Определены концентрации титана, ванадия, циркония, ртути, свинца, висмута, мышьяка, стронция, цинка, галлия, селена, брома, иттрия, марганца, никеля, меди, рубидия, железа, кобальта. Значимые различия химического состава волос женщин, наряду со старением организма и дефицитом эстрогенов могут свидетельствовать об эффекте экотоксикантов как факторов, способствующих формированию иммунопатологических процессов и клиническому проявлению климактерических расстройств.

Материалы и методы. Проведен сравнительный анализ микроэлементного состава волос женщин-жительниц г. Екатеринбурга в разных возрастных группах.

В исследование, на условиях добровольного информированного согласия, было включено 38 женщин в ранней постменопаузе (медиана возраста составила 53,0 года (25÷75% – 51,0÷55,0 лет), обратившихся за специализированной врачебной помощью в течение первых трех лет после наступления менопаузы (медиана длительности менопаузы составила 2,8 года (25÷75% 1 и 4 года соответственно), и 25 женщин репродуктивного возраста (медиана возраста была 23,0 года (25÷75% – 19,0÷25,0 лет).

Рентгенфлюоресцентным методом с использованием синхротронного излучения определяли концентрацию в волосах 19 химических элементов с прооксидантной и антиоксидантной активностью. Была определена концентрация титана, ванадия, циркония, ртути, свинца, висмута, мышьяка, стронция, цинка, галлия, селена, брома, иттрия, марганца, никеля, меди, рубидия, железа, кобальта. Волосы брали с разных участков скальпа головы с помощью ножниц из нержавеющей стали, в 2-х см от корня, не ранее, чем через 6 месяцев от момента последнго окрашивания химическими красителями.

Распределение данных в группах не соответствовало нормальному типу, поэтому для характеристики групп и различий между ними в каждой выборке рассчитывали медианы, 25-й и 75-й процентили, а в дальнейших расчетах использовали непараметрические методы статистики: тест Манна–Уитни.

Результаты. В данном исследовании было выявлено, что для женщин репродуктивного возраста характерно значимо большее содержание цинка и меньшее содержание селена в волосах.

Интервалы нормальных значений уровней ванадия, марганца, железа, кобальта и ртути превышают верхние пределы референтных по данным ВОЗ, 1996 в обеих возрастных группах, а титана даже в десятки раз, что вероятно обусловлено проживанием участниц исследования в регионе с повышенной техногенной нагрузкой.

Ранний постменопаузный период характеризовался увеличением содержания ванадия, ртути, висмута, мышьяка, галлия и брома в волосах, тогда как репродуктивный период – повышением в данном биологическом субстрате циркония, свинца, стронция, титана, никеля и иттрия.

Концентрации железа, марганца, кобальта, меди и рубидия в исследуемых группах не различались.

Ограничения исследования: малый объем смещенной выборки, расценить его возможно как пилотное, в дальнейшем возможно запланировать и выполнить рассчет статистически значимой выборки из популяции женщин Екатеринбурга.

Работа выполнена в в соответствии с программой фундаментальных научных исследований в Институте иммунологии и физиологии УрО РАН, № гос. регистрации – 01201352044.

УРОВЕНЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ЗАЩИТЫ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ЖЕНЩИН С ГИПЕРАНДРОГЕНИЕЙ ЯИЧНИКОВОЙ ФОРМЫ

Хайдарова Ф.А., Музафарова С.А., Камалов З.С.

Республиканский научный центр иммунологии Министерства здравоохранения РУз, Ташкент, Узбекистан

Адекватный иммунный ответ обеспечивается определенным гормональным гомеостазом, и любые его изменения приводят, соответственно, к нарушению нормальной иммунологической реактивности.

Целью исследования явилось изучение некоторых параметров иммунной системы у женщин с гиперандрогенией яичниковой формы. Обследовано 56 женщин репродуктивного возраста. Из них у 32 женщин диагностирована гиперандрогения яичниковой формы. 24 практически здоровых женщин составили контрольную группу. Иммунологические исследования проводили изучением уровня С-реактивного белка (СРБ),С3 компонента комплемента, TNFα, IL-1β и IL-6 методом ИФА.

Важную роль в выполнении специфических функций макрофагов играют рецепторы для С3-фракции комплемента, определяют иммунную адгезию и фагоцитоз, способствуют секреции лизосомальных энзимов. Выявленный в концентрации 48,5±2,7 нг/мл уровень С3 компонента комплемента у женщин контрольной группы оказался в 1,6 раза ниже, чем в группе женщин с гиперандролгенией ($P < 0,01$). Такое превышение уровня С3 компонента комплемента определяет его иммунорегуляторную роль, проявляющуюся в усилении и выделении хемоатрактантов, интерлейкинов и др. Изучение уровня С-реактивного белка (СРБ) показало повышенный его уровень в 3,6 раза у женщин основной группы ($P < 0,001$). Такое действие С-реактивного белка (СРБ) может быть связано с тем, что он ингибирует активность фосфолипаз, в том числе внутриклеточной фосфолипазы А2, участвующей в обмене арахидоновой кислоты, которая является субстратом для образования биологически активных веществ.

Гонадотропины находятся во взаимосвязи с секрецией цитокинов. Уровень и количественное соотношение цитокинов меняется в зависимости от фазы и состояния фолликулогенеза. Было выявлено, что у женщин с гиперандрогенией яичниковой формы уровень TNFα выше в 2 с лишним раза данных контрольной группы (53,8±2,2 пг/мл против 25,7±1,3 пг/мл в контроле, $P < 0,01$), уровень IL-1β выше значений контрольной группы в 1,7 раза ($P < 0,01$), а синтез IL-6 – выше в 2,5 раза ($P < 0,01$).

Таким образом, иммунологические аспекты репродуктивного здоровья – сложная загадка. Однако, роль

иммунных факторов неоспорима. Результаты настоящего исследования показали, что одной из функционально-метаболических систем женского организма, способной быстро и универсально реагировать на разные эндогенные влияния, является иммунная система.

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНОГО ЭФФЕКТА ВВИГ С ЦЕЛЬЮ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Чепанов С.В.[1], Соколов Д.И.[1, 2], Шляхтенко Т.Н.[1], Пустыгина А.В.[1], Сельков С.А.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Иммуноглобулины для внутривенного введения (ВВИГ) представляют собой полиспецифические иммуноглобулины преимущественно IgG класса, изготовленные из плазмы здоровых доноров. Использование ВВИГ в акушерской практике является наиболее современным и эффективным методом терапии невынашивания беременности, связанного с развитием тромбофилических состояний, в частности антифосфолипидного синдрома (АФС). В то же время следует учитывать, что эти препараты имеют высокую стоимость и далеко не всегда могут оказывать требуемый терапевтический эффект. Антифосфолипидный синдром на сегодняшний день не включен в список показаний к применению иммуноглобулинов для внутривенного введения. Использование ВВИГ при АФС носит рекомендательный характер.

Цель. Разработка метода прогнозирования клинической эффективности использования ВВИГ у женщин с привычным невынашиванием беременности на фоне АФС.

Материалы и методы. В исследование было включено 109 беременных женщин, из которых 42 женщины с диагнозом привычное невынашивание на фоне АФС, 36 женщин с диагнозом привычное невынашивание без АФС и 31 женщина с физиологически протекающей беременностью. У пациенток забирали кровь из локтевой вены, центрифугировали, сыворотки отбирали в стерильных условиях. В работе использовали эндотелиальные клетки линии EA.Hy926, воспроизводящие все основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелию. В исследовании применяли препарат иммуноглобулинов для внутривенного введения «Интратект» (Biotest, Германия).

Результаты. Установлено снижение цитопатического влияния сывороток крови в отношении клеток эндотелия, после обработки их ВВИГ, по сравнению с эндотелиальными клетками необработанными ВВИГ. У женщин с привычным невынашиванием беременности без АФС на 71,5%±16,2, у женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС на 70,1%±24,3. С целью формализации полученных данных был предложен цитопротективный коэффициент (ЦК), который показывает, насколько снизилась цитотоксичность сыворотки периферической крови в отношении эндотелиальных клеток после их обработки ВВИГ по сравнению с интактными клетками. Если ЦК составлял более 55%, то он оценивался как положительный – ВВИГ способны оказать защитное действие в отношении клеток эндотелия от цитопатических факторов содержащихся в сыворотке крови. Если ЦК был менее 55%, то ВВИГ в меньшей степени оказывают защитное действие в отношении клеток эндотелия. При сопоставлении данных расчета ЦК и исходах беременности у женщин с АФС и применением ВВИГ установлено, что ЦК позволяет прогнозировать клиническую эффективность применения ВВИГ. Так у женщин с ЦК более 55%, беременность заканчивалась срочными родами в 88% случаях, преждевременными родами в 22% случаях. У женщин с ЦК менее 55%, беременность заканчивалась срочными родами в 25% случаях, преждевременными родами в 75% случаях.

Выводы. Разработанный метод лабораторной оценки эндотелиопротективного эффекта ВВИГ с определением цитопротективного коэффициента, позволяет прогнозировать клиническую эффективность их применения у женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ У РОЖЕНИЦ С ХРОНИЧЕСКОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ПАЦИЕНТОК С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Бычкова С.В.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

Артериальная гипертензия в период беременности является одной из главных причин заболеваемости и смертности матери, плода и новорожденного, а также отрицательно влияет на отдаленный прогноз для женщин и дальнейшее развитие детей. Несмотря на повышенный интерес исследователей к гипертензивным состояниям при беременности, ожидаемых успехов в прогнозировании, профилактике и лечении этих патологических состояний не достигнуто.

Цель. Оценить функциональное состояние эндотелия и продукцию провоспалительных и регуляторных медиаторов у женщин с хронической артериальной гипертензией и пациенток с преэклампсией.

Материалы и методы. Проведено иммунологическое обследование 67 рожениц с гипертензивными нарушениями, из них: 1-я группа – 31 женщина с хронической артериальной гипертензией (ХАГ), 2-я группа – 36 пациенток с преэклампсией тяжелой степени. Группу сравнения (3-ю) составили 27 женщин, беременность которых протекала без признаков артериальной гипертензии и закончилась рождением живых доношенных детей. Проводили изучение соматического, акушерско-гинекологического анамнеза матерей, особенностей течения настоящей беременности, результатов иммунологического обследования женщин накануне родов. Методом иммуноферментного анализа определяли содержание провоспалительных и регуляторных цитокинов (IL-1β, TNFα, IL-4, IL-10,), концентрацию С-реактивного протеина (CRP) и маркеров эндотелиальной дисфункции (эндотелина-1 – ЭТ-1, стабильных метаболитов оксида азота, гомоцистеина).

Результаты. Установлено, что уровень эндотелина-1, обладающего высокой вазоконстрикторной активностью, в группе женщин с ХАГ был в 1,8 раз ниже, а у пациенток с преэклампсией в 6,1 раза превышал показатели группы сравнения (0,05 (0,0-0,93) и 0,55 (0,22-1,57) против 0,09 (0,0-0,27) фмоль/мл, соответственно, $p_{1-2, 2-3} = 0,003$)). Повышенное содержание общего нитрита (NO^{2-}) и нитрата

(NO^{3-}) отмечалось у всех женщин с гипертензионными нарушениями (11,95 (8,69-13,71), 11,79 (8,73-15,37) и 9,75 (8,73-11,28) мкмоль/л, $p_{1-3,\ 2-3} = 0,010$); увеличение концентрации эндогенного нитрита регистрировалось при наличии у женщины преэклампсии (0,9 (0,88-2,98) против 0,11 (0,09-1,11) и 0,35 (0,14-1,48) мкмоль/л в 1-й и 3-й группах, $P_{1-2,\ 2-3} = 0,010$), что свидетельствует о включении защитных механизмов, ограничивающих вазоконстрикцию при гипертензивных состояниях. Одним из основных маркеров эндотелиальной дисфункции и оксидативного стресса является гомоцистеин. Гипергомоцистеинемия может нарушать формирование плацентарных сосудов и приводить к нарушению целостности эндотелия с последующим развитием преэклампсии. Исследования показали, что у женщин с преэклампсией наблюдалось увеличение концентрации гомоцистеина 11,48 (7,45-15,28) против 9,05 (7,8-10,2) и 7,5 (2,83-10,06) мкмоль/лв 1-й и 3-й группах (P1-2, 2-3 = 0,010). Другим активатором эндотелиальных клеток принято считать изменение цитокинового окружения (TNF α, IL-1β, IFNγ), а также увеличение продукции остофазных белков. Повышение уровня эндотелина-1 у женщин 1-й и 2-й групп, сопровождалось статистически значимым увеличением содержания TNFα: 36,45 (24,7-56,47) и 29,52 (25,83-50,5) против 23,11 (15,67-30,2) пг/мл, $P_{1-3,\ 2-3} = 0,0001$. При наличии у женщины преэклампсии наблюдалось возрастание концентрации С-реактивного белка: 7,2 (7,0-9,1) против 4,6 (3,2-7,0) и 4,8 (4,28-6,73) мг/л и уровня IL-10 – 6,38 (4,38-20,68) против 4,31 (4,17-4,54) и 4,37 (4,02-4,55) пг/мл, $P_{2-3,\ 1-2} = 0,010$. Увеличение концентрации CRP, выявленной у женщин с преэклампсий может способствовать повышению артериального давления, тормозя защитную реакцию эндотелия на воспалительный процесс. При проведении корреляционного анализа у всех женщин с гипертензивными нарушениями установлены прямые корреляционные связи между уровнем ЭТ-1 и концентрацией TNFα ($r = 0,37$ и $r = 0,52$ при $p = 0,001$), ЭТ-1 и CRP ($r = 0,35$ и $r = 0,38$ при $p = 0,01$), содержанием гомоцистеина и CRP ($r = 0,79$ и $r = 0,67$ при $p = 0,001$), что косвенно свидетельствует о патогенетической роли воспалительных медиаторов в формировании эндотелиальной дисфункции. Таким образом, развитие преэклампсии в период беременности, характеризуется нарушением дисбаланса вазоконстрикторов и вазодилататоров, а также выраженной активацией эндотелиальных клеток, ассоциированной с повышением уровня гомоцистеина и медиаторов воспаления (TNFα, IL-10 и CRP) что возможно связано с изначально повышенным артериальным давлением и дисфункцией эндотелия не диагностированной у этих женщин до беременности, в отличие от пациенток с ХАГ, функции эндотелия которых с находятся под контролем постоянного лечения.

ИММУНОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

ИММУННЫЙ СТАТУС И АРТЕРИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ

Гаврилюк Е.В., Михин В.П., Конопля А.И., Шарова В.Г., Замяткина О.В., Шатунов А.А.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. В настоящее время все больше нозологий и не только инфекционной этиологии обусловлены изменением иммунного статуса, как на системном, так и на местном уровне, при этом прогноз и исход заболевания порой напрямую зависит от компенсаторных механизмов поддержания иммунного гомеостаза. Большое количество исследований, посвященных изучению этиологии и патогенеза артериальной гипертонии (АГ), не полностью отвечают на вопросы развития артериальной гипертонии.

Цель и задачи. Определение уровня цитокинов и компонентов системы комплемента у пациентов с артериальной гипертонией и установление взаимосвязи с эффективностью проводимой антигипертензивной терапией.

Материалы и методы. На базе ОБУЗ «Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи» под постоянным наблюдением находилось 48 пациентов с верифицированным, согласно рекомендациям Европейского общества гипертонии и Европейского общества кардиологов (2013), диагнозом артериальная гипертония (АГ). При этом пациенты с АГ были разделены на 2 группы: 25 пациентов, у которых через 2 и 4 недели от начала исследования значения АД достигали целевых значений (1 группа) и 23 больных АГ, у которых на фоне проводимой антигипертензивной терапии АД не достигало целевых значений (2 группа). В качестве контроля использовались показатели 13 здоровый доноров (6 женщин и 7 мужчин), средний возраст которых составил 38,6±2,8 лет. Определение уровня TNF, IL-1α, IL-6, IL-8, IL-10, РАИЛ, неоптерина, IL-2, C3, C3α, C4, C5, C5α, фактора H, C1-ингибитора и иммуноглобулинов классов M, G, A проводилось с помощью тест-систем (ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург) методом твердофазного иммуно-ферментного анализа.

Результаты. У пациентов с ЭАГ на момент поступления в стационар в плазме крови выявлено повышение концентрации провоспалительных (TNF, IL-1α, IL-6, IL-8) и противовоспалительных цитокинов (IL-10, РАИЛ), неоптерина и IL-2. При поступлении в клинику у пациентов с ЭАГ в плазме крови выявлено повышение концентрации C3, C4, C5a-компонентов системы комплемента, фактора H и снижение концентрации иммуноглобулинов класса M. При этом достоверных различий в уровне изучаемых показателей иммунного статуса до лечения в 1 и 2 группах получено не было. Использование стандартного комплексного лечения у данной категории пациентов позволило нормализовать уровень TNF, снизить, но не до уровня нормы, уровень IL-1α, IL-8, IL-10, РАИЛ и неоптерина у 1 группы пациентов. Аналогичная фармакотерапия у пациентов 2 группы оказалось менее эффективно, так как корригирует концентрацию в плазме крови IL-8, IL-10 и неоптерина. Применение комплексного стандартного лечения у пациентов 2 группы позволило к моменту выписки из стационара снизить до уровня нормы концентрацию фактора H, не влияя на остальные показатели системы комплемента, тогда как у пациентов, у которых получилось достичь целевых значений артериального давления, проводимая терапия нормализует концентрацию C5a-компонентов системы комплемента и корригирует уровень фактора H.

Заключение. Высокие цифры артериального давления оказывают воздействие на эндотелий сосудов, являющиеся источником провоспалительных цитокинов, повышение уровня которых вызывает сосудистые и гемодинамические эффекты приводят к еще большей нейрогуморальной активации, активации компонентов системы комплемента по классическому и альтернативному путям, развитию иммунного воспаления, нарушению фибринолиза и еще большему повреждению миоцитов и межклеточного вещества в миокарде. Итогом этих сложных изменений является ремоделирование левого желудочка с дальнейшим прогрессированием систолической и диастолической дисфункции. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли иммунного статуса в патогенезе артериальной гипертонии.

ОСОБЕННОСТИ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ КАЛЬЦИНИРОВАННОМ АОРТАЛЬНОМ СТЕНОЗЕ

Гуляев Н.И., Мешкова М.Е., Иванов А.М., Полтарейко Д.С., Малахова Е.А.

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

Введение. Проблема патогенеза кальцинированного аортального стеноза (КАС), несмотря на более чем 300-летнее исследование, до настоящего времени не решена. Данный вопрос часто рассматривается через «призму» эндотелиальной дисфункции на фоне длительно существующего процесса воспаления. Показано, что при изменениях в строме аортального полулуния степень адгезии эндотелиоцитов возрастает более чем в 4 раза. Одну из ключевых ролей в процессе адгезии лимфцитов и моноцитов на поверхности эндотелия играет Е-селектин. На фоне его экспрессии происходит активная инфильтрация тканей циркулирующими в крови иммунокомпетентными клетками, что способствует повышению уровня пере-

кисного окисления липидов и белков аортальных полулуний за счет образования активных форм кислорода, супероксид-радикалов, усиливая воспалительный процесс, патологические регенерационные процессы, способствуя склерозу и кальцинозу клапана аорты.

Цель и задачи. Целью данного исследования явилась оценка особенностей адгезивных свойств эндотелия у больных различной степенью кальцинированного стеноза клапана аорты с помощью определения уровней sE-селектина.

Материалы и методы. У 90 пациентов, разделенных на три группы (больные с кальцинозом аортальных полулуний без стенозирования; умеренный стеноз клапана аорты; тяжелый/критический стеноз клапана аорты), сопоставимых по возрасту и полу, проведено определение уровней sE-селектина в образцах сыворотки крови. Концентрации данного аналита исследовали методом иммуноферментного анализа (тест-система фирмы eBioscience, Bender MedSystems, Австрия). Средние значения исследуемых показателей представлены медианой (Me, квартили $Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$).

Результаты. Установлено, что в группе больных с умеренным стенозом клапана аорты содержание sE-селектина составило 61,1 (43,0-83,0) нг/мл (n = 30). Данный показатель был достоверно выше группы с кальцинозом аортальных полулуний без стеноза – 41,8 (24,1-66,0) нг/мл (p = 0,027, n = 30) и группы тяжёлого/критического КАС – 35,5 (23,5-47,5) нг/мл (p = 0,004, n = 30), что отличается от общепринятой концепции о его непрерывном нарастании по мере увеличения степени стеноза.

Заключение. Отсутствие выраженных нарушений адгезивных свойств эндотелия обусловливает длительное протекание кальциноза полулуний без признаков прогрессирования стенозирования клапана аорты. Снижение уровня sE-селектина у больных с тяжёлым и критическим аортальным стенозом может свидетельствовать о снижении пролиферативной способности эндотелия, перехода заболевания в конечную фазу. Таким образом, повышение уровня sE-селектина у больных с умеренным кальцинированным стенозом клапана аорты должно учитываться в лечебной тактике как один из факторов прогрессирования заболевания.

ЭФФЕКТЫ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА СИСТЕМНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ, УРОВНИ BDNF, IGF-2 И NT-4 ПРИ СИНДРОМЕ МЯГКОГО КОГНИТИВНОГО СНИЖЕНИЯ

Малашенкова И.К.[1, 2], Хайлов Н.А.[1], Крынский С.А.[1, 2], Огурцов Д.П.[2], Селезнева Н.Д.[3], Федорова Я.Б.[3], Пономарева Е.В.[3], Колыхалов И.В.[3], Гаврилова С.И.[3], Дидковский Н.А.[2]

[1] Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт», Москва, Россия
[2] Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия
[3] ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Синдром мягкого когнитивного снижения (MCI) амнестического типа является предстадией болезни Альцгеймера. Именно на этом этапе болезни терапия может быть эффективной в плане улучшения состояния и качества жизни пациентов, замедления прогрессирования нейродегенерации. Ранее нами показано наличие системного воспаления и преобладание провоспалительных цитокинов над противовоспалительными белками в системном кровотоке (Малашенкова и соавт., 2016), что совпадает с данными других авторов (Brosseron F. et al., 2014). Последние годы внимание исследователей привлечено также к уровню нейротрофических факторов (НФ) в крови, который коррелирует с когнитивным снижением при многих заболеваниях мозга. НФ синтезируются нейронами и клетками глии, участвуют в регенерации нейронов, способствуют обучению и консолидации памяти, стимулируя процессы синаптической пластичности. НФ могут вырабатываться мононуклеарными клетками периферической крови, что свидетельствует об участии этих белков в иммунном ответе. С учетом данных литературы можно предположить влияние периферических НФ на их синтез в мозге через эпителий гематоэнцефалического барьера. В терапии когнитивных расстройств используют препарат Церебролизин, содержащий активные фрагменты нейротрофических факторов, инсулиноподобных факторов роста, биологически активные пептиды (энкефалины, орексин, галанин).

Целью работы было изучение влияния нейротрофической терапии на системное воспаление и уровни нейротрофических факторов (BDNF, IGF-2, NT4) при MCI амнестического типа.

Обследовали 20 больных (16 жен., 4 муж., средний возраст 72,6±3,2 лет), соответствующих критериям диагноза MCI амнестического типа. Пациентам проводился курс терапии церебролизином (20 внутривенных инфузий по 30 мл в 100 мл физиологического раствора в течение 4 недель). Перед началом лечения, через 10 и через 26 недель оценивали нейропсихологический статус и определяли методом ИФА сывороточный уровень маркеров воспаления (С-реактивный белок (СРБ), кортизол), иммуноглобулинов (IgM, IgG) и НФ, включая нейротрофический фактор мозгового происхождения (BDNF), инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF-2), нейротрофин-4 (NT-4).

Результаты. Уровень СРБ в начале лечения у большинства больных был повышен, в среднем до 14,2 мг/л. После курса лечения происходило снижение уровня СРБ (14,2±5,5; 11,8±5,2; 5,35±3,6 мг/л соответственно). Достоверного влияния на средний уровень кортизола терапия не оказывала, но при исходно сниженном уровне кортизола наблюдалось его повышение, а при повышенном – снижение до нормального уровня. Выявлено достоверное снижение (в пределах нормальных значений) содержания IgM и IgG после терапии.

Были обнаружены особенности динамики уровня НФ у пациентов в зависимости от эффекта терапии. Так, у всех 10 пациентов с хорошим эффектом BDNF в динамике снижался (достоверность различий между начальной точкой и точкой 10 нед. p = 0,008), а у 10 пациентов с незначительным эффектом и без эффекта уровень BDNF достоверно не изменялся. IGF-2, напротив, достоверно не изменялся у больных с хорошим эффектом лечения, а у больных с минимальным эффектом и без эффекта, как правило, повышался (p = 0,044). Также были отмечены различия по динамике уровня NT-4 в зависимости от эффекта лечения.

Таким образом, в данном проспективном исследовании показано противоспалительное действие терапии церебролизином у больных MCI. Этот эффект был длительным, достигая наибольшей выраженности через 26 недель после начала исследования. Характер изменений сывороточных уровней нейротрофинов после лечения был разнонаправленным. В частности, BDNF проявлял

тенденцию к снижению, причем наиболее заметным оно было у пациентов с хорошим клиническим эффектом терапии. Возможным объяснением этого является влияние на секрецию BDNF периферическими Т- и В-клетками, связанное с иммуномодулирующим и противовоспалительным действием терапии.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ УРОВНЯ TNFα, IL-10 И ММП-1 У ПАЦИЕНТОВ С ИБС ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

Маркелова Е.В., Шкорик Е.В., Силаев А.А.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, Россия

Фактор некроза опухоли-α (TNFα) влияет на функциональные свойства эндотелия, участвует в метаболизме липидов, в процессах свертывания крови (Корженевская К.В. и соавт., 2011). Интерлейкин-10 (IL-10), подавляя патологическую воспалительную реакцию, способствует регенерации поврежденного миокарда и замедляет свёртывание крови. А матриксная металлопротеиназа-1 (ММП-1) может играть ключевую роль в разрыве уязвимой атеросклеротической бляшки (Cavusoglu E.et al., 2015).

Цель. Определить диагностическую роль уровня TNFα, IL-10 и ММП-1 в риске возникновения тромбоэмболических осложнений (ТЭО) у пациентов после аортокоронарного шунтирования (АКШ).

Материалы и методы. Исследовано 75 больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) до и после АКШ в возрасте от 45 до 74 лет. Пациенты после АКШ были разделены на две группы: I – 25 больных с ТЭО после АКШ (острый инфаркт миокарда, ишемический инсульт, тромбоэмболия легочных ветвей); II – 50 больных с ИБС без осложнений после АКШ. Забор крови осуществлялся до АКШ, в 1-е, 3-и, 7-е и 12-е сутки после АКШ. Определение уровня TNFα, IL-10 и ММП-1 проводилось в сыворотке крови методом твердофазного ИФА, с использованием реактивов R&D Diagnostics Inc., USA. Результаты выражали в пг/мл и нг/мл. Данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Me, Q_{25}, Q_{75}). Внутри и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, χ^2 критерия в рамках прикладной программы SPSS υ.16. Статистически достоверным считали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты. TNFα у пациентов с ТЭО был повышен в 9-10 раз по сравнению с здоровыми людьми (2,8 (0,8; 10,9) пг/мл, $p < 0,01$) и его значение до операции было статистически выше ($p < 0,05$), чем во II группе (9,46 (4,86; 10,98) пг/мл). Во II группе концентрация TNFα была повышена в 2-4 раза, χ^2 между группами 4,28 при $p < 0,05$, то есть выявлена достоверная связь повышенного значения TNFα (выше 24 пг/мл) и риском возникновения ТЭО после АКШ. Определено значительное увеличение ММП-1 в I группе, ее уровень до АКШ (4,35 (3,5; 7,5) нг/мл) был выше вдвое ($p < 0,05$), чем во II группе (1,98 (1,34; 2,61) нг/мл). Выявлена сопряженность повышения ММП-1 выше 3,3 нг/мл ($\chi^2 = 6,66$, $p < 0,01$) и IL-10 выше 65 пг/мл до АКШ и выше 320 пг/мл в 1-е сутки после АКШ ($\chi^2 = 3,97$, $p < 0,05$) с риском возникновения ТЭО у пациентов с ИБС после АКШ.

Заключение. Для выявления риска возникновения тромбоэмболических осложнений после АКШ, определен диагностически значимый уровень TNFα, ММП-1 и IL-10 в сыворотке крови пациентов до операции и в 1-е сутки после реваскуляризации миокарда.

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК С ИММУНОРЕГУЛЯТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Морозов С.А., Старостина Н.М., Шевела Е.Я., Штоббе А.А., Давыдова М.Н., Черных Е.Р.

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

Введение. Иммунная система играет ключевую роль в патогенезе ишемического инсульта, поскольку участвует в опосредовании как воспалительного ответа, так и активации репаративных процессов. Целью настоящей работы явилось исследование количественного содержания различных субпопуляций регуляторных клеток и их взаимосвязи тяжестью инсульта и ранним исходом.

Материалы и методы. В исследование были рекрутированы 36 пациентов с ишемическим инсультом (19 мужчин и 17 женщин в возрасте от 40 до 79 лет) с тяжестью инсульта ≥ 4 баллов по шкале тяжести инсульта (NIHSS). Обследование проводилось в остром периоде – через 22-44 часа с момента развития инсульта. Ранний исход (через 30 дн) оценивался по модифицированной шкале Рэнкина (mRs). Контролем служили 20 доноров. Количество регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^{hi}$, $CD4^+CD25^+CD127^-$), гранулоцитарных и моноцитарных миелоидных супрессорных клеток (Lin-HLA-DR-, $CD33^+$ и $CD14^+$HLA-DR^-); а также классических ($CD14^{++}CD16^-$), промежуточных ($CD14^{++}CD16^+$) и альтернативных моноцитов ($CD14^+CD16^{++}$) исследовали методом проточной цитофлюориметрии с использованием соответствующих моноклональных антител.

Результаты. По сравнению с донорами пациенты в остром периоде ишемического инсульта характеризовались повышенным содержанием $CD4^+CD25^+$Т-клеток – (Me 5,2 *vs* 3,1%, $p_U = 0,026$); $CD4^+CD25^{hi}$Т-клеток (Me 2,2 *vs* 1,0%, $p_U = 0,02$) и $CD4^+CD25^+CD127^-$ (Me 6,1 *vs* 5,0%, $p_U = 0,001$). Кроме того, пациенты с инсультом отличались более высоким содержанием гранулоцитарных (Me 12,2 *vs* 6,3%, $p_U = 0,00001$) и моноцитарных (Me 3,1 *vs* 2,0%, $p_U = 0,005$) миелоидных супрессорных клеток. В периферической крови пациентов регистрировалось повышенное количество промежуточных (Me 7,5 *vs* 3,0; $p_U = 0,0004$) и альтернативных моноцитов (Me 7,5 *vs* 2,0%, $p_U = 0,005$) на фоне снижения доли классических моноцитов (Me 78 *vs* 88,0%, $p_U = 0,003$). В подгруппе пациентов с NIHSS < 18, тяжесть инсульта (балл по NIHSS) коррелировал с уровнем лейкоцитов ($Rs = 0,48$; $p = 0,009$), нейтрофильно-лимфоцитарным индексом ($Rs = 0,61$; $p = 0,0007$) и концентрацией СРБ ($Rs = 0,52$; $p = 0,004$), что указывало на взаимосвязь тяжести инсульта с воспалительным процессом. В этой подгруппе нейтрофильно-лимфоцитарный индекс (как показатель воспаления) значимо коррелировал с абсолютным количеством Lin-HLA-DR^-CD33^+ гранулоцитарных миелоидных супрессорных клеток ($Rs = 0,65$; $p = 0,0002$), и на уровне тренда – с долей $CD14^+$HLA-DR^- моноцитарных миелоидных супрессорных клеток ($Rs = 0,38$; $p = 0,01$). При анализе ранних исходов выявлена обратная взаимосвязь

между относительным содержанием $CD14^{++}CD16^{+}$ промежуточных моноцитов с баллом mRs (Rs = -0,55; p = 0,04), что свидетельствует о лучшем восстановлении у пациентов с более высоким количеством $CD14^{++}CD16^{+}$ моноцитов.

Заключение. Полученные результаты демонстрирует, что у пациентов в остром периоде ишемического инсульта наблюдается возрастание различных субпопуляций регуляторных клеток, некоторые из которых коррелируют с выраженностью воспалительного процесса и эффективностью раннего восстановления. Дальнейшие исследования этих субпопуляций регуляторных клеток могут представлять интерес с точки зрения оценки их прогностической значимости при инсульте.

КОГНИТИВНАЯ ДИСФУНКЦИЯ, АКТИВНОСТЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ АОРТОКОРОНАРНОМ ШУНТИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ И ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ОПЕРАЦИИ OFF-PUMP

Овчинников Д.А.[1, 3], Воробьев Е.А.[1], Гарнюк В.В.[2], Баранцевич Е.Р.[1, 3], Бельтюков П.П.[2]

[1] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
[3] ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Оперативные вмешательства сопровождаются реакцией со стороны иммунной системы, что может проявляться изменениями цитокинового профиля. Матриксная металлопротеиназа типа 9 (MMP9) продуцируется преимущественно в костном мозге и в лимфоидной ткани. Около 70% MMP9 по данным ресурса Protein Atlas секретируется макрофагами и лимфоцитами. Поэтому изменения активности MMP9 могут рассматриваться как реакция иммунной системы. Изменения активности MMP в плазме крови наряду с окислительным стрессом могут нарушать функции эндотелия и гемато-энцефалического барьера.

Основной **целью** настоящего исследования стала оценка связи между активностью MMP (MMP2 и MMP9), а также изменениями цитокинового профиля с выраженностью когнитивной дисфункции в зависимости от способа выполнения операции аортокоронарного шунтирования (АКШ). Для достижения поставленной цели, помимо определения уровней цитокинов и активности MMP, проведена оценка когнитивной дисфункции у пациентов до и после выполнения операции АКШ.

Материалы и методы. В исследование включены 70 пациентов, с ишемической болезнью сердца (ИБС), планируемых на операцию АКШ. Диагноз ИБС установлен на догоспитальном этапе на основании типичной клинической картины и данных стресс-исследований. Стенокардия напряжения соответствовала III-IV классу. 42 пациентам АКШ проведена с использованием искусственного кровообращения (ИК), 28 пациентов прооперированы без применения ИК (off-pump). Рандомизация не проводилась.

Помимо стандартных клинических обследований все пациенты проходили неврологический осмотр и ряд нейро-психологических тестов: 1. Госпитальная шкала тревоги и депрессии – до операции. Положительный высокий результат теста рассматривали в качестве критерия исключения. Тесты на когнитивные нарушения за 2 суток до операции и на 7 сутки после операции: MMSE, Монреальская шкала (MoCa), FAB, TMT тест, корректурная проба. Концентрацию цитокинов, хемокинов и факторов роста,(IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-15, эотаксин, FGF-2, G-CSF, PDGF-bb, VEGF) оценивали в плазме крови за сутки до АКШ (T0) и через 2 часа после АКШ (T1), методом иммунофлюоресцентного анализа на приборе Luminex 200 Labmap system (Bio-Rad) с использованием набора Bio-Plex Suspension Array System (Bio-Rad). Для учета влияния разведения крови в результате инфузионной терапии концентрацию интерлейкинов рассчитывали с учетом изменения гематокрита. Активность MMP определяли методом желатиновой зимографии в 10% ПААГ с определением активности проMMP9, MMP9 и MMP2. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism5 с использованием критериев, соответствующих характеру распределения и объему выборки.

Результаты. Из примененных нейропсихологических тестов для выявления тонких изменений когнитивных функций у больных после АКШ, достаточно чувствительным оказался только тест «Монреальская шкала». Значимое снижение этого показателя (более 3 баллов по шкале MoCa) произошло у 15 из 42 больных группы ИК и 3 больных оперированных при работающем сердце из 28. Наиболее существенными и статистически значимыми изменениями в точке T1, как в группе ИК, так и в группе off-pump оказались повышение уровней IL-8, VEGF, Eotaxin, MMP9. Содержание PDGF-bb, G-CSF и IL-13 статистически значимо повышалось только в группе ИК. Ни в одной из групп пациентов не наблюдали значимых изменения MMP2 на фоне АКШ, хотя активность MMP2, как до операции, так и после нее, была значимо выше ($p < 0,05$) у пациентов с выраженным снижением когнитивных функций по результатам MoCa.

При сравнении групп пациентов между собой показано, что для группы ИК характерно статистически значимое повышение уровней IL-8, MMP9, Eotaxin по сравнению с группой off-pump.

Установлено наличие связи между снижением когнитивных функций на седьмые сутки после операции и изменением уровней IL-5 ($r = 0,348$, $p < 0,05$), IL-8 ($r = 0,278$, $p < 0,05$) и активности MMP9 ($r = 0,549$, $p < 0,01$) в плазме крови через 2 часа после АКШ для всех пациентов. Для MMP2 выявлена положительная значимая корреляция между уровнем MMP2 как до операции, так и после нее ($r = 0,598$, $< 0,01$) с уровнем снижения когнитивных функций по результатам тестирования MoCa. Для группы ИК также выявлена зависимость между снижением когнитивной функции и уровнем VEGF ($r = 0,398$, $p < 0,05$) и G-CSF ($r = 0,337$, $p < 0,05$) в точке T1.

Выводы. Активность MMP2 в обследованных группах ассоциирована со снижением когнитивных функций как до, так и после операции АКШ. Когнитивный дефицит после АКШ значимо выше в группе ИК, а степень его выраженности ассоциирована с повышенными уровнями цитокинов и MMP9.

УРОВНИ IL-8 В ДИНАМИКЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Прилуцкая И.А.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк, Донецкая Народная Республика

Введение. Ишемические инсульты (ИИ) занимают третье место в структуре летальности и рассматриваются как ведущая причина утраты трудоспособности и инвалидизации населения. В настоящее время общепринято, что наиболее распространенная причина ИИ – это тромбоз. Главными участниками запуска артериального тромбоза и поддержки атерогенеза являются тромбоциты. С другой стороны лейкоциты способствуют дальнейшему повреждению и воспалению при ИИ. Во время ишемии головного мозга характерно увеличение транс-эндотелиальной миграции лейкоцитов. После ишемии, циркулирующие лейкоциты высвобождают провоспалительные цитокины и хемокины. Наиболее изученными при ИИ являются СРБ, IL-1 и IL-6. Исследования IL-8 у больных ИИ единичны и противоречивы. Хемокин – интерлейкин-8 продуцируется стимулированными моноцитами, эндотелием и рядом других клеток. Он является мощным хемоаттрактантом для полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ), а также стимулирует дегрануляцию и респираторный взрыв этих клеток. Таким образом, IL-8 может способствовать накоплению полиморфноядерных лейкоцитов, увеличивает высвобождение радикалов кислорода, протеиназ и провоспалительных цитокинов при ишемическом повреждении головного мозга, усугубляя повреждение тканей. В соответствии с отдельными исследованиями было обнаружено значительное повышение IL-8 в плазме у больных ИИ, в то время как Pedersen et all (2004) не показывают изменение уровней IL-8 при ИИ по сравнению со здоровой контрольной группой. Есть предположение, что IL-8 может быть ещё более диагностически значимым цитокином при ишемическом инсульте у пожилых пациентов. Исходя из этого, определение уровней IL-8 в различные сроки после начала ИИ требует дальнейшего изучения.

Цель и задачи. Оценить уровни IL-8 в плазме у пациентов с ИИ в динамике.

Материалы и методы. Обследованы 13 пациентов с диагнозом ишемический инсульт. Определение уровня интерлейкина-8 в сыворотке крови проводилось в 1, 3 и 14 день заболевания. В качестве контрольной группы обследованы 50 здоровых доноров. Определение содержания IL-8 проводилось с помощью иммуноферментной тест-системы с высокой чувствительностью (2,0 пг/мл), достаточной стабильностью (годна в течение 12 месяцев), низким коэффициентом вариации (не более 5%). Статистическая обработка проведена при помощи программы «MedStat».

Результаты. Уровни IL-8 в 1-й, 3-й ИИ были значимо повышены по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). В 14 день после ишемического инсульта концентрация IL-8 снизилась и составила 8,7±1,4 пг/мл (95%ДИ 5,6-13,5) и имела статистически достоверную разницу с показателями данного цитокина в 1-й и 3-й дни ИИ ($p < 0,001$). Тем не менее уровни IL-8 на 14-й день ИИ были статистически достоверно выше по сравнению с показателями данного цитокина в контрольной группе 4,5±0,4 пг/мл ($p < 0,001$).

Заключение. Выявлено значительное повышение уровней интерлейкина-8 в плазме крови пациентов с ишемическим инсультом в первый, третий день после начала его. Уровни данного цитокина у обследованных больных снижались к 14 дню наблюдения но оставались существенно выше концентрации интерлейкина-8 в группе здоровых лиц.

СИСТЕМА IL-1 (IL-1β, IL-1α, IL-1ra), ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВЯЗИ С ВАЗОАКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ (ADMA, SDMA, eNOS, iNOS, NT-proBNP, NT-proCNP)

Радаева О.А.[1], Симбирцев А.С.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Медицинский институт, Саранск, Россия
[2] ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Значимым компонентами регуляции сосудистого тонуса являются NO, ATII, ET-1, синтез которых, через ряд ферментативных систем (NO-синтазы, ADMA-SDMA и др.) зависим и от цитокиновых механизмов регуляции (Caniffi C., 2016). На сегодняшней день нет единого представления о взаимодействии в системе цитокины-NO-синтазы-A/SDMA-NO-ATII-ET-1-цитокины. Цель – в период 8-летнего проспективного наблюдения проанализировать взаимосвязь сывороточных концентраций IL-1β, IL-1α, IL-1ra с уровнем вазоактивных веществ (ADMA, SDMA, eNOS, iNOS, NT-proBNP, NT-proCNP) у пациентов с ЭАГ II стадии с учетом длительности заболевания и приема гипотензивных препаратов.

Материалы и методы. В течение 8 лет проводилось комплексное обследование 200 женщин и 100 мужчин с ЭАГ II стадии (возраст – 51,5±2,8 лет). В сыворотке больных иммуноферментным методом определяли количество IL-1β, IL-1α, IL-1ra, а также ADMA, SDMA, eNOS, iNOS, NT-proBNP, NT-proCNP. Дополнительно обследовались пациенты с ЭАГ II стадии, сопоставимые по возрасту и полу с анамнезом патологии 10-14 лет без приема гипотензивных препаратов (100 человек). Данные представлены в виде среднего арифметического, стандартного отклонения. Проведение определения нормальности обосновало использование t-критерия Стьюдента и корреляционный анализ Пирсона.

Результаты. У больных с ЭАГ II стадии при длительности патологии 5-9 лет выявлено повышение ($p < 0,001$) провоспалительных компонентов системы IL-1(IL-1β-14,9 (4,8) пг/мл, IL-1α – 10,7 (3,52) пг/мл) при сравнении со здоровыми (2,6 (1,82) пг/мл и 1,87 (0,52) пг/мл, соответственно) без компенсаторного роста IL-1ra ($p > 0,05$). Данная тенденция нарастала при увеличении длительности патологии (10-15 лет) – ($p < 0,01$), более выражено при отсутствии гипотензивной терапии ($p < 0,001$). В начале заболевания уровень IL-1β, IL-1α положительно коррелировал ($r = 0,79$-$0,92$, $p < 0,001$) с гемодинамическими показателями, характеризующими сопротивление сосудистого русла (общее периферическое сопротивление, СПВ), при длительности ЭАГ II стадии более 10 лет – дополнительно с факторами, отражающими работу миокарда (ударный объем, ударный индекс, минутный объем кровотока, систолический индекс, ЧСС) – $r = 0,76$-$0,85$, $p < 0,001$. У пациентов с анамнезом гипертензии 5-9 лет и без гипотензивной терапии определены стимулирующие связи IL-1β и IL-1α с вазоконстрикторными веществами: ATII ($r = 0,82$, $p < 0,01$) и ET-1 ($r = 0,79$, $p < 0,01$), но с

компенсаторным синтезом eNOS (фактора, определяющего образование NO, способствующего релаксации сосудистой стенки), r = 0,82 (p < 0,001). При длительности патологии более 10 лет вне зависимости от гипотензивной терапии связь с eNOS меняется на отрицательную (r = -0,71, p < 0,01) с подавлением образования NT-proCNP (r = -0,68, p < 0,01)) на фоне положительных корреляций между IL-1β и ADMA (r = 0,77, p < 0,01), SDMA (r = 0,82, p < 0,001), NT-proBNP (r = 0,72, p < 0,01), что, учитывая эффекты действия данных веществ, может способствовать прогредиентному течению гипертензии. ADMA и SDMA – ферменты, блокирующие синтез NO в первую очередь через eNOS, а также совместно с IL-1β, IL-1α участвующие в регулировании метаболизма субстрата для образования NO – L-аргенина (Hsu C.P., 2016), а NT-proBNP – фактор с отрицательными инотропными эффектами на миокард и повышением риска развития ХСН. Результаты интерквартильного сопоставления уровней IL-1β, IL-1α и вазоактивных веществ указывают на неблагоприятные тенденции при росте IL-1β выше 15,1 пг/мл, IL-1α выше 10 пг/мл – в виде снижения синтеза eNOS, NT-proCNP и повышения ADMA, NT-proBNP (p < 0,01-0,001) вне зависимости от длительности заболевания и терапии. Изучение уровня IL-1ra определило у больных ЭАГ II стадии при длительности патологии 5-9 лет отрицательные корреляции с ET-1 (r = -0,73, p < 0,01) и ADMA (r = -0,75, p < 0,01), а также положительную связь с eNOS (p < 0,01), что указывает на его протективные линии воздействия. Данная тенденция сохраняется у лиц с длительностью ЭАГ 10-14 лет при условии приема гипотензивных препаратов, но с меньшей степенью достоверности (p < 0,05). В случаи отсутствия гипотензивной терапии сохраняется отрицательная корреляция только с уровнем ET-1 (r = -0,62, p < 0,05).

Заключение. Пациенты с разной длительностью ЭАГ II стадии имеют сопоставимые принципы цитокинзависимого прогрессирования заболевания, при этом длительность патологии приводит к усилению связей между IL-1β, IL-1α с вазоконтрикторами и ослаблению с протективными компонентами, что наиболее выраженно у лиц без терапии, но определяется и в группах больных с устойчивыми индивидуально высокими показателями IL-1β, IL-1α в (III-IV квартили повышения) даже на фоне клинически эффективного лечения, что подтверждает актуальность выявления новых цитокинзависимых патогенетических типов развития ЭАГ с целью выделения дополнительных групп прогрессирования заболевания.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ НЕПАРНЫХ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ ВЕТВЕЙ БРЮШНОЙ АОРТЫ

Савочкина А.Ю., Кузнецова А.С., Сумеркина В.А., Долгушина А.И.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия

Согласно современным представлениям развитие атеросклероза ассоциируется с хроническим воспалением, активацией и дифференцировкой моноцитов в атеросклеротической бляшке, с последующей её дестабилизацией. Вклад нейтрофилов в атерогенез остается малоизученным, однако предполагается, что иммобилизация нейтрофилов в периферический кровоток ассоциирована с продукцией провоспалительных медиаторов и индукцией воспаления (Yvonne Döring, 2015). Также ряд исследований показал, что увеличение количества нейтрофилов в периферической крови является независимыми факторами риска прогрессирования ишемической болезни сердца и может использоваться в качестве прогностического маркера сердечно-сосудистых заболеваний (Zernecke A. et al., 2008).

Цель. Оценить функциональную активность нейтрофилов периферической крови у пациентов с атеросклерозом висцеральных ветвей брюшной аорты.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 107 пациентов терапевтических отделений Челябинской областной клинической больницы. Медиана возраста больных составила 66 лет ($Q_{0,25}$-57; $Q_{0,75}$-81). Среди них было 63 (59%) мужчины и 44 (41%) женщины. Все больные разделены на две группы, в первую группу вошло 53 (49%) пациента с установленным атеросклерозом висцеральных ветвей брюшной аорты, во вторую группу 54 (51%) пациента без атеросклероза спланхнического бассейна. Всем больным была выполнена ультразвуковая допплерография непарных ветвей брюшной аорты на ультразвуковом сканере Voluson E6 (General Eelectric). В качестве биомеханического показателя мезентериального кровотока рассчитывалась скорость сдвига (Shear Rate), по формуле: SR = 4 × Vpeak/Vd. Функциональную активность фагоцитов периферической крови исследовали по показателям поглотительной способности частиц монодисперсного полистирольного латекса (активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число), показателям кислородзависимого метаболизма в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ): активности и интенсивности спонтанного и индуцированного НСТ-теста. Лизосомальную активность определяли по интенсивности люминисценции лизосом, обработанных акридиновым оранжевым (Фрейдлин И.С., 1984). Статистическую обработку данных проводили с использованием ПО IBM SPSS Statistic, v.22. Полученные данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$). Для сравнения показателей использовался критерий Манна–Уитни, корреляционный анализ проведен с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. При сравнительной характеристике иммунологических показателей в группе пациентов с атеросклерозом висцеральных ветвей брюшной аорты установлены достоверно меньшие значения интенсивности фагоцитоза нейтрофилов периферической крови – 0,8 ($P_{0,25}$-0,60; $P_{0,75}$-1,42), p = 0,07 и достоверно большие значения лизосомальной активности нейтрофилов – 362 у.е. ($P_{0,25}$-37,28; $P_{0,75}$-362,00), p = 0,031; в сравнении со второй группой пациентов: 1,48 ($P_{0,25}$-0,92; $P_{0,75}$-2,05) и 267 у.е. ($P_{0,25}$-205,50; $P_{0,75}$-313,50) соответственно. Корреляционный анализ установил наличие положительной взаимосвязи между значением скорости сдвига в чревном стволе и общей печеночной артерии и показателями активности (r = 0,352, p = 0,037) и интенсивности (r = 0,451, p = 0,003) фагоцитоза нейтрофилов периферической крови.

Выводы. Полученные данные указывают на необходимость дальнейшего изучения взаимосвязи параметров гемодинамики и функциональной активности нейтрофилов на различных этапах атерогенеза в бассейне брюшной аорты.

ВЛИЯНИЕ ГЕПАРИНА НА УРОВЕНЬ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ЧРЕЗКОЖНОЕ КОРОНАРНОЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВО

Сенькина Е.И.[1], Богомолов А.Н.[1], Мешкова М.Е.[2], Тишко В.В.[2], Малахова Е.А.[2]

[1] СПб ГБУЗ «Александровская больница», Санкт-Петербург, Россия
[2] Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Широкое внедрение в клиническую практику стентирования коронарных артерий достоверно улучшает прогноз у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), однако до 30% успешно выполненных процедур осложняется развитием рестеноза внутри стента (РВС). Значительную роль в этом процессе играет фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A). При возникновении острой ишемии миокарда, в частности – острого коронарного синдрома (ОКС) с последующим выполнением стентирования зачастую наблюдается интенсивная экспрессия VEGF-A и патологический ангиогенез, приводящий к быстрой васкуляризации и росту формирующейся над стентом неоинтимы. Стабильно высокий уровень VEGF-A отмечается в первые 7-10 дней после имплантации стента, после чего наблюдается постепенное его снижение до исходного в течение 2-3 недель. Согласно литературным данным, после планового стентирования больных стабильной ИБС резкое нарастание VEGF-A ассоциируется с высоким риском развития РВС. В настоящее время исследователями предпринимается попытка оценить прогностическую значимость VEGF-A в развитии рестеноза у больных ОКС.

Цель. Изучить динамику VEGF-A в плазме крови у больных ОКС до и после выполнения коронарного стентирования.

Материалы и методы. Исследованы образцы плазмы крови 51 пациента с ОКС в возрасте от 40 до 75 лет (средний возраст – 60,5±8,5 лет), непосредственно до и после выполнения коронарного стентирования. Все пациенты были разделены на 2 группы по принципу назначения гепарина на догоспитальном этапе: первая группа включила 31 пациента, которым за 30-45 мин до проведения стентирования вводился гепарин в дозе 5000 Ед, вторую группу составили 20 человек, которые по различным причинам перед стентированием гепарин не получили (самообращение, сомнения врачей СМП в диагнозе). Для определения концентрации VEGF-A в сыворотке крови использовали метод иммуноферментного анализа (тест-система фирмы eBioscience, Bender MedSystems, Австрия). Средние значения исследуемых показателей представлены медианой и ошибкой среднего. Сравнение статистической значимости различий производилась при помощи приложения XLSTAT критерием Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение. Уровень VEGF-A в плазме крови пациентов из первой группы перед выполнением коронарного стентирования был низким и составил 22,6±16,2 пг/мл, что обусловлено эффектами гепарина на VEGF-A (его блокада). На следующие сутки после стентирования было отмечено резкое нарастание уровня VEGF-A в этой группе до 545±247 пг/мл, ввиду отмены гепарина и перевода пациентов на двойную антиагрегантную терапию. Во второй группе достоверного различия уровней VEGF-A до и после стентирования не получено из-за отсутствия догоспитальной гепаринизации (356±179 пг/мл и 659±264,2 пг/мл соответственно; $p = 0,9$). Различия уровней VEGF-A в двух группах до выполнения стентирования было достоверным ($p < 0,001$).

Заключение. На основании полученных результатов и литературных данных следует отметить, что у больных с ОКС до проведения чрескожных коронарных вмешательств исследование уровня VEGF-A для оценки риска развития рестеноза нецелесообразно, так как блокирующий эффект гепарина не позволяет получить достоверные результаты данного показателя в отличие от больных стабильной формой ИБС, не получающих гепарин перед реваскуляризацией. В то же время следует рассмотреть возможность кратковременного применения низкомолекулярных гепаринов после проведения коронарного стентирования у пациентов с высоким риском развития рестеноза в стенте или после баллонной ангиопластики.

ХРОНИЧЕСКАЯ ИШЕМИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА: ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ И ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ

Суняйкина О.А., Шульгинова А.А., Гаврилюк В.П., Быстрова Н.А.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Ранее проведенные нами исследования выявили иммунные нарушения и изменения содержания и соотношения белков и липидов мембраны эритроцитов при хронической ишемии мозга (ХИМ), однако в литературе не освещены вопросы патогенетической роли эритроцитов в возникновении и развитии ХИМ во взаимосвязи с иммунными нарушениями.

Цель и задачи. Установление взаимосвязи между иммунными нарушениями и изменениями белково-липидного спектра мембраны эритроцитов при хронической ишемии мозга I стадии.

Материалы и методы. Под наблюдением находились 23 пациента в неврологическом отделении БМУ «Курская областная клиническая больница» с I стадией ХИМ на фоне гипертонической болезни II стадии в возрасте 50,2±5,1 лет. Иммунные нарушения оценивали по показателям в циркулирующей крови функционально-метаболической активности нейтрофилов, уровню в плазме крови цитокинов, компонентов комплемента. Мембраны эритроцитов выделяли из 10 мл гепаринизированной крови методом G.T. Dodge, липиды мембран определяли с помощью тонкослойной хроматографии, а белки методом электрофореза по методу U.K. Laemmli.

Результаты. В плазме крови больных ХИМ до начала лечения установлено повышение концентрации провоспалительных цитокинов: TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, IL-18 и противовоспалительных: IL-4, IL-10 и IL-1ra. У больных с ХИМ перед началом лечения в плазме крови выявлено снижение содержания C3 и C5-компонентов комплемента, C1-ингибитора, повышение компонентов C3a и C5a, уровень C4 и ингибитора фактора H остался в пределах нормы. У больных ХИМ определяется отсутствие изменений по сравнению со здоровыми донорами показателей активности и интенсивности фагоцитоза, увеличение НСТ-спонтанного. При ХИМ до лечения

установлено снижение в эритроцитарной мембране уровня α- и β-спектрина соответственно на 10,7 и 9,0%, анкирина на 25,2%, паллидина на 22,7%, белка полосы 4,5 на 36,4%, дематина на 26,7%, глицералььдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФД) на 9,6% при повышении содержания анионтранспортного белка (АТБ) на 9,9%, актина на 17,0%, тропомиозина на 37,7% при нормальном уровне белка полосы 4.1 и глутатион-S-трансферазы (Г-S-Т). При поступлении в клинику у больных ХИМ выявлено снижение в эритроцитарной мембране содержания фосфатидилхолина (ФХ) на 27,1%, фосфатидилэтаноламина (ФЭ) на 18,8%, фосфатидилинозитола (ФИ) на 23,5%, глицерофосфолипидов на 9,4%, сфингомиелина (СМ) на 34,6%, фосфолипидов на 12,5%, эфиров холестерола (ЭХ) на 16,3%, холестеринов на 7%, повышение уровня лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 39,0%, триацилглицеролов (ТАГ) на 34,7%, неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) на 24,4%, при нормальном содержании фосфатидилсерина (ФС), холестерола (Х) и моно- и диацилглицеролов (МАГ, ДАГ). Анализируя матрицу множественной корреляции Спирмена между изучаемыми показателями иммунного статуса и белково-липидного спектра мембран эритроцитов установлены положительные и отрицательные достоверных связи, наиболее выраженные из которых между концентрацией IL-6 и представительности анкирина ($p = 0,91$) и глутатион-S-трансферазы ($p = 0,91$), сфингомиелина ($p = 0,93$); уровнем С3а и представительностью дематина ($p = 0,92$) и фосфатидилинозитола ($p = 0,88$); уровнем фактора Н и представительностью анионтранспортного белка ($p = 0,93$).

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при ХИМ I стадии наблюдаются выраженные изменения иммунного статуса и белково-липидного спектра мембран эритроцитов. Нарушения иммунного статуса и белково-липидного спектра мембран эритроцитов тесно связаны между собой, что обуславливает взаимообусловленность данных звеньев гомеостаза в патогенезе ХИМ, что необходимо учитывать при разработке эффективных методов лечения у данной категории пациентов.

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ И СУРФАКТАНТ ЛЕГКИХ В ДИНАМИКЕ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

Трушникова Р.В., Лукина С.А.

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия

Введение. Развитие дизрегуляционной нейросоматической патологии значительно усугубляет тяжесть состояния пациентов с ишемическим поражением мозга. Летальность в ранние сроки (первые 30 дней) ишемического инсульта достигает 34,6% (Скворцова В.И. и соавт., 2006). Частой причиной смерти больных является дыхательная недостаточность на фоне развития застойных пневмоний, респираторного дистресс-синдрома (Сон А.С. и соавт., 2010). Важнейшим адаптационным механизмом респираторного отдела легких является сурфактант, который наряду с антиателектатической функцией обеспечивает локальные иммунорегуляторные эффекты (Phelps D.S., 2001). Известно об активирующем влиянии белка SP-A сурфактанта на альвеолярные макрофаги, процессы фагоцитоза и киллинга (Kishore U. et al., 2006). Основные липиды сурфактанта, напротив, обеспечивают супрессорные эффекты (Yoshida M. et al., 2004).

Цель. Изучение фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов и состояния сурфактантной системы легких в динамике ишемического поражения мозга.

Материалы и методы. Опыты выполнены на половозрелых крысах-самцах в соответствии с этическим кодексом по проведению медико-биологических исследований. Неполную глобальную ишемию головного мозга моделировали путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий (Щербак Н.С., 2011). Исследования проводили через сутки ($n = 12$), 10 дней ($n = 16$) и 3 недели ($n = 10$) от начала эксперимента. В качестве контроля выступали ложнооперированные животные ($n = 11$). Получали бронхо-альвеолярные смывы. Определяли содержание фосфолипидов, холестерина, активность фосфолипазыA_2 в исследуемом материале. Изучали поверхностно-активные свойства сурфактанта, определяя поверхностное натяжение (ПН) смывов в цикле сжатие-растяжение мономолекулярной пленки, расчитывая индекс стабильности (ИС) альвеол. Оценивали эндопульмональную цитограмму, определяли фагоцитарную активность макрофагов по поглощению монодисперсных частиц латекса. Об интенсивности свободно-радикальных реакций судили по концентрации малонового диальдегида и активности каталазы в гомогенате легочной ткани. Статистический анализ выполнен на основе программного обеспечения «SPSS 17 for Windows». Сравнение параметров в группах с учетом характера распределения выборки проводили непараметрическим U-критерием Манна–Уитни.

Результаты. Было установлено, что через сутки от начала эксперимента (летальность 37%) в составе бронхоальвеолярных смывов возросло содержание макрофагов ($p < 0,01$), с увеличением доли фагоцитирующих клеток ($p < 0,001$), повышением активности свободно-радикальных реакций в легочной ткани ($p < 0,01$). Изменения метаболизма сурфактанта характеризовались увеличением оборота фосфолипидов с повышением их продукции ($p < 0,01$) и катаболизма ($p < 0,001$). ПН бронхо-альвеолярных смывов возросло, ИС альвеол уменьшился ($p < 0,001$). Выявленные нарушения поверхностной активности сурфактанта могли быть обусловлены детергентным влиянием лизосоединений на выстилающий комплекс альвеол при высокой интенсивности реакций фосфолипазного гидролиза ($p < 0,001$). На десятый день эксперимента (летальность 57%) содержание макрофагов в бронхо-альвеолярных смывах уменьшилось, снизился фагоцитарный индекс и фагоцитарное число ($p < 0,001$). Через 3 недели (летальность – 83%) отмечали прогредиентное уменьшение фагоцитирующих клеток в составе бронхо-альвеолярных смывов и их активности (p, p_1, $p_2 < 0,001$). При этом продукция фосфолипидов сурфактанта к 3 неделе уменьшилась (p, $p_1 < 0,01$), ИС альвеол понизился в 1,9 раз (p, p_1, $p_2 < 0,01$). Активность ПОЛ и фофолипазыA_2 прогредиентно нарастали и к 3 неделе достигли максимальных значений (p, p_1, $p_2 < 0,001$). Выявленные изменения фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов и метаболизма липидов сурфактанта могут быть результатом гормональных сдвигов в условиях стресс-индуцированной реакции организма, а также следствием дизрегуляционных расстройств в условиях ишемического поражения мозга.

Заключение. Уменьшение фагоцитарной активности макрофагов легких наряду с ухудшением поверхностно-активных свойств выстилающего комплекса альвеол от-

ражают угнетение активности адаптационных процессов в легочной ткани и снижение эффективности механизмов органной резистентности в динамике ишемического поражения мозга.

ПРИМЕНЕНИЕ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ В КОРРЕКЦИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ОСТРОМ НАРУШЕНИИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ТИПА

Филатова М.С., Давыдова Е.В., Альтман Д.Ш.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия

Актуальность изучения цереброваскулярной патологии определяется ее широким распространением в современном мире, с неуклонной тенденцией роста, являясь ведущей причиной инвалидизации трудоспособного населения в экономически развитых странах, что определяет ее как одну из важнейших медицинских и социальных проблем.

Метод гипербарической оксигенации (ГБО) широко используется в лечении легких степеней ишемического инсульта, благодаря функции кислородообеспечения тканей. Важно назначать терапию в самые ранние сроки, при наличии высокого реабилитационного потенциала.

Цель. Изучить влияние гипербарической оксигенации на клинико-неврологические проявления ишемического инсульта и показатели апоптоза лимфоцитов в остром периоде заболевания.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе неврологического отделения ГБУЗ Челябинской областной клинической больницы. Обследовано 15 пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения ишемического типа, средний возраст 52±2,1 года. От всех больных получено информированное согласие на участие в исследовании. Диагноз установлен на основании анамнестических данных, данных неврологического осмотра, инструментальных данных (компьютерная томография головного мозга, транскраниальная доплерография), лабораторных данных (оценка системы гемостаза). На протяжении 10 дней пациентам, включенным в исследование, проводился курс ГБО в режиме изопрессии 1,2-1,3 АТА, при экспозиции 40 минут. Курс состоял из 10 сеансов, при параллельной стандартной терапии. Группа сравнения состояла из 15 человек: 7 мужчин и 8 женщин работоспособного возраста с ишемическим инсультом, которым проводилась стандартная медикаментозная терапия. Забор венозной крови для исследования проводили до лечения и на 10 сутки. Оценку апоптоза проводили, изучая экспрессию на лимфоцитах $CD95^+$ рецептор с помощью проточной цитометрии и уровень FasL, пг/мл, методом ИФА (Тест-система ЗАО «БиоХимМак»). Статистическую обработку материала проводили с помощью программы Statistica vers. 6.0

Результаты и обсуждение. До начала терапии ГБО у всех исследуемых в клинической картине преобладали двигательные нарушения различной степени выраженности в виде спастических гемипарезов, нарушения поверхностных видов чувствительности по гемитипу, когнитивные нарушения легкой и умеренной степени выраженности, астенические расстройства. Клинико-неврологическое обследование пациентов после 3-4 сеансов гипербарической оксигенации показало улучшение общего самочувствия, редукцию головной боли ($p < 0,01$), отмечено гипнотическое воздействие процедуры ГБО, в виде нормализации качества сна, отмечена стабилизация фона настроения, в сравнении с группой контроля, у которой данные показатели не изменились. По окончании курса терапии на 10 день проведения гипербарической оксигенации значимо уменьшился двигательный дефицит, в виде увеличения силы в паретичных конечностях, субъективно уменьшились явления гипалгезии, показана тенденция к восстановлению когнитивных функций, связанных с процессами высшей нервной деятельности мозга, что непосредственно связано с улучшением кислородонасыщаемости тканей и снижением уровня гипоксии нейронов коры. Иммунологическое исследование процессов апоптоза лимфоцитов показало выраженную тенденцию к снижению числа лимфоцитов с рецепторами $CD95^+$, отражающими готовность к Fas-зависимому апоптозу на 10 сутки после терапии ГБО, в сравнении с показателем до лечения, на фоне стойко повышенного уровня FasL, что имеет протективное значение в отношении некоторых популяций иммуноцитов. Отсутствие изменений в сыворотке количества лиганда к Fas-рецептору на лимфоцитах к окончанию курса лечения, может свидетельствовать о наличии саногенетических механизмов в отношении поврежденных иммуноцитов в условиях ишемии мозга. В группе сравнения изучаемые показатели не претерпели значимых изменений после стандартного лечения. Таким образом, включение в комплексную терапию сеансов гипербарической оксигенации показало значительный регресс неврологической симптоматики, ограничительное влияние на процессы апоптоза лимфоцитов, что позволяет рекомендовать данный метод в комплексной терапии острого периода ишемического инсульта.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ TGF-β1 У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ПОЧЕК ДО И ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

Фомина О.И.[1], Фисенко В.Г.[2], Силаев А.А.[2], Турмова Е.П.[1]

[1] ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Медицинский центр, Владивосток, Россия

Введение. Операции на сердце и искусственное кровообращение, не смотря на совершенствование технологий, являются мощными факторами агрессии и индуцируют в организме пациента каскад защитных реакций, которые повышают риск развития осложнений. Несмотря на развитие хирургической техники, методов анестезиологического пособия и защиты органов в условиях искусственного кровообращения (ИК), нерешенной остается проблема послеоперационных осложнений, большая часть которых связана с активацией каскада защитных реакций в ответ на агрессивное воздействие ИК. (Табакьян Е.А, Партигулов С.А., 2013; Колесников С.В., Борисов А.С., 2013). Острое повреждение почек (ОПП) является одним из них. Внимание многих авторов привлекают данные о корреляции изменения уровня цитокинов с дисфункцией почек и их прогностическая значимость.

Цель. Оценка диагностического и прогностического значения TGF-β1 у пациентов с острым повреждением почек до и после АКШ.

Материалы и методы. Определение уровня TGF-β1 проведено в сыворотке крови и моче методом ИФА (R&D Systems, USA) у 30 пациентов с ИБС обоего пола от 45 до 74 лет до и после АКШ. Пациенты были разделены на группы: с острым повреждением почек (I гр.), с острым повреждением почек и сопутствующей патологией в виде сахарного диабета 2 типа (СД 2 типа) (II гр.), без острого повреждения почек (группа контроля). Биологический материал забирался за сутки до операции, на 1-е, 2-е и 7-е сутки после операции. Статистическая обработка полученных данных проведена непараметрическими методами. Результаты представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. Сравнение средних значений в выборках осуществляли с помощью непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты выражали в пг/мл.

Результаты. Уровень TGF–β1 в сыворотке крови и моче у пациентов до операции с ОПП и ОПП с СД 2 типа превышал в 2 и 1,5 раза показатели группы контроля без ОПП ($p < 0,05$), что может быть ассоциировано с риском развития осложнени. Показатели, полученные на 2-е, 7-е сутки после АКШ, были повышены во всех исследуемых группах, но статически не значимы.

Заключение. TGF–β1 является фиброгенным фактором роста, ключевым медиатором в развитии гломерулосклероза и тубулоинтерстициального фиброза. Известно, что TGF–β1 достоверно снижает цитокин-продуцирующую активность ряда клеток, участвующих в ряде воспаления. Рецепторы к этому цитокину экспрессируются на многих клетках, в том числе моноцитах, макрофагах, клетках эндотелия, тучных клетках (Сергеенко И.В., Семенова А.Е., 2007; Hansson G.K., Libby P., 2006). Следовательно, избыточная концентрация данного цитокина в сыворотке крови и моче может привести к инициации фиброзирования в почках. Определение содержания данных цитокинов является полезным для прогнозирования развития острого повреждения почек, что, возможно, позволит провести коррекцию пери- и послеоперационной терапии.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1β И ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Хараева З.Ф., Хоконова Т.М., Ксанаев И.И., Хамизова М.М.

ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик, КБР, Россия

Введение. На сегодняшний день доказанным является факт вовлечения хронического воспаления в основные механизмы развития и прогрессирования сердечной недостаточности (СН), в том числе в процессы ремоделирования постишемизированного миокарда, его перегрузку объемом и/или давлением, формирования кардиосклероза. Во многих крупномасштабных исследованиях продемонстрированы тесные корреляции между увеличенными показателями провоспалительных цитокинов и развитием и прогрессированием СН и ее исходами. Однако не до конца изученными представляются вопросы о роли про/противововоспалительных цитокинов в формировании и прогрессировании артериальной гипертензии (АГ), структурных изменений миокарда при ишемической болезни сердца (ИБС)

Цель и задачи. Исследование сывороточных уровней провоспалительного цитокина – интерлейкина-1β, и противовоспалительного цитокина – интерлейкин-10 у пациентов с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертонией.

Материалы и методы. Обследовано 30 пациентов с ИБС и АГ (14 мужчин и 16 женщин, средний возраст 57±8 лет). Контрольную группу составили 30 соматически здоровых лиц (12 мужчин, 18 женщин, средний возраст 55±10 лет). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. В обследование не включали больных с уровнем гликозилированного гемоглобина более 10%, анемией, почечной недостаточностью, недавними (до 10 сут) эпизодами острой СН, острым коронарным синдромом в течение предшествующих 3 месяцев, воспалительными заболеваниями в стадии обострения, пароксизмальными тахикардиями, окклюзирующими заболеваниями сосудов нижних конечностей.

В комплекс инструментальных методов входили: рентгенография органов грудной клетки с верификацией признаков венозного застоя в легких, эхокардиография, тест 6-минутной ходьбы, электрокардиография. Показатели интерлейкина-1β (IL-1β) и интерлейкина-10 (IL-10) определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом с помощью тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (Россия). Реакции учитывали на иммуноферментном фотометре-анализаторе «Пикон». Статистический анализ проводился с использованием программы статистической обработки данных STATISTICA 9 (StatSoft Inc, США).

Результаты. При исследовании и оценке цитокинов у обследованных пациентов было выявлено значительное статистически значимое повышение показателей IL-1β и IL-10 в сравнении с показателями контрольной группы ($p < 0,001$).

Так, при оценке значений IL-1β было выявлено, что у больных с ИБС и АГ показатель IL-1β составил: 71,7±3,2 пг/мл, тогда как в группе контроля: 15,3±3,1 пг/мл ($p < 0,001$). При оценке значений IL-10 было выявлено, что у больных с ИБС и АГ показатель IL-10 составил: 49,7±2,8 пг/мл, тогда как в группе контроля: 10,2±3,0 пг/мл ($p < 0,001$).

Повышенные концентрации IL-1β свидетельствуют о выраженной воспалительной реакции в организме пациентов, в то время как увеличение уровня IL-10 может являться показателем хронического вялопротекающего системного воспалительного процесса, в котором, по всей видимости, задействован эндотелий сосудов. Воспалительный характер поражения эндотелия может быть вовлечен в атеросклеротическое поражение сосудов. В тоже время, длительно сохраняющиеся высокие показатели IL-1β приводят к повышенной активности клеток видового иммунитета, продукты активации которых, вовлечены в активацию надпочечников. Таким образом, создается патофизиологическая цепь неблагоприятного течения АГ, которую необходимо учитывать в комплексной терапии, а показатели цитокинов использовать в качестве диагностических и прогностических маркеров.

Заключение. Уровни провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β, так и противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 у больных с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца были значительно повышены по сравнению с данными показателями у здоровых лиц.

ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Шульгинова А.А., Караулов А.В., Быстрова Н.А., Конопля А.И.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Количество больных с явлениями хронической ишемии мозга (ХИМ) неуклонно растет, составляя не менее 700 случаев на 100 тыс. населения. Основными факторами риска развития ХИМ являются артериальная гипертензия, атеросклероз церебральных сосудов, метаболический синдром, сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца. В патогенезе каждого из этих факторов большую роль играют иммунные нарушения, в связи с чем проведены исследования по включению иммуномодуляторов в фармакологическую терапию ХИМ.

Цель и задачи. Установить эффективность Полиоксидония и Глутоксима в коррекции иммунных нарушений при ХИМ I и II стадии

Материалы и методы. Под наблюдением находились 59 пациентов в неврологическом отделения БМУ «Курская областная клиническая больница» с ХИМ на фоне гипертонической болезни II стадии, из них: 29 пациента с I стадией ХИМ и 30 со II стадией в возрасте 50±5 лет, разделенных на 6 групп по 9-10 больных. Все получали базовую фармакологическую терапию (БФТ) (эналаприл, винпоцетин, цераксон и мексикор). Пациенты 2-й и 5-й групп дополнительно получали Глутоксим, а 3-й и 6-й – Полиоксидоний. Иммунные нарушения оценивали по показателям в циркулирующей крови функционально-метаболической активности нейтрофилов, уровню в плазме крови цитокинов, компонентов комплемента и ингибиторов.

Результаты. В плазме крови больных ХИМ с I стадией до начала лечения установлено повышение концентрации провоспалительных (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17 и IL-18) и противовоспалительных (IL-4, IL-10 и IL-1ra) цитокинов. После проведенной БФТ концентрации IL-1β и IL-1ra нормализовались, IL-10 повышался в еще большей степени, содержание остальных исследованных цитокинов сдвигалось в сторону значений здоровых доноров. У пациентов, получавших дополнительно Глутоксим, по сравнению с предыдущей группой больных, нормализовалась концентрация IL-17, в еще большей степени корригировался, но не до параметров нормы, уровень TNFα, IL-6, IL-8 и IL-18 и повышалось содержание IL-4. У пациентов со II стадией ХИМ при поступлении в клинику в плазме крови также выявлено повышение уровня всех исследованных цитокинов. Проведенное базовое лечение нормализовало концентрацию IL-1β, корригировало в сторону значений здоровых доноров содержание остальных провоспалительных цитокинов и, в еще большей степени, повышало уровень IL-4 и IL-1ra. У больных, получавших Глутоксим, дополнительно нормализовалась концентрация IL-17, сдвигалось в сторону значений здоровых доноров содержание TNFα, IL-6, IL-8 и IL-18, еще в большей степени, повышался уровень IL-10. У больных с I и II стадией ХИМ перед началом лечения в плазме крови выявлено снижение содержания C3 и C5-компонентов комплемента, C1-ингибитора, повышение компонентов C3a и C5a, уровень C4 и ингибитора фактора H остался в пределах нормы. Несколько различными при поступлении в клинику у больных ХИМ с I и II стадией оказались результаты исследования функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови: отсутствие изменений по сравнению со здоровыми донорами показателей активности и интенсивности фагоцитоза (ФИ, ФЧ и ИАФ), увеличение НСТ-сп. со снижением ИСН у пациентов с I стадией ХИМ и повышение при II стадии всех исследованных параметров активности кислород-зависимых систем полиморфноядерных лейкоцитов (НСТ-сп., НСТ-ст., ФРН, ИСН). После БФТ у пациентов с обоими стадиями заболевания показатели функционально-метаболической активности нейтрофилов не изменились. Включение в схему фармакотерапии Глутоксима нормализует НСТ-сп. и ИСН у пациентов с I стадией ХИМ, нормализует НСТ-сп. и изменяет в сторону показателей здоровых доноров НСТ-ст., ФРН при II стадии. Применение Полиоксидония оказалось более эффективным по сравнению с Глутоксимом, как при I, так и при II стадии ХИМ.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о серьезных иммунных нарушениях, одинаковых со стороны лабораторных маркеров при обоих стадиях заболевания, которые можно рассматривать как наличие иммунного воспаления. Включение в БФТ иммуномодуляторов Глутоксима, в большей степени Полиоксидония, эффективно корригирует нарушенные параметры иммунного статуса, особенно при оказалось I стадии заболевания.

ИММУНОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЧЕВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА И ГУМОРАЛЬНОГО ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ С НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Беловолова Р.А.[1], Маврина Л.В.[2], Овсянникова Л.Ф.[2], Вороненко И.И.[1]

[1] ГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», Ростов-на-Дону, Россия
[2] МБУЗ «Городская больница № 20», Ростов-на-Дону, Россия

Нефротический синдром (НС) – клинико-лабораторный симптомокомплекс, характеризующийся: отеками переферическими, полостными; гипопротеинемией, диспротеинемией, протеинурией; гиперлипидемией, липидурией. НС возникает у детей при ряде приобретенных, наследственных, врожденных заболеваниях почек. В патогенезе НС большое значение придается нарушению иммунного статуса. Не смотря на широкую инфицированность ГВ в общей популяции (Исаков В.А. и соавт, 2013), роль ГВИ в развитии почечной патологии остается мало изученной. В детском возрасте до 5 лет чаще встречается первичная ГВИ. Формирование нефропатии при ГВИ связано с повреждением различных структур почечной ткани, развитием иммунокомплексного и\или аутоиммунного процесса (Игнатова М.С., 2011).

Цель. Выявить распространенность ГВИ у детей с НС. Оценить особенности иммунного статуса и гуморального противогерпетического иммунитета у детей в зависимости от стадии течения НС. Выработать тактику профилактики обострений НС и лечения рецидивирующей ГВИ у детей с НС, получающих иммуносупрессивную терапию.

Материалы и методы. обследованы дети с дебютом и/или рецидивом НС. Диагноз верифицировался по результатам клинико-лабораторного обследования согласно стандартам диагностики и лечения НС. Оценка иммунного статуса включала определение субпопуляций лимфоцитов с маркерами: $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3\text{-}CD16^+$, $CD3^-CD19^+$ с помощью моноклональных антител и регистрацией результатов на проточном цитометре; содержания сывороточных иммуноглобулинов классов М, G, А – методом радиальной иммунодиффузии, уровня ЦИК – при осаждении 4,16% р-ра ПЭГ, метаболической активности фагоцитов по НСТ-тесту. Определение противогерпетических антител (Ат) классов IgM, IgG и авидности антител IgG проводили методом ИФА с наборами реагентов фирмы «Вектор Бест».

Результаты. Под наблюдением находилась группа из 23 детей в возрасте от 2 до 16 лет с НС, из них у 8 (35%) человек отмечался дебют заболевания, у 15 человек (65%) – рецидив. Общей закономерностью реакции иммунной системы было развитие дисбаланса субпопуляций лимфоцитов, дисиммуноглобулинемии, нарушения метаболической активности фагоцитов. При дебюте заболевания отмечалось снижение общего количества Т-лимфоцитов (до 62,0±1,5%), снижение ИРИ (1,5) за счет уменьшения $CD3^+CD4^+$ (38,3±2,0%) и увеличения $CD3^+CD8^+$ (27,0±2,0%) лимфоцитов; увеличения уровня IgM (2,3±0,4 г/л) и ЦИК (90,5±10,1 ед). При рецидиве НС – более выраженное снижение количества $CD3^+$ (до 56%); $CD3^+CD4^+$ (до 24%) лимфоцитов. Уровень IgM (до 1,3 г/л) и ЦИК (до 60ед) увеличивались менее выраженно; уменьшался резервный потенциал фагоцитов (коэффицент стимуляции в НСТ – 1,3±0,1ед).

Общая инфицированность ГВИ у обследуемых детей (присутствие любых противогерпетических Ат) составила 87%. В 74% случаев (17 чел) выявлялась ВЭБ инфекция, в 70% (16 чел). – ЦМВИ; ВПГ (1+2 т) – в 44% (10 чел). У 39% обследуемых (7 чел) отмечалось сочетание ВЭБ+ЦМВ+ВПГ. У 17% детей – микст инфекция – ВЭБ+ЦМВ. У 1 ребенка выявлялась – ВЭБ+ВПГ. У ряда пациентов имела место моно-инфекция: ВЭБ – 13%. ЦМВ (Ат IgG высокой оптической плотности) регистрировались у 12% обследованных. У детей до 5-ти лет чаще отмечался дебют НС и первичная ГВИ (обнаружение Ат Ig M и\или низкоавидных IgG и\или ДНК герпесвирусов в ПЦР), представленная ВЭБ или ЦМВ. В 12,6% случаев у детей при рецидиве НС не выявлялись ранее обнаруживаемые Ат к ГВИ, что может быть связано с влиянием иммуносупрессивной терапии и требовало дополнительного ПЦР – обследования.

Всем детям с НС, получающим патогенетическую иммуносупрессивную терапию, при наличии персистирующей ГВИ с целью предотвращения обострения хронической ГВИ, были назначены противовирусные препараты, а также рекомбинантные интерфероны. Эффективность терапии оценивалась по повторным исследованиям. В 100% случаев реактивация ГВИ не была выявлена.

Заключение. У детей с НС отмечалась высокая частота (86%) инфицированности ГВ. Наиболее распространенные ГВИ: ВЭБ (83%) , ЦМВ (78%) у детей до 5-ти лет, а также микст-инфекции ВЭБ+ЦМВ+ВПГ (39%) – старше 5ти лет. Рецидивирующий характер течения НС является показанием для определения иммунного статуса и состояния гуморального противогерпетического иммунитета. С целью снижения частоты обострений НС и профилактики реактивации ГВИ в комплексное лечение НС необходимо включение противовирусных препаратов и рекомбинантных интерферонов.

ОСТРЫЙ ОБСТРУКТИВНЫЙ И НЕОБСТРУКТИВНЫЙ ПИЕЛОНЕФРИТ: ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУННЫХ И ОКСИДАНТНЫХ НАРУШЕНИЙ

Джаримок А.Р., Шатохин М.Н., Конопля А.И., Гаврилюк В.П., Маврин М.Ю.

Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Введение. По мере прогрессирования бактериально-воспалительного процесса в почке и возникновения хронического течения заболевания развивается иммунологическая недостаточность. Это связано с персистенцией микроорганизмов, пролонгированным антигенным воздействием, приводящим к истощению резервных возможностей иммунной системы, и иммунодепрессивным действием длительной антибактериальной терапии, что вызывает выраженные сдвиги в общем гомеостазе и метаболическом статуса в частности.

Цель и задачи. Определение взаимосвязей изменений между иммунными и оксидантными нарушениями на системном и локальном уровне у пациентов с острым необструктивным и обструктивным пиелонефритом.

Материалы и методы. Под постоянным наблюдением было 56 пациентов (34 женщины и 22 мужчин) с подтвержденными инструментальными методами обследования диагнозами: острый серозный необструктивный (ОНП) (2 группа) и острый серозный обструктивный пиелонефрит (ООП) (3 группа). Уровень цитокинов, компонентов комплимента, их ингибиторов и определяли в плазме крови периферической крови и первой порции утренней мочи. Цитокины (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, IFNα, IFNγ, IL-4, IL-10, IL-1ra) и sIgA (в моче) выявляли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Компоненты системы комплимента (C3, C3a, C4, C5 и C5a), C1-ингибитора фактор H – определяли диагностическим набором с использованием двух принципов: гемолитического метода учета активации системы комплемента и ИФА-метода определения терминального комплекса, выявляемого специфическими антителами. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию в плазме крови и моче малоновый диальдегид (МДА) и ацилгидроперекиси (АГП). Для оценки состояния антиоксидантной системы определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Результаты. У пациентов с ОНП в плазме периферической крови установлено повышение концентрации провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-6, IL-8), IFNα и IFNγ. У больных ООП выявлены однонаправленные, но значительно более выраженные изменения цитокинового спектра: повышение уровня TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, IFNα, IFNγ, IL-4 и IL-10, снижение IL-1ra. Исследование системы комплимента установило у пациентов с ОНП перед началом лечения в плазме крови изменения 3 показателей из 7: повышение содержания C3- и C5a компонентов комплемента и снижение ингибитора – фактора H. У пациентов с ООП изменения оказались более значительными, т.к. выявлено повышение всех компонентов системы комплимента и разнонаправленное изменение ингибиторов – повышение C1-инг. и снижение фактора H. У пациентов с ОНП установлено повышение уровня продуктов ПОЛ (МДА и АГП), стабильных метаболитов оксида азота и снижение факторов антиоксидантной защиты (активности СОД и каталазы, содержания неоптерина). У больных с ООП, по сравнению с ОНП, изменения показателей окислительного стресса оказались более выраженными. Анализируя матрицу множественной корреляции Спирмена между изучаемыми показателями на системном уровне установлены 41 достоверная связь, при этом динамика уровня МДА в плазме крови связана с изменениями 9 показателей иммунного статуса, а концентрация IFNα коррелирует с изменениями 6 показателей оксидантного статусов.

Заключение. Функции иммунокомпетентных клеток осуществляются на фоне метаболических процессов и их сдвигов, вызываемых действием на организм различных агентов. В норме интенсивность биохимических процессов хорошо сбалансирована и значительного изменения концентрации метаболитов не происходит, тогда как при патологии, в нашем случае, при пиелонефрите имеет место дестабилизация показателей иммунного и оксидантного статусов, что усугубляет клинические проявления и влияет на прогноз заболевания.

ЦИТОКИНЫ В МОЧЕ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ ПИЕЛОНЕФРИТАМИ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

Захарова Н.Б.[1], Лях Р.В.[1], Дружинина Ю.Г.[2], Офицеров В.И.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», Саратов, Россия
[2] АО «Вектор Бест», Новосибирск, Россия

Одной из серьёзных проблем диагностики острого пиелонефрита (ПН) является его стертое и атипичное клиническое течение, приводящее к развитию гнойных форм данного заболевания. При этом воспалительные и деструктивные процессы паренхимы почек возникают задолго до клинической манифестации ПН. Ранее нами было показано, что в качестве диагностических и прогностических показателей при заболеваниях почек могут быть использованы уровни провоспалительных цитокинов, хемокинов и фактора роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF) в моче больных.

Цель. Изучить возможность применения результатов количественного анализа некоторых цитокинов в моче пациентов с острым пиелонефритом для косвенной оценки функционального состояния почек и эффективности проведенной терапии и прогнозирования развития хронической болезни почек.

Материалы и методы. Обследовали 40 пациентов с острым ПН, которых разделили на две группы в зависимости от наличия или отсутствия лабораторных признаков нарушения функции почек. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц. Комплексное обследование больных кроме инструментальных методов включало общеклинический анализ крови и мочи, определение креатинина в сыворотке крови и скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Концентрацию интерлейкинов (IL-8 и IL-18), моноцитарного хемоаттрактанта (MCP-1) и VEGF и моче определяли методом ИФА с помощью соответствующих наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (Россия). Для ИФА использовали первую порцию утренней мочи, собранную в специальные стаканы с крышками, в которые предварительно было внесено 20 мкл раствора ProClin 300 (SUPELCO, США). Уровни вышеперечисленных биомаркеров в моче больных острым ПФ определяли при поступлении в стационар до про-

ТАБЛИЦА. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ (M±m) В ГРУППЕ, ПГ/МЛ (К ТЕЗИСАМ ЗАХАРОВОЙ Н.Б. И ДР.)

Цитокин	Контрольная группа, n = 30	Пациенты с острым ПН. Признаки нарушения функции почек			
		не выявлены, n = 22		обнаружены, n = 18	
		1-я точка	2-я точка	1-я точка	2-я точка
IL-18	38,9±2,8	42,0±2,5	26,8±2,1	95,8±7,8	52,0±4,5
IL-8	9,8±0,3	152,4±2,1	80,5±2,3	144,9±3,8	72,4±4,2
MCP-1	228,8±5,8	1071,3±21,6	663,3±28,7	1242,8±9,5	795,4±7,8
VEGF	32,2±1,7	212,8±5,9	71,5±4,2	372,0±6,4	169,8±5,4

ведения антибактериальной терапии (1-я точка) и через 5-7 дней после начала лечения (2-я точка) при выписке из стационара. Данные в таблице представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (M±m).

Результаты. До начала лечения (1-я точка) концентрация IL-8, VEGF, MCP-1 в моче больных острым ПН была значительно повышена по сравнению с контрольной группой условно здоровых лиц (табл.).

После завершения терапии (2-я точка) отмечено снижение уровней всех 4-х биомаркеров. Однако при этом у пациентов с ПН и лабораторными признаками нарушения функции почек концентрация IL-8, VEGF, MCP-1 и IL-18 в моче осталась выше нормальных значений в 7,4, 5,3, 3,4 и 1,3 раза соответственно. Повышенная продукция MCP-1 играет важную роль в формировании инфильтратов в почечной паренхиме, ремоделированию почечного кровотока и развитию тканевой гипоксии – главного индуктора выработки VEGF. Сохранение повышенных уровней провоспалительных цитокинов IL-8 и IL-18 (продуцируемого эпителиальными клетками дистальных канальцев) после острого ПН способствует развитию хронических форм тубулоинтерстициального воспаления. При анализе по методу Спирмена нами выявлена достоверная корреляция между концентрацией IL-18 в моче и СКФ у больных ПФ с лабораторными признаками нарушения функции почек после завершения лечения (2-я точка). Это, дает возможность использовать результаты анализа IL-18 в моче больных ПФ в данный период времени для оценки степени острого ишемического и/или канальцевого повреждения почек.

Выводы. Мониторинг концентрации хемокинов (MPC-1, IL-8), VEGF и IL-18 в моче является доступным неинвазивным методом исследования, позволяющим оценить выраженность воспалительного процесса, тяжесть поражения почечной паренхимы и вероятность развития хронической болезни почек у пациентов после перенесенного острого пиелонефрита.

ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

Зыблева С.В.[1], Шитикова М.Г.[1], Зыблев С.Л.[2], Свистунова Е.А.[1]

[1] ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь
[2] УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

Хроническая болезнь почек (ХБП) – симптомокомплекс, обусловленный уменьшением числа и функции нефронов почек и характеризующийся нарушением гомеостаза. Программный гемодиализ и другие виды почечно-заместительной терапии, применение лекарственных средств, сопутствующая патология вносят значимый вклад в изменение иммунного статуса у пациентов с ХБП. Кроме того, гемотрансфузионная терапия, проводимая пациентам данной категории, приводит к изосенсибилизации.

Цель. Изучить иммунопатологические изменения у реципиентов почечного трансплантата с терминальной стадией хронической болезни почек.

Материалы и методы. В ходе исследования нами был проведен анализ 119 историй болезней пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (тХБП) (основная группа), которые поступили для трансплантации аллогенной почки в ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», Гомель, Республика Беларусь) в период 2014-2016 гг. В качестве группы сравнения участвовало 60 практически здоровых пациентов. Клиническое исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 года, и одобрено комитетом по этике ГУ «РНПЦРМиЭЧ».

Для определения клеточного субпопуляционного состава использовался проточный цитофлюориметр FacsCanto II (Becton Dickinsonand Company, BD Biosciences, США) с применением моноклональных антител (МКАТ) фирмы Beckman Coulter, Франция и Becton Dickinsonand Company, BD Biosciences, США к CD45 (PerCP-Cy5.5), CD3 (Fitc), $CD56^{+}16$ (PE), CD4(PE-Cy7), CD19 (APC), CD8 (APC-Cy7), HLA-DR(PE), CD8 (APC), CD38 (PerCP), CD45(APC), CD11a (PE), CD18 (Fitc), CD25(PE), CD4(Fitc), CD127 (PC-5), CD3(APC) моно-, двух- и шестипараметрического анализа согласно инструкции производителя с применением многократного поступательного гейтирования.

Определение в сыворотке крови иммуноглобулинов G, M, A, E и C3, C4-компонентов комплемента проводилось иммунотурбодиметрическим методом с помощью автоматического биохимического анализатора «Architect c8000» (Abbott, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили на ПЭВМ-IBM с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 6.1 (StatSoft, GS-35F-5899H). Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами, а количественных признаков – в формате: медиана (интерквартильный размах) – Me [Q25; Q75]. Для сравнения значений использовался метод числовых характеристик (Mann–Whitney U Test) с оценкой распределения переменных. С целью сравнения групп по полу и возрасту проводился анализ таблиц сопряженности с использованием двустороннего точного критерия Фишера (Fisher

exact p (two tailed)). Результаты считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости менее 0,05.

Результаты. По результатам исследования статистически значимых различий по полу между основной группой и группой сравнения не выявлено (Fisher exact p (two tailed), p = 0,601). При сравнении вышеуказанных групп по возрасту значимых различий также выявлено не было (Fisher exact p (two tailed), p = 0,112). Полученные результаты указывают на сопоставимость групп по полу и возрасту, что позволило проводить дальнейший анализ данных.

У пациентов с терминальной стадией хронической болезнью почек, находящихся на почечно-заместительной терапии нами было выявлено снижение основных субпопуляций Т-лимфоцитов ($CD3^+CD4^+$ (p = 0,002, Mann–Whitney U Test) и $CD3^+CD8^+$ (p = 0,011, Mann–Whitney U Test), В-лимфоцитов ($CD19^+$) (p = 0,008, Mann–Whitney U Test), а также повышение субпопуляции TNK-лимфоцитов ($CD3^+CD16^+CD56^+$) (p = 0,012, Mann–Whitney U Test) относительно группы сравнения.

Несмотря на снижение количества В-лимфоцитов, мы выявили увеличение уровня IgM у пациентов с тХБП в 2 раза относительно показателей группы сравнения (p = 0,002, Mann–Whitney U Test). Это подтверждает наличие активации иммунного ответа, даже в период отсутствия клинической манифестации инфекции.

Кроме того, у пациентов данной категории выявлено повышение концентрации компонента комплемента С4 (p = 0,014), что может отражать как активацию системы комплемента в результате проводимых сеансов гемодиализа (Zukowska-Szczechowska E. et al., 1996; Reddingius R.E. et al., 1993; Angeli F.S. et al., 2010), так и указывать на снижение функциональной активности почек.

Таким образом, у пациентов с тХБП, получающих диализ, можно констатировать наличие иммунной дисфункции, которая оказывает влияние как на текущее состояние пациентов и обуславливает как частые инфекционные осложнения, так и является неблагоприятным фоном для последующей трансплантации.

СВЯЗЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ЭРИТРОПОЭТИНУ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ЭРИТРОПОЭЗ-СТИМУЛИРУЮЩИМИ ПРЕПАРАТАМИ ПАЦИЕНТОВ НА ГЕМОДИАЛИЗЕ

Назаров В.Д.[1], Лапин С.В.[1], Добронравов В.А.[1], Смирнов К.А.[1], Майер Д.А.[1], Мужецкая Т.О.[1], Тотолян Арег А.[1, 2]

[1] ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Генно-инженерные биологические препараты (ГИБП) обладают свойством иммуногенностью – способностью вызывать иммунный ответ организма к рекомбинантному протеину. У 10-34% пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) 5 стадии, длительное время находящихся на гемодиализе и получающих препараты рЭПО, имеется та или иная степень резистентности к проводимой терапии.

Цель. Целью представляемого пилотного исследования была оценка содержания циркулирующих антител к препаратам ЭПО и их вероятных ассоциаций с клиническими проявлениями анемии у пациентов на гемодиализе, получающих лечение препаратами рЭПО.

Материалы и методы. На базе научно-исследовательского института нефрологии ПСПбГМУ имени акад. И.П. Павлова нами были отобраны 37 пациентов с ХБП 5 стадии, длительное время находящихся на гемодиализе и получающих различные типы препаратов рЭПО. Были проанализированы клинические и лабораторные данные. Для сравнительного анализа все пациенты были разделены на две группы: группа со сниженным ответом на терапию (СОТ) – 21 пациент; вторая группу – группа с нормальным ответом на терапию (НОТ), 16 пациентов. Иммунологическим контролем послужила группа здоровых доноров, никогда не получавших препараты ЭПО (n = 35). Концентрация антител была измерена с помощью методики дот-блоттинга

Результаты. Порог нормы и уровень разведения сывороток был определен путем измерения концентрации антител в серии пошаговых разведений (от 1:10 до 1:200) в сыворотках крови 35 доноров. Референтное значение ОП составило 20,27 мкг/мл (95 CI% ±0,43). Из 37 пациентов с ХБП, получавших препараты рЭПО, у 20 (54,05%) концентрация антител к рЭПО была выше установленных нормальных значений. Обнаружена статистически значимая обратная корреляция между концентрацией анти-рЭПО и средними уровнями гемоглобина и эритроцитов за 12 месяцев (r = -0,368, p = 0,025 и r = -0,336, p = 0,042 соответственно). У пациентов группы СОТ концентрация антител к рЭПО и средние дозы рЭПО, применявшиеся в течение 1 года, были достоверно выше по сравнению с группой НОТ (p = 0,0019). Причем обе группы были сопоставимы по полу, возрасту, концентрации ферритина и С-реактивного белка.

Заключение. Полученные данные указывают на значительную частоту выявления анти-рЭПО и их ассоциацию со снижением терапевтической эффективности препаратов рЭПО.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (Соглашение № 16-15-00118).

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СИСТЕМНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С ТЕРМИНАЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Соломатина Л.В., Журавлева Ю.А.

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия
Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

В настоящее время одним из основных звеньев патогенеза терминальной почечной недостаточности (ТПН) считается хроническое системное воспаление (ХрСВ), развитие которого обусловлено действием факторов системного повреждения, превыщающем компенсаторные возможности антивоспалительных систем на уровне

ТАБЛИЦА. ЗНАЧЕНИЯ ЧАСТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВР (M±σ) У ПАЦИЕНТОВ С ТПН И В ГРУППЕ КОНТРОЛЯ (К ТЕЗИСАМ СОЛОМАТИНОЙ Л.В. И ДР.)

	IL-6, пг/мл	IL-8, пг/мл	IL-10, пг/мл	TNFα, пг/мл	CRP, мг/дл
Контроль	2,0±0,5	5,6±1,6	4,9±0,0	4,3±1,0	0,25±0,23
Хронический гломерулонефрит	8,5±14,6*	249±475*	5,5±2,4	110±139*	0,75±0,67*
Хронический пиелонефрит	5,9±4,3*	160±209*	5,4±1,9	73±83*	1,02±1,62*
Сахарный диабет	12,7±8,7*	298±276*	4,9±0,0	117±102*	0,94±0,91*

Примечание. * - наличие достоверных отличий от группы контроля.

целого организма. При ТПН в качестве потенциальных триггеров ХрСВ выступают: факторы, участвующие на додиализной стадии (особенности исходных заболеваний, накопление в крови продуктов почечной экскреции, нарушения водно-электролитного обмена и др.), а также систематический контакт крови с инородной поверхностью в результате процедуры гемодиализа. Основным феноменом ХрСВ является системная воспалительная реакция (СВР), проявляющаяся в гиперпродукции цитокинов и острофазных белков.

Цель. Оценить выраженность отдельных показателей СВР у пациентов с ТПН в зависимости от исходных нозологий и диализного стажа.

Материалы и методы. Обследовано 42 пациента с ТПН. Причинами развития ТПН явились: хронический гломерулонефрит (n = 22), хронический пиелонефрит (n = 12), сахарный диабет (n = 8). Продолжительность диализного стажа (M±m) составила 63,0±9,6 мес. Исследуемые группы были сопоставимы по диализному стажу. Контрольную группу составили 50 здоровых доноров крови. Методом иммунохемилюминесценции (Immulite) в плазме крови определяли уровни интерлейкинов (IL)-6,8,10, фактора некроза опухоли α (TNFα), С-реактивного белка (CRP). Статистическая обработка данных (расчет основных статистических характеристик, корреляционный анализ Спирмена, множественное межгрупповое сравнение Дункана) проводилась в пакете Statistica 10.

Результаты. Уровни воспалительных медиаторов (кроме IL-10) достоверно превышали контрольные значения во всех группах больных (таблица). Уровень в плазме крови противовоспалительного цитокина IL-10 в большинстве случаев носил «следовой» характер – ниже разрешающей способности прибора (≤ 5 пг/мл). В то же время различия между уровнями исследуемых показателей при разных нозологиях были недостоверны. Таким образом, экспрессия маркеров СВР существенным образом не зависит от исходного заболевания. Корреляционный анализ показал наличие достоверных корреляций разной силы между исследуемыми показателями СВР, однако ни один из них не коррелировал со стажем гемодиализа, что свидетельствует об отсутствии существенного влияния процедуры гемодиализа на выраженность СВР.

Заключение. Проявления системной воспалительной реакции у пациентов на гемодиализе существенным образом не зависят от нозологической основы терминальной почечной недостаточности, а также диализного стажа.

ИММУННЫЕ И ОКСИДАНТНЫЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ОСТРОМ СЕРОЗНОМ И ГНОЙНОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ

Холименко И.М., Конопля А.И., Маврин М.Ю., Братчиков О.И., Шатохин М.Н., Мальцев В.Н.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Известно, что иммунные и оксидантные нарушения лежат в основе патогенеза большого количества болезней, в том числе урологических, поэтому от состояния врожденного и адаптивного иммунитета, оксидантного статуса зависит исход инфекционно-воспалительного процесса при остром пиелонефрите, который может закончиться выздоровлением, переходом в хроническую форму или развитием гнойных осложнений.

Цель и задачи. Изучить состояние показателей иммунного и оксидантного статуса при остром серозном и гнойном пиелонефрите (ОСП, ОГП).

Материалы и методы. Под постоянным наблюдением находилось 62 пациента (56 женщин и 6 мужчин в возрасте 41,5±3,9 лет) с диагнозом острый пиелонефрит, проходившие стационарное лечение в период 2015-2016 гг. в урологическом отделении ОБУЗ ГБ СМП г. Курска и урологическом центре НУЗ «Научный клинический центр ОАО «РЖД», г. Москва. Больные ОСП, получали консервативную терапию: антибактериальную и инфузионно-дезинтоксикационную терапию. Пациентам с ОГП выполнялось оперативное пособие на пораженной почке с целью ее дренирования, включающее в себя чрескожную нефростомию (66% больных) или открытую нефростомию (34% больных) с иссечением гнойных элементов. После дренирования пациенты получали стандартную антибактериальную терапию. Группа контроля включала 15 здоровых доноров-добровольцев того же возраста. Иммунные нарушения оценивали по показателям в циркулирующей крови функционально-метаболической активности нейтрофилов, уровню в плазме крови цитокинов, компонентов комплемента и ингибиторов, IgM, G, A, ЦИК. Состояние оксидантного статуса оценивали по уровню в крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и факторов антиоксидантной защиты.

Результаты. До начала лечения у пациентов с ОСП в плазме периферической крови установлено повышение концентрации провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-1α, IL-6, IL-8), IFNα и разнонаправленное изменение противовоспалительных (повышение IL-10 и снижение IL-1ra). У больных ОГП также выявлено повышение провоспалительных, IL-2, IFNα, но снижение противовоспалительных цитокинов. У пациентов с ОСП перед началом лечения в плазме крови выявлено разнонаправлен-

ное изменение содержания компонентов комплемента (снижение C3a и повышение C5a), снижение ингибитора системы комплемента фактора H и ЦИК, повышение всех исследованных классов Ig. У больных ОГП выявлены аналогичные по направленности изменения показателей системы комплемента и Ig, за исключением повышенной концентрации фактора H. При поступлении в клинику пациентов с ОСП выявлено снижение активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов периферической крови (снижение ФИ, ФЧ и ИАФ). Одновременно с этим оказалась повышенной активность кислород-зависимых систем полиморфно-ядерных лейкоцитов, т. к. тесты НСТ-сп., НСТ-ст. и ФРН оказались выше значений здоровых доноров, при одновременном снижении ИСН. У больных ОГП также оказались сниженными показатели активности и интенсивности фагоцитоза. Активность кислород-зависимых систем нейтрофилов значительно отличалась от контроля: НСТ-сп. и НСТ-ст. оказались выше, а ФРН и ИСН ниже. При исследовании оксидантных показателей у пациентов с ОСП до начала лечения установлена активация ПОЛ (повышение в плазме крови уровня малонового диальдегида и ацилгидроперекисей), снижение общей антиокислительной активности сыворотки крови, повышение активности каталазы. У больных ОГП изменение оксидантных показателей оказалось однонаправленным с ОСП, за исключением повышенной активности супероксиддисмутазы (СОД). При анализе иммунометаболических показателей пациентов с ОСП и ОГП до начала лечения установлено статистически достоверная разность 22 из 28 показателей (78,6%) в абсолютном отношении, и, что, наиболее значимо, 4 показателя оказались разными по направленности изменений (IL-10, фактор H, ФРН и СОД).

Заключение. При ОСП и ОГП имеется ряд отличий в направленности и выраженности изменений показателей иммунного и оксидантного статуса, что можно использовать для дифференциальной диагностики формы острого пиелонефрита. Результаты также обосновывают необходимость использования в комплексном лечении иммуномодулирующих препаратов не только гнойного, но и серозного пиелонефрита.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У МУЖЧИН С ХЛАМИДИЙНЫМ УРЕТРИТОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

Чепурнова Н.С.[1], Маркелова Е.В.[1], Тулупова М.С.[2], Жданова О.Л.[3]

[1] ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия
[3] ФГБУН «Институт автоматики и процессов управления» Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия

Введение. Урогенитальная хламидийная инфекция является одной из самых частых бактериальных инфекций, передающихся половым путем. Показано, что у 75% женщин и 24 % мужчин хламидийная инфекция протекает бессимптомно (Исаков В.А., 2012). Применение иммуномодуляторов – важный фактор повышения эффективности этиотропной терапии и предупреждения персистенции возбудителя, которая может проводиться до антибиотикотерапии или параллельно ей в зависимости от исходного состояния иммунной системы (Рищук С.В., 2013). Кроме того, назначение патогенетической терапии должно быть направлено не только на коррекцию имеющихся иммунологических нарушений различной степени выраженности, но и купирование воспалительных процессов, рассасывание фиброзных изменений и улучшение микроциркуляции.

Цель. Оценка цитокинового профиля в сыворотке венозной крови и отделяемом из уретры мужчин с хроническим бактериальным уретритом до и после лечения.

Материалы и методы. Проведено исследование уровней цитокинов и медиаторов, влияющих на межклеточный матрикс в сыворотке венозной крови и отделяемом из уретры (TNFα, TNFβ, IL-1β, IL-2, IL-2sR, IL-17, IFNγ, IFNα, IL-10 и IL-13, IL-22, TGF-β_1) у 24 мужчин с хроническим уретритом (хламидиоз), контрольную группу составили 30 практически здоровых мужчин-добровольцев) с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США) методом сэндвич-варианта ИФА на иммуноферментном анализаторе Multiscan (Финляндия), количество выражали в пг/мл и нг/мл. Иммуномодулирующая терапия проводилась препаратами рекомбинантных интерферона-γ и IL-2 на фоне традиционной антибактериальной терапии. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ SPSS №16. Данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Me, $Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$). Внутри и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Объем выполненных исследований позволял оценить результаты с достоверностью 95-99% при использовании соответствующих статистических методов.

Результаты. До лечения у мужчин с хламидийным уретритом в сыворотке венозной крови уровни TNFα (в 8 раз), IL-1β (в 3,5 раза), IL-2sR (в 3,5 раза), IL-10 (в 3 раза), IL-13 (в 2 раза) превышали контрольные значения ($p < 0,001$). Показатели TNFβ (в 2 раза) были ниже показателей контроля ($p < 0,001$). Уровни IL-2, IL-17, IFNγ и IFNα не изменялись. В отделяемом из уретры до лечения обнаружены аналогичные изменения уровней провоспалительных цитокинов, однако в противовоспалительном звене выявлено снижение уровней IL-10 (в 4 раза, $p < 0,001$) и IL-13 ($p < 0,05$), а также повышение IL-22 (3,5 раза, $p < 0,01$) и TGF-β_1 ($p < 0,05$) в сравнении с показателями контрольной группы. После применения стандартной антибактериальной терапии в моновариантe (Доксициклин) только у 25% мужчин показатели контрольных значений. После применения стандартной антибактериальной терапии в сочетании с рекомбинантным интерлейкином-2 (Ронколейкин) у 80% пациентов значения цитокинов соответствовали показателям контрольной группы. После применения рекомбинантного интерферона-γ (Ингарон) исследованные цитокины у 95% пациентов не отличались от контрольных величин.

Заключение. В настоящее время лечение как осложненных, так и не осложненных форм хронических уретритов хламидийной этиологии должно основываться на комплексной подходе с использованием не только стандратных схем антибактериальной терапии, но и иммуномодулирующих препаратов, которые смогут препятствовать хронизации воспалительного процесса и образованию персиситирующих форм хламидий. В настоящем исследовании наиболее высокий иммуномодулирующий эффект наблюдался в группе с рекомбинантным интерлейкином-2 в сравнении с группой мужчин с рекомбинантынм интерфероном-γ.

ИММУНОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛОР-ОРГАНОВ

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЛЮНЕ ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛЛИТОМ

Бойко Н.В., Ким А.С., Стагниева И.В., Быкова В.В.

ФГБОУ «Ростовский государственный медицинский университет» Миинистерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Хронический тонзиллит остается актуальной проблемой современной оториноларингологии. Это обусловлено широкой распространенностью данного заболевания среди взрослого и детского населения (Белов В.А., Воропаева Я.В., 2012).

Согласно современной классификации выделяют две формы хронического тонзиллита: компенсированную и декомпенсированную. Такое разделение дает четкие рамки выбора тактики лечения хронического тонзиллита. Однако большинство способов диагностики хронического тонзиллита субъективно, так как нет ни одного симптома, который мог бы считаться патогномоничным. Увеличение числа безангинных форм хронического тонзиллита затрудняет постановку диагноза (Мальцева Г.В., 2009) и, как правило, этот диагноз остается неустановленным.

В последние годы появились исследования, отражающие поиск новых маркеров воспаления в глотке, в число которых входят цитокины (Дроздова М.В. и соавт., 2009; Терскова Н.В. и соавт., 2009; Смирнов И.Е. и соавт., 2009).

Цель. Изучение цитокинового профиля в слюне у детей с хроническим тонзиллитом.

Материалы и методы. Мы исследовали содержание TNFα, IL-1β и IL-6 в слюне у 20 детей до и после тонзиллэктомии в возрасте от 7 до 14 лет, перенесших плановую тонзиллэктомию. Диагноз хронического тонзиллита установлен клинически и подтвержден гистопатологическим исследованием удаленных миндалин. Контрольную группу составили 20 практически здоровых детей. У всех детей производили забор слюны, без стимуляции, до и после операции. Уровень цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа количественного определения цитокинов в слюне с помощью наборов для иммуноферментного анализа фирмы ЗАО «Вектор Бест» (Россия). Результаты исследования обрабатывали с использованием пакета стандартных программ для статистического анализа STATISTICA 12.0. Для сравнения данных использовали непараметрические методы статистической обработки данных. Различия признавали достоверными при значениях $p \leq 0,05$.

Результаты. После проведения теста Shapiro-Wilk's по всем показателям и в обеих группах подтверждена гипотеза об имеющихся отличиях распределения показателей от нормального с доверительной вероятностью $p \leq 0,05$, ввиду чего для сравнения результатов использовали непараметрические методы статистической обработки.

Оценка достоверности различий показателей TNFα, IL-1β и IL-6 в слюне у детей контрольной группы и с диагнозом хронический тонзиллит показала, что при сравнении исходных значений TNFα и IL-1β у детей в слюне 1-ой и 2-ой групп между собой (по критерию Манна–Уитни) не имелось достоверных отличий ($p > 0,05$); при исследовании показателей исходных значений по критерию Манна–Уитни в слюне у детей с диагнозом хронический тонзиллит уровень IL-6 (0,0002) достоверно выше, чем у детей контрольной группы ($p \leq 0,05$).

Динамика цитокинов после лечения такова: при анализе динамики уровней TNFα и IL-1β по критерию Wilcoxon достоверных изменений не выявлено ($p > 0,05$); анализ динамики уровня IL-6 по критерию Wilcoxon выявил его достоверное увеличение вплоть до третьих суток ($p = 0,001, 0,007, 0,02$) после операции.

Обсуждение. Исходное содержание IL-6 в слюне у детей с хроническим тонзиллитом было выше в 3 раза по сравнению с контрольной группой. За период лечения на 1, 2, 3-и сутки отмечено достоверное увеличение уровня IL-6, что объясняется реакцией организма на посттравматическое воспаление. Остальные исследуемые медиаторы не имели значимых отличий от контрольной группы. Эти изменения позволяют предполагать участие IL-6 в патогенезе развития хронического тонзиллита и использовать его в качестве дополнительного диагностического теста при установлении диагноза.

Выводы. 1. Содержание IL-6 в слюне у детей с диагнозом хронический тонзиллит достоверно повышено по сравнению с контрольной группой.

2. За период лечения на 1,2,3-и сутки отмечено достоверное увеличение уровня IL-6. При изучении уровней цитокина IL-1β и TNFα достоверных изменений не наблюдалось.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРОГО КАТАРАЛЬНОГО И ГНОЙНОГО РИНОСИНУСИТА ПО ЦИТОКИНОВОМУ БАЛАНСУ

Гукасян Е.Л., Стагниева И.В., Бойко Н.В., Бачурина А.С., Сулина Н.Ю.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Миинистерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Согласно EPOS 2012 различают вирусные, поствирусные и бактериальные риносинуситы. По данным последнего рекомендательного документа ICAR RS 2016 различают только острый вирусный и бактериальный риносинусит. В настоящее время практически не суще-

ствует быстрых и точных методов, позволяющих проводить дифференциальную диагностику острого риносинусита. Диагноз бактериального риносинусита может быть подтвержден только с помощью бактериологического исследования содержимого околоносовых пазух. Это исследование является инвазивным и длительным, и в ряде случаев при вирусном риносинусите такая манипуляция не показана, а главное не исключает вирусной природы заболевания. Дифференцировать вирусный и бактериальный риносинусит приходится по клиническим признакам заболевания. Учитывая, что основным маркером противовирусного Th1-опосредованного иммунного ответа является IFNγ, а IL-6 является фактором дифференцировки В-клеток, в связи с чем его относят к цитокинам бактериального воспаления, прогностически значихся соотношение цитокинов IL-6/IFNγ. Высокие значения уровня IL-6 свидетельствуют о Th2-опосредованной иммунной реакции. Высокие значения уровня IFNγ свидетельствуют о Th1-опосредованной иммунной реакции. Абсолютные значения уровней этих цитокинов не позволяют произвести дифференциальную диагностику, и только величина соотношения уровня IL-6 к IFNγ отражает направленность иммунной реакции и позволяет осуществить дифференциальную диагностику острого риносинусита.

Цель. Разработка эффективного способа дифференциальной диагностики острого риносинусита.

Материалы и методы. Обследовано 120 больных с подтвержденным диагнозом острого риносинусита. Всем больным было выполнено полное клинико-лабораторное обследование, Уровень цитокинов IL-6, INFγ определяли методом иммуноферментного анализа наборами реактивов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Контрольную группу составили 30 здоровых людей. Больные были распределены на дхве группы: 1 группа – пациенты с вирусным риносинуситом (43 пациента); 2 группа – с бактериальным риносинуситом (77 пациентов).

Результаты. У пациентов 1-й группы с вирусным риносинуситом уровень IL-6 в сыворотке крови составил в среднем 15,85±1,05 пг/мл, уровень IFNγ – 54,21±2,18 пг/мл. Соотношение IL-6/IFNγ принимало значение 1,4 и менее. У пациентов 2-й группы с бактериальным риносинуситом уровень IL-6 в сыворотке крови составил в среднем 82,54±3,04 пг/мл, уровень IFNγ – 19,36±1,89 пг/мл. Соотношение IL-6/IFNγ принимало значение 1,5 и более.

Согласно заявленному способу нами в 1-м оториноларингологическом отделении ГБ № 1 г. Ростова-на-Дону была произведена дифференциальная диагностика острого риносинусита у 50 больных. У этих больных до начала лечения определяли в сыворотке крови значение уровней цитокинов IL-6 и IFNγ, после чего вычисляли соотношение IL-6/IFNγ. У 23 (46%) больных значение этого соотношения составляло от 1,4 и менее, поэтому всем им был диагностирован острый вирусный риносинусит. Все 23 больных получили лечение острого вирусного риносинусита, без использования антибактериальных препаратов, результаты которого подтвердили достоверность поставленного диагноза. У 24 больных (54%) значение соотношения IL-6/IFNγ составляло 1,5 и более, им был диагностирован острый бактериальный риносинусит. Все 27 больных получили лечение с использованием антибактериальных препаратов, результаты которого подтвердили достоверность поставленного диагноза.

Выводы. 1. Определение соотношения IL-6/IFNγ у больных риносинуситом может являться дополнительным диагностическим критерием дифференциальной диагностики катарального и гнойного воспалительного процесса в околоносовых пазухах.

2. При значении соотношения IL-6/IFNγ 1,4 и менее диагностируют вирусный риносинусит, при значении 1,5 и более диагностируют бактериальный риносинусит.

3. Значение соотношения IL-6/IFNγ более 1,5 при остром риносинусите может быть дополнительным показанием к назначению антибактериальной терапии.

ОЦЕНКА УРОВНЯ IL-6 У ДЕТЕЙ ДО И ПОСЛЕ АДЕНОТОМИИ

Ким А.С., Бойко Н.В., Колмакова Т.С., Стагниева И.В.

ФГБОУ «Ростовский государственный медицинский университет» Миинистерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Аденотомия – наиболее часто встречающееся хирургическое вмешательство в детской оториноларингологии. Абсолютными показаниями к оперативному вмешательству при аденотомии являются синдром обструктивного апноэ сна, патология среднего уха, снижение слуха.

Цель. Оценка уровня провоспалительного цитокина IL-6 в слюне у детей до и после аденотомии.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе оториноларингологического отделения для детей ГБ№1 им. Н.А. Семашко г. Ростова-на-Дону. В исследовании приняли участие 37 детей в возрасте от 3 до 14 лет, перенесших плановую аденотомию.

Все анализируемые случаи были разделены на 2 группы и контрольную группу. Первую группу составили пациенты с диагнозом аденоиды – 17 человек, вторую группу -пациенты с диагнозом аденоидит – 12 человек. Контрольную группу представили условно здоровые дети в возрасте от 3 до 14 лет – 10 человек.

У всех детей производили забор слюны утром, без стимуляции, накануне операции и после оперативного вмешательства, в которой исследовали IL-6. Каждому больному было произведено по 2 анализа. В полученном материале определяли уровень IL-6 с помощью наборов для иммуноферментного анализа фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) методом твердофазного иммуноферментного анализа количественного определения цитокинов в слюне. Результаты исследования обрабатывали с использованием пакета стандартных компьютерных программ для статистического анализа Statistica 7.0.

Результаты. Исходный уровень IL-6 у детей с аденоидами и аденоидитами достоверно превышал значения контрольной группы по критерию Уилкоксона для зависимых выборок ($p \leq 0.05$).

Достоверность различий средних величин независимых выборок (то есть между группами) оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. При оценке достоверности различий содержания IL-6 в слюне у детей между 1 и 2 группами до и после аденотомии, были использованы следующие показатели: Rank Sum 1 группа, Rank Sum 2 группы, критерий Манна–Уитни (U), p-level. В первой группе до операции Rank Sum 1 группы = 369,5000, после операции Rank Sum 1 группы = 250,0000; во второй группе до операции Rank Sum 2 группы = 333,5000, после операции Rank Sum 2 груп-

пы = 311,0000; общие критерии для обеих групп до операции U = 123,5000, p-level = 0,156443, после операции U = 130,0000, p-level = 0,856544. Это означает отсутствие статистически значимого различия средних между 1-ой и 2-ой группами.

При проведении сравнения средних выборочных исследуемых группах применяли однофакторный дисперсионный анализ с использованием критерия Крускела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test) при отличии распределения от нормального с последующей оценкой попарных сравнений между группами. При оценке достоверности различий уровня IL-6 в слюне у детей между 1, 2 и контрольной группами до аденотомии, использовались следующие показатели: Median Test, Overall Median (среднее значение) = 12,9000; Chi-Square (хи-квадрат) = 10,91321, df (число степеней свободы) = 2, p (вероятность ошибки) = 0,0043, Kruskal–Wallis test: H (2, N = 45) = 16,19812 p = 0,0003, сумма рангов 1 группы = 499,5000, сумма рангов 2 группы = 480,5000, сумма рангов контрольной группы = 55,0000.

Так как достигаемый уровень значимости был меньше критического $p \le 0,05$, то принимаем альтернативную гипотезу о наличии статистически значимого различия средних между 1-ой, 2-ой и контрольной группами. Между выборками 1-ой, 2-ой и контрольной групп существуют неслучайные различия по уровню IL-6.

Выводы. 1. Статистически значимого различия между показателями IL-6 в слюне у детей 1-ой и 2-ой групп не обнаружено.

2. Между выборками 1-ой, 2-ой и контрольной групп существуют неслучайные различия по уровню IL-6.

НЕЙРОИММУННОЕ ВОСПАЛЕНИЕ В ПАТОГЕНЕЗЕ РИНОСИНУСИТА

Стагниева И.В.[1], Симбирцев А.С.[2], Бойко Н.В.[1]

[1] ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Миинистерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия
[2] ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Для передачи сигналов между нервной и иммунной системой используются универсальные медиаторы. Риносинусит может быть причиной и соматического (воспалительного), и нейрогенного механизма боли.

Цель. Определение роли нейроиммунного воспаления в патогенезе риносинусита.

Материалы и методы. Обследовано 337 больных с риносинуситом с различной выраженностью лицевой боли. Контрольная группа – 32 здоровых человека. 1 группу составили 42 больных без острого воспалительного процесса в слизистой оболочке носа и околоносовых пазух. 2 группу – 133 больных с катаральным риносинуситом, 3 группу – 162 больных с гнойным риносинуситом. Всем больным проведено полное клиническое ЛОР-обследование, оценка болевого симптома и уровня невротизации с помощью «Многомерного вербально-цветового болевого теста». Уровень цитокинов IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, IFNγ определяли методом ИФА наборами реактивов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Уровень SP в сыворотке крови пациентов определяли мето¬дом ИФА наборами Peninsula Laboratories, LLC (Bachem Group (USA), Cat. № S-1153). Кластеры больных с различными патогенетическими механизмами лицевой боли были выделены по результатам проведения кластерного и дискриминантного анализа с формированием соответствующих дискриминантных моделей.

Результаты. У больных с выраженным болевым симптомом средний показатель болевого теста 59,16±0,35%, что достоверно показывает наличие боли и её связь с патологическим процессом. Корреляционный анализ количественных показателей боли с активностью воспалительного процесса (по клиническим данным и уровню С-реактивного белка) показал отсутствие прямой связи: r = - 0,0691; p = 0,121. Обнаружена прямая статистически значимая корреляционная связь между ранжированными показателями вегетативной дистонии и данными шкалы невротизации (r = 0,3901; p < 0,001). Нарушение носового дыхания – один из критериев оценки качества жизни пациентов с риносинуситом, способствует более тяжелому эмоциональному переживанию боли, приводит к вегетативной дистонии по типу симпатикотонии, запускает каскад стрессорных медиаторов и этим усугубляет нейрогенный компонент воспаления. Уровень SP варьировал от 628,3 до 5754,8 пг/мл, что более чем в 10 раз выше, чем в контрольной группе. Обнаружена прямая корреляционная связь между суммарным показателем боли и уровнем SP в сыворотке крови больного (r = 0,6825; p < 0,001). Диагностической точкой разделения уровня SP в сыворотке крови, превышение которой ассоциируется с нейрогенным компонентом боли, была величина 1998,7 пг/мл Для показателя SP площадь под ROC – кривой (AUC) была набольшей – 0,932±0,0196 (z statistic 21,9 при p < 0,0001). При отсутствии острого воспалительного процесса в слизистой оболочке у пациентов 1 группы с болевым симптомом повышены концентрации IL-1β и IL-4. Выраженный болевой симптом с высоким уровнем SP свидетельствует о включении нейрогенных механизмов. У больных 2 и 3 групп при высоком SP показатели иммунограммы свидетельствуют о цитотоксическом варианте иммунного ответа на фоне дефицита гуморального звена и фагоцитоза. У этих больных отмечены высокие концентрации провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8 и TNFα. Концентрация противовоспалительных цитокинов резко снижена. Это привело к смещению баланса активности Th1-/Th2-лимфоцитов в сторону Th1, недостаточности гуморального ответа и пролонгировании болевого симптома. Течение заболевания отягощено механизмами нейроиммунного воспаления, которое, безусловно, является причиной утяжеления клинической картины заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы.

Выводы. 1. Нейроиммунная регуляция воспалительного процесса при риносинусите определяет тяжесть течения и клинические симптомы заболевания. 2. Выраженный болевой симптом при риносинусите в сочетании с высоким уровнем SP в сыворотке крови более 1998 пг/мл свидетельствует о нейроиммунном воспалении, которое проявляется резким смещением цитокинового баланса в сторону провоспалительных цитокинов, баланса активности Th1-/Th2-лимфоцитов в сторону Th1 и иммунной недостаточностью. 3. Для диагностики и выбора тактики лечения лицевой боли можно проводить определение уровня субстанции Р в сыворотке крови пациента. Его значение менее 1998 пг/мл свидетельствует о нормальной нейроиммунной регуляции, а заболевание носа и околоносовых пазух требует стандартной общепринятой терапии воспалительных заболеван ий верхних дыхательных

путей. При повышении уровня субстанции Р свыше 1998 пг/мл, необходимо в схему лечения включать препараты, купирующие нейроиммунное воспаление.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ Toll-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 2 И 4 В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ СРЕДНЕГО УХА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Тырнова Е.В.[1], Алешина Г.М.[2], Янов Ю.К.[1], Кокряков В.Н.[2]

[1] ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Эпителиальные клетки наружных покровов в качестве клеток системы врожденного иммунитета выполняют три основные функции: барьерную, секреторную и сигнальную (Underwood M. et al., 2011). Для выполнения последней эпителиальные клетки верхних дыхательных путей, включая слуховую трубу и среднее ухо, снабжены множеством паттерн-распознающих рецепторов (Mittal R. et al., 2014), лигандами которых являются патоген-ассоциированные молекулярные паттерны. Одной из древнейших систем распознавания патогенов считают Toll-подобные рецепторы (TLR). Из 10 известных к настоящему времени членов семейства на поверхности клеток локализованы TLR4 и TLR2 (Кокряков В.Н., 2006).

Целью настоящей работы является оценка экспрессии генов Toll-подобных рецепторов 2 и 4 на основе определения мРНК в поверхностном эпителии слизистой оболочки среднего уха при хронических воспалительных заболеваниях.

Материалом для исследования служили образцы слизистой оболочки ЛОР-органов, полученные во время хирургического вмешательства в условиях общей анестезии. Образцы тканей немедленно помещали в стабилизирующий раствор RNAlater. Исследованы образцы слизистой оболочки барабанной полости (при хроническом тубо-тимпанальном среднем отите, центральная перфорация; при тимпаносклерозе; при хроническом гнойном эпиантральном среднем отите, холестеатоме; при отосклерозе), слизистой оболочки мастоидальной полости, в качестве контроля служили нижние и средние носовые раковины – всего 92 образца.

Молекулярно-генетические методы включали выделение общей РНК из поверхностного эпителия; синтез комплементарной кДНК с использованием обратной транскриптазы M-MLV; амплификацию методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Уровень экспрессии мРНК стандартизировали относительно гена бета-актина в качестве внутреннего контроля.

В контрольной ткани нижних носовых раковин больных с искривлением перегородки носа и здоровой ткани слизистой оболочки среднего носового хода, полученной попутно в ходе операций, экспрессия мРНК TLR4 не выявлена. Экспрессия гена TLR4 детектирована в единичных образцах слизистой оболочки среднего уха: 7,69% случаев в барабанной полости при хроническом тубо-тимпанальном среднем отите, 7,69% при холестеатоме, 21,43% в мастоидальной полости.

Экспрессия гена TLR2 детектирована во всех исследованных образцах поверхностного эпителия. Самая высокая экспрессия мРНК TLR2 выявлена в слизистой оболочке суперструктур стремени (тест Манна–Уитни, $p < 0,02$) по сравнению с контролем. В среднем ухе выявлены различия между отосклерозом и хроническим средним отитом: экспрессия гена TLR2 в эпителии суперструктур стремени повышена по сравнению с тимпаносклерозом и слизистой мастоидальной полости ($p < 0,05$, $p < 0,01$ соответственно).

Отсутствие экспрессии гена TLR4 в слизистой оболочке суперструктур стремени обусловлено, по-видимому, отсутствием или незначительным количеством патоген-ассоциированных молекулярных паттернов при сохранении физиологической стерильности барабанной полости у больных отосклерозом. При хроническом среднем отите отсутствие детектируемой экспрессии мРНК TLR4 может быть связано как с первичным дефектом экспрессии гена, проявившимся на этапе острого среднего отита и предрасполагающим к хронизации заболевания, так и развитием толерантности рецептора. Вероятно, нарушение автономности местного иммунитета и стерильности среды среднего уха при хроническом среднем отите способствуют перепрограммированию экспрессии рецептора TLR4, чтобы избежать воспаления в ответ на микроорганизмы нормальной микробиоты.

Усиленная экспрессия гена TLR2 в слизистой оболочке суперструктур стремени, по-видимому, обусловлена присутствием патоген-ассоциированных молекулярных паттернов эндогенного происхождения и способствует сохранению физиологической стерильности барабанной полости у больных отосклерозом. Повсеместная экспрессия мРНК TLR2 в постоянно колонизированной слизистой оболочке носа в норме и среднего уха в условиях ремиссии хронического воспалительного заболевания выполняет, скорее всего, толерогенную, а не реактивную в отношении микроорганизмов функцию. По-видимому, экспрессия гена TLR2 эпителиальными клетками носа и среднего уха не является фактором, приводящим к хроническому и неконтролируемому воспалению слизистой оболочки или поддерживающим персистирующее воспаление.

ВЛИЯНИЕ ВАКЦИНАЦИИ «ПРЕВЕНАР-13» НА КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ ОЧАГОВОЙ ЛОР-ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

Фошина Е.П., Костинов М.П., Афиногенова В.П.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Цель. Оценить клиническую эффективность вакцинации против пневмококковой инфекции препаратом «Превенар 13» у детей с хроническими и рецидивирующими инфекциями ЛОР-органов.

Материалы и методы. Клиническую эффективность вакцинации оценивали с помощью следующих критериев – число эпизодов острой респираторных инфекций (ОРИ), средняя продолжительность эпизода ОРИ, число эпизодов рецидивов/обострений ЛОР-патологии, число дней системной антибиотикотерапии. Сравнивали данные за год до вакцинации и в течение года после.

Результаты. Под наблюдением находилась группа из 46 детей в возрасте от 3 до 8 лет. Диагностировали рецидивирующий риносинусит (РС) у 20 детей, средний секреторный отит (ССО) – 16 детей, хр. тонзиллофарингит – 18 детей. Вакцинацию проводили согласно обще-

принятым правилам. Постпрививочных реакций не было зарегистрировано ни у одного ребенка. Анализ заболеваемости показал высокую клиническую эффективность вакцинации. Было выявлено снижение общей заболеваемости по ОРИ с 8,2±2,5 до 5,3±1,4 эпизодов с одновременным снижением средней продолжительности эпизода с 14,4±3,6 до 8,1±2,3 дней. Если до вакцинации у детей практически каждая ОРИ сопровождалась рецидивом очаговой патологии – 6,8±2,1 случаев, то в результате вакцинации ситуация значительно улучшилась до 2,7±0,8 обострений за наблюдаемый период. Отмечено, что самая высокая эффективность «Превенар 13» была у детей с ССО – только у пяти детей с отитом в анамнезе были одно-двухкратные рецидивы. Естественно, применение системных антибактериальных препаратов также значительно уменьшилось. Так до вакцинации среднее число дней антибиотикотерапии составляло 26,8±7,9, а отдельных случаях достигало более 40 дней в году, то после этот показатель достоверно снизился до 5,7±4,6. Более того: у 34 детей (74%) не было необходимости в назначении системных антибиотиках. Т.е., если и возникал рецидив ЛОР-заболевания, то не носил гнойного характера. Т.о. вакцинация детей с рецидивирующими и хроническими заболеваниями ЛОР-органов современным противопневмококковым препаратом «Превенар 13» в данном исследовании показала высокую клиническую и фармакоэкономическую эффективность.

ИММУНОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ЗРЕНИЯ

КОРРЕКЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ПОДГОТОВКЕ У СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ БОЛЬНЫХ С СИСТЕМНЫМИ ВАСКУЛИТАМИ

Андриевских И.А.[1], Абрамовских О.С.[2], Омельянюк М.Ю.[2]

[1] ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии», Челябинск, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия

Введение. Известно, что стандартная иммуносупрессивная терапия глюкокортикоидными гормонами (ГКГ) и/или цитостатиками (ЦС) в лечении больных с системными васкулитами имеет ряд серьезных осложнений. Наиболее сложная ситуация складывается у пациентов, нуждающихся в оперативном лечении. Применение ГКГ и ЦС сопровождается частым развитием репаративных и коагулопатических осложнений после хирургических вмешательств на фоне иммунного сосудистого воспаления. Поиск новых решений в этом направлении позволит более эффективно осуществлять профилактику послеоперационных осложнений у данной категории больных.

Цель. Изучить особенности иммунного статуса и обосновать персонифицированную иммунокоррекцию у хирургических больных сердечно-сосудистого профиля с системными васкулитами для профилактики ранних послеоперационных осложнений.

Материалы и методы. Для реализации поставленной цели на клинических базах кафедры госпитальной хирургии (Челябинская областная клиническая больница и Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии г. Челябинск) с 2005 по 2015 годы проведено исследование иммунного статуса у 158 пациентов с системными васкулитами, готовящихся к реконструктивным вмешательствам в различных артериальных бассейнах (ветви дуги аорты, коронарные артерии, аорто-подвздошная зона, бедренно-подколенный сегмент) и клапанах сердца. Все эти больные были разделены на две группы. В 1-ой группе у 76 пациентов (группа сравнения) была проведена предоперационная подготовка, включающая применение ГКГ и ЦС по различным схемам. Во 2-ой группе (основная группа) у 82 больных в дополнении к традиционной предоперационной подготовке был проведен комплекс мероприятий, включающий персонифицированную иммунокоррекцию с учетом изменений в иммунном статусе каждого пациента. Для этого были применены различные комбинации следующих мероприятий и средств: коррекция образа жизни, синтетические лекарственные средства (глутоксим, имунофан, полиоксидоний, вобэнзим), дискретный плазмаферез, внутривенный нормальный человеческий иммуноглобулин.

Результаты. Анализ иммунологических показателей периферической крови после проведения соответствующей предоперационной подготовки показал, что в группе сравнения при системной иммуносупрессивной терапии снижался уровень Т-хелперов лимфоцитов и сохранялись низкие показатели активности фагоцитоза нейтрофилов крови. В основной группе, наоборот, восстанавливались до уровня условно здоровых лиц показатели фагоцитарной функции нейтрофилов, количество NK-лимфоцитов и Т-хелперов. В обеих группах больных после иммунокоррекции отмечалось существенное снижение фактора гистосовместимости, уменьшение уровней IgG, E, нормализация уровня IgM и ЦИК, уровни СОЭ и СРБ снижались до показателей условно здоровых лиц. Установленные изменения периферической крови имели клиническое отражение в виде уменьшения в 2,7 раза развития послеоперационных тромбо-геморрагических и гнойно-септических осложнений в основной группе пациентов, в отличие от больных с традиционной предоперационной подготовкой.

Обсуждение. Сердечно-сосудистые вмешательства у больных с системными васкулитами на фоне иммунного сосудистого воспаления представляют опасность развития послеоперационных осложнений. Предложенный метод персонифицированной иммунокоррекции позволяет более эффективно подготовить больных к оперативным вмешательствам и существенно уменьшить количество послеоперационных осложнений.

Выводы. Результаты исследования определяют целесообразность исследования иммунологических показателей периферической крови у сердечно-сосудистых больных с системными васкулитами, готовящихся к реконструктивным вмешательствам. С учетом полученных результатов иммунологического обследования рекомендуется использовать предложенный метод персонифицированной иммунокоррекции для более эффективной профилактики тромбо-геморрагических и гнойно-септических осложнений у этой категории больных.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ ЖИДКОСТИ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕТЧАТКИ ПРИ НЕОВАСКУЛЯРНОЙ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

Кузнецов А.А.[1, 2], Тур Е.В.[1], Быстров А.М.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия
[2] ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск, Россия

Введение. Неоваскуляризация и отек сетчатки являются причиной прогрессирующего снижения зрения при

неоваскулярной форме возрастной макулярной дегенерации (ВМД). Ранее было показано, что неоангиогенез при данном типе патологии глаза связан с повышением концентрации фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), а также других биологически активных веществ во внутриглазной жидкости, жидкости стекловидного тела и сетчатки.

Цель и задачи. Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи уровней биологически активных веществ (БАВ) (цитокинов, факторов роста, хемокинов) во внутриглазной жидкости и морфометрических параметров состояния сетчатки у лиц с неоваскулярной формой ВМД. Задачами исследования являлись оценка иммунологического профиля внутриглазной жидкости у лиц с ВМД методом мультиплексного анализа и оценка состояния макулярной области сетчатки по данным оптической когерентной томографии (ОКТ) у лиц с данной патологией с последующим сопоставлением полученных данных.

Материалы и методы. В исследование было включено 23 пациента (5 мужчин, 18 женщин) в возрасте от 63 до 87 лет (средний возраст составил 73,61±1,66 года) с неоваскулярной ВМД, которым было проведено хирургическое вмешательство: оперативное лечение возрастной катаракты и интравитреальное введение ранибизумаба («Луцентис», Novartis Pharma, Швейцария).

Всем пациентам было проведено стандартное офтальмологическое обследование, включая ОКТ макулярной области с определением толщины нейроэпителия сетчатки, высоты и протяженности отслойки нейроэпителия и пигментного эпителия сетчатки, высоты и протяженности хронической неоваскулярной мембраны, наличие фиброза.

Сбор образцов жидкости передней камеры глаза осуществляли с помощью аспирации жидкости передней камеры одного глаза стерильным одноразовым инсулиновым шприцом через парацентез роговицы в ходе проведения стандартного оперативного вмешательства по поводу экстракции катаракты до введения в переднюю камеру глаза каких-либо веществ. Полученные образцы объеме около 0,1-0,2 мл и помещали в стерильные маркированные пробирки типа Эппендорф 0,5 мл. Сразу после сбора образцы замораживали и хранили при температуре -70 °С до проведения анализа. Все образцы были собраны примерно в одно и то же время суток (с 10-00 до 14-00). Анализ внутриглазной жидкости проводили на приборе Luminex Magpix (США) с помощью набора реактивов для мультиплексного анализа Bio-Rad (США). Определяли концентрацию BasicFGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNFα, VEGF (всего 27 БАВ).

Полученные данные обрабатывали методами описательной статистики и выражали в виде средней и ее стандартной ошибки (M±m). О наличии взаимосвязи судили по непараметрическому коэффициенту корреляции Спирмена. Об уровне значимости судили при значении $P < 0,05$.

Результаты. Исследование показало наличие положительной достоверной корреляционной взаимосвязи между концентрацией моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1) во внутриглазной жидкости и увеличением толщины нейроэпителия макулярной области, свидетельствующим о наличии диффузного отека сетчатки при ВМД ($R = 0,49$, $p < 0,05$). Статистически значимых взаимосвязей между концентрацией других оцениваемых БАВ во внутриглазной жидкости и морфометрическими параметрами макулярной области при неоваскулярной ВМД получено не было ($R = -0,45 ... 0,29$, $p > 0,05$).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что моноцитарный хемотаксический протеин-1, хемокин, ответственный за моноцитарную и макрофагальную инфильтрацию тканей, играет важную роль в развитии и прогрессировании отека при возрастной макулярной дегенерации. Ранее была показана аналогичная взаимосвязь с тяжестью диабетического макулярного отека.

ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛЬНОЙ И СИСТЕМНОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ У ДЕТЕЙ С ЭНДОГЕННЫМИ УВЕИТАМИ

Петровская М.С., Балацкая Н.В., Денисова Е.В., Катаргина Л.А.

ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Эндогенные увеиты (ЭУ) – обширная группа воспалительных заболеваний сосудистой оболочки глаза различной этиологии часто с хроническим или рецидивирующим течением. Особенностью ЭУ у детей является раннее и быстрое развитие осложнений, нередко приводящих к потере зрительных функций. Роль иммунной системы, в частности, вклада цитокинов в развитие собственно увеитов убедительно доказана. Однако в плане понимания патогенеза осложнений ЭУ многие вопросы остаются недостаточно изученными. Известно, что глаз обладает «иммунной привилегией», реализуемой как за счет локальных (на уровне глаза, в т.ч. активных и пассивных факторов передней камеры, регламентирующих ответ на антигены), так и системных (на уровне тимуса, селезенки) иммунных механизмов.

Цель и задачи. Исследование содержания цитокинов в сыворотке крови (СК) и влаге передней камеры (ВПК) при постувеальных осложнениях у детей; анализ системной продукции цитокинов в сравнении с группой здоровых.

Материалы и методы. Обследовано 19 детей с ЭУ в возрасте от 3,5 до 13 лет, которым проводилось хирургическое лечение постувеальных катаракт. В 63,1% случаев (12 детей) увеит был ассоциирован с ювенильным идиопатическим артритом, у 1 ребенка (5,25%) – туберкулезной этиологии, у 1 (5,25%) HLA-B27 ассоциированный, в 26,4% случаев (5 детей) этиологию увеита установить не удалось. Ремиссия воспалительного процесса на фоне местной и системной терапии отмечена в 7 (36,8%) случаях, минимальная активность увеита – в 10 (52,7%), вялотекущий процесс – в 1 (5,25%), активный – в 1 (5,25%). 14 здоровых детей (в возрасте от 4 до 16 лет) составили контрольную группу. Материалом иммунологического исследования служили образцы ВПК больного глаза ($n = 19$), полученные во время операции, СК детей с ЭУ ($n = 19$) и здоровых доноров ($n = 14$). В тест – пробах в мультиплексном анализе определяли содержание: интерлейкинов (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18), факторов некроза опухоли (TNFα, β), ин-

терферонов (IFNα, γ), факторов роста VEGF-A, TGF-β1. Исследование проводили на проточном цитофлуорометре (BD FACS Canto II Becton Dickinson (США)) в программе BD FACS Diva наборами CBA (Th1/Th2 Cytokines Multiplex Kit, BD Biosciences (США)), данные обрабатывали – в программе FCAP Array, Soft Flow (США). Статистический анализ результатов выполняли в программе BIOSTATD-1998 (t-критерий Стьюдента, критерий Фишера); показатель статистической значимости: $p < 0,05$.

Результаты. Анализ иммунологических данных группы детей с ЭУ показал наличие всего спектра изучаемых цитокинов СК: в 100% выявлены IL-8, IL-18, VEGF – A, TGF-β1; в 63% – IL6; почти в половине случаев обнаружены IL-1β,2, IFNα; в 42% – IL-12, в трети случаев – IL-5; шесть цитокинов – IL-4, IL-10, IL-17, IFNγ, TNFα, β выявлялись реже – в 10-29%. Все эти иммуномедиаторы обеспечивают регуляцию иммунного ответа (направление, силу), воспаления, клеточного хемотаксиса, репарации. В отличие от группы больных, в СК здоровых доноров выявлены 11 из 16 цитокинов: во всех тест-пробах обнаруживались IL-18, VEGF-A, TGF-β1; в 83% выявлен IL-8; в 43% случаев определялись IL-17 и TNFα, почти в трети случаев – IL-12, значительно реже, в 7-21% проб, обнаруживались IL-1β, IL-2, IL-5, TNFβ. Ни в одной пробе СК контрольной группы не были выявлены IL-4, IL-6, IL-10, IFNα, IFNγ.

Характерным для группы больных стала высокая частота выявляемости по сравнению с контрольной группой цитокинов, отвечающих за инициацию – IL-1β, направление иммунного ответа – IL-2, IL-10, IL-12, IFNγ, TNFβ, регулирующих воспаление, хемотаксис и пролиферацию – IL-6, IL-8, IFNα.

Концентрация всех обнаруженных цитокинов оказалась существенно выше у детей с ЭУ, со статистически значимым подтверждением для IL-6, TNFα, TNFβ, TGF-β1, а также IFNα и γ ($p < 0,05$).

Во ВПК детей с ЭУ выявлены 13 из 16 исследуемых цитокинов: IL-6, IL-8, IL-18; ростовые факторы VEGFA, TGF-β1 – в 84-89% случаев, в половине тест-проб обнаружен IL-1β, у трети – IL-2, реже выявлялись IL-10, TNFα, IFNα, IFNγ, IL-12 (21 – 26%); полностью отсутствовали IL-4, 17A и TNFβ. При сопоставлении содержания цитокинов СК и ВПК в группе у детей с ЭУ обнаружено, что концентрация большинства иммуномедиаторов во ВПК была ниже, исключение составил IL-6 – цитокин с плейотропной активностью, локальный уровень которого существенно превышал таковой в крови.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о патогенетической роли повышения системной продукции комплекса цитокинов различного биологического действия: IL-1, IL-2, отвечающих за инициацию, направление иммунного ответа; TGF-β1, IFNα, регулирующих пролиферативную активность; провоспалительных IL-8, IL-18 и, особенно, IL-6 в развитии осложнений при ЭУ. Значительное усиление системной продукции IFNα, IL-6, а также локальной – IL-6 позволяет предположить гиперактивацию системы врожденного иммунитета. Полученные данные могут быть использованы для практического применения – разработки систем мониторинга и показаний к проведению антицитокиновой терапии.

ИНФОРМАТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

Слепова О.С., Ковалева Л.А., Вахова Е.С., Кричевская Г.И., Сорожкина Е.С., Гамзаев М.Г.

ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Туберкулез глаз занимает 4-е место (7,8%) в структуре внелегочного туберкулеза, отличается полиморфизмом симптомов, локализацией воспаления как в переднем, так и заднем отрезке глаза, что значительно затрудняет его клиническую диагностику (Устинова Е.И., Бакаев В.М., 2008).

Цель. Изучить эффективность современных иммунологических тестов: квантиферонового теста (КТ) и сывороточных IgG-противотуберкулезных антител (ПТА) в диагностике туберкулезных заболеваний глаз.

Материалы и методы. Обследовано 117 пациентов (21-77 лет) с клиническими диагнозами: кератит с изъязвлением роговицы и без – 72, кератоувеит – 8, увеиты (передний, задний, панувеит) – 35 человек. Проводили полное офтальмологическое обследование, при необходимости назначали консультации смежных специалистов. Иммунологические тесты включали КТ (QuantiFERON®-TB Gold In-Tube, Cellestis Inc., Carnegi, Australia), определение ПТА в сыворотке (ИФА, Вектор-Бест, РФ). Сыворотки крови также исследовали на наличие IgM-, IgG-антител к разным антигенам ВПГ, ЦМВ, ВЭБ, IgG-антител к токсоплазме гондии и токсокаре канис для оценки инфицированности пациентов этими офтальмотропными инфекциями и определения их активности.

Результаты. По данным клинико-лабораторного обследования герпесвирусную этиологию заболевания установили у 51,9%, вторичную бактериальную офтальмоинфекцию – у 37,3% пациентов, у 10,8% этиология воспалительного процесса осталась неясной. В целом положительный КТ тест отмечен у 24,8% больных, частота положительных результатов колебалась от 23,4% при кератитах с изъязвлением центральной локализации до 41,7% – при кератоувеитах ($p > 0,05$). 12 пациентам с положительным КТ проведено углубленное обследование у фтизиатров, туберкулез глаз был подтвержден у 4-х, у 8 человек активная туберкулезная инфекция была исключена. Однако четверо из них ранее перенесли активную форму легочного туберкулеза, положительный КТ по-видимому свидетельствовал о наличии латентной туберкулезной инфекции и позволял отнести этих больных к группе риска. ПТА обнаружены у 12 из 26 обследованных, у 2 из 6 больных с подтвержденным офтальмотуберкулезом и 10 из 20 пациентов с заболеваниями глаз нетуберкулезной этиологии ($p > 0,05$). Уровень ПТА у 2-х пациентов с туберкулезом глаз был очень низкий (несущественно превышал контрольные показатели). Более высокий уровень ПТА отмечен у пациентов с заболеваниями глаз нетуберкулезной этиологии, что ставит вопрос об их возможной протективной роли. В основном туберкулезная этиология у обследованных пациентов устанавливалась на основании клинической симптоматики, инструментального обследования легких и других органов, положительного диаскинтеста и результатов диагностической тест-терапии.

Заключение. КТ эффективен для диагностики латентной туберкулезной инфекции, что важно для формирования групп риска и выявления отягчающих патогенетических факторов при заболеваниях глаз. Однако как прямой тест для диагностики офтальмотуберкулеза КТ недостаточно информативен. В отличие от туберкулеза легких ПТА в сыворотке крови больных с туберкулезом глаза обнаружены реже (хотя и несущественно) и средний уровень их был ниже, чем при нетуберкулезных заболеваниях.

СКРИНИНГ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ПОРАЖЕНИЕМ ГЛАЗ ПРИ БОЛЕЗНИ БЕХЧЕТА

Сорожкина Е.С.[1], Балацкая Н.В.[1], Давыдова Г.А.[1], Лисицына Т.А.[2]

[1]ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[2]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Введение. Болезнь Бехчета (ББ) – хронический рецидивирующий полисистемный васкулит, поражение глаз при котором часто приводит к полной потере зрительных функций и инвалидизации пациентов. Этиология заболевания остается неясной. Помимо возможных выделяемых этиологических факторов ББ (генетической предрасположенности, факторов окружающей среды, вирусных и бактериальных инфекций), ключевая роль отводится иммунопатологическим нарушениям, в частности патологической гиперактивации врожденного и адаптивного звеньев иммунитета. Известно, что в рамках иммунной системы координация между неспецифическими защитными реакциями и специфическим иммунитетом осуществляют цитокины, действуя в обоих направлениях. Регуляторная роль этих иммуномедиаторов активно изучается при ББ, однако, в аспекте глазных поражений (характера течения, тяжести, активности) многие вопросы остаются нерешенными.

Цель и задачи. Определить содержание цитокинов различного биологического действия в сыворотке крови (СК) у пациентов с увеитами при болезни Бехчета (БУ) и провести сравнительный анализ с группой здоровых доноров.

Материалы и методы. Обследовано 13 пациентов БУ (в возрасте от 25 до 45 лет). В 3-х случаях (23%) отмечен активный процесс; у 77% (10 больных) – минимальная активность увеита, из них у 1 больного с ББ глазных поражений не выявлено.

34 здоровых добровольца без глазной патологии, совместимых по полу и возрасту, составили контрольную группу. Материалом иммунологического исследования служили образцы СК пациентов с БУ (n = 13) и группы здоровых доноров (n = 34). В тест-пробах в мультиплексном анализе определяли содержание: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-18, IFNγ, TNFα, GM-CSF, GROα, SDF1α, Eotaxin, RANTES, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β при помощи тест-системы Procarta Plex™ "Human Th1/Th2 & Chemokine 1 Panel 20 plex" (eBioscience, Австрия) на анализаторе MAGPIX (Luminex Corp., США) в программе xPONENT 4.1. с последующей обработкой в пакете Procarta Plex Analyst 1.0. Определение трансформирующих факторов роста TGF-β1, TGF-β2 проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа тест-системами Human TGF-β1, TGF-β2 Platinum ELISA (eBioscience, Австрия). Статистический анализ выполняли с использованием программного комплекса StatPlus, при параметрическом распределении в сравнении величин использован метод Стьюдента, критерий значимости – $p < 0,05$.

Результаты. В СК пациентов с БУ определялись практически все исследуемые иммуномедиаторы, исключение составил IL5. Большинство из них обнаружены в 100% тест-проб: интерлейкины IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18; факторы роста TGF-β1, TGF-β2, IFNγ, TNFα, хемокины: Eotaxin, IP-10, MCP1, SDF1α, RANTES; в 92% случаев определялся IL-13. Более чем в половине проб (от 61 до 77 %) выявлялись MIP-1α, MIP-1β, GROα, GM-CSF, IL-2; несколько реже (примерно в трети случаев) обнаруживался IL4.

Анализ СК группы здоровых добровольцев показал наличие практически всех цитокинов за исключением IL-8. Во всех случаях определены 6 цитокинов: трансформирующие факторы роста TGF-β1, TGF-β2; хемокины Eotaxin, IP10, MCP1, RANTES; в подавляющем большинстве проб (98%) – MIP-1α,β и SDF1α; немногим реже, в 79-88%, выявлялись TNFα, IFNγ; более чем в половине проб – IL-12, IL-2, IL-18 (56-65%); в 38-47% случаев обнаруживались GM-CSF, IL-13; в 9-18% – GROα, IL-1β, IL-4. В минимальном количестве проб (3%) определялись IL-5 и IL-6.

Характерной особенностью для группы БУ больных стала высокая частота встречаемости цитокинов, отвечающих за инициацию (IL-1β) и направление иммунного ответа (IL-12, IFNγ, TNFα), а также медиаторов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку костномозговых предшественников (GM-CSF) и хемотаксис (GRO-α, IL6, IL-8, IL-18). Анализ содержания цитокинов в СК групп БУ и здоровых доноров показал значительное повышение уровней IL-18, GROα, IP-10 в группе с БУ, при существенном снижении концентрации RANTES и Eotaxin ($p < 0,05$). Как отмечалось выше, только у одного из обследованных больных с ББ глазных осложнений не было обнаружено, в этом случае уровень системной продукции Eotaxin, GROα, IP-10 находился в пределах нормы.

Заключение. Таким образом, несмотря на ограниченное число наблюдений, высокая частота выявляемости иммуномедиаторов, отвечающих за инициацию и направление иммунного ответа, цитокинов, регулирующих хемотаксис, значительное существенное разнонаправленное изменение их системной продукции в группе пациентов с БУ позволяет предположить гиперактивацию регуляторного звена цитокинов, контролирующего воспалительный ответ, и особенно факторов, регламентирующих миграцию лейкоцитов в очаг воспаления.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЛАУКОМЫ

Хохлова А.С., Емельянова Н.П., Петров А.А., Купчина Е.А.

ГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, Россия

Введение. Число больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) на земном шаре – 105 млн, из них слепых на оба глаза – 9,1 млн. При выявлении глаукомы в ранней стадии возможно на долгие годы приостановить нарушение зрительных функций. Группами риска, по развитию глаукомы, по данным множества исследователей, являются близорукость, гипертония, сахарный диабет.

Цель. Теоретическое обоснование разработки тест-системы раннего выявления глаукомы. Задачей послужил подбор тех факторов гуморального иммунитета, которые достоверно свидетельствуют о высоком риске развития глаукомы. Продукт планируется создать в виде стерильной тест-полоски с нанесенными реактивами, реагирующими с компонентами слезной жидкости.

Материалы и методы. Локальный уровень цитокинов (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TNFβ, IL-1, IL-2, IL-3, TNFα, TNFβ, IFNα, IFNβ) и металлопротеиназ 1, 2, 8, 9 типов исследовали в слезе у 70 пациентов первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) I-III стадий. Количество пациентов с I стадией составило 35 человек (50%), со II стадией 22 человека (31%) и с III стадией – 18 человек (19%). Контрольная группа – 20 человек соответствующего возраста без офтальмологических заболеваний. Использовали метод ИФА. Статистическую обработку проводили непараметрическими методами.

Результаты. Нами выявлена статистическая значимость повышения уровня интерлейкина-17 (IL-17) и металлопротеиназы-9 (ММП-9). При проведении ROC-анализа у пациентов в группах риска (с сахарным диабетом, миопия) чувствительность и специфичность метода оказались максимальными (100%), при уровне ММП-9 выше 52,5 нг/мл, а IL-17 выше 1,5 нг/мл.

Заключение. Для ранней диагностики первичной открытоугольной глаукомы рекомендованы следующие критерии: 1) уровень ММП-9 в слезной жидкости выше 52,5 нг/мл; 2) уровнь интерлейкина-17 (IL-17) в слезной жидкости выше 1,5 пг/мл. Эти данные будут использованы при создании тест-системы для ранней диагностики глаукомы.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В ХИРУРГИИ

ОЦЕНКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРЕД- И ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ У БОЛЬНЫХ С ПОРАЖЕНИЕМ КОЛЕННОГО СУСТАВА

Белова С.В., Мамонова И.А., Гладкова Е.В., Бабушкина И.В.

Научно-исследовательский институт травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВП «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, Саратов, Россия

Введение. Заболевание суставов является достаточно часто встречающейся патологией опорно-двигательного аппарата, приводящее к тяжелым последствия. Одним из основных механизмов возникновения и развития дегенеративно-дистрофических процессов в суставных тканях являются нарушения в иммунной системе. Результатом деструкции хрящевой ткани является накопление фрагментов коллагена и протеогликанов в синовии сустава, обладающих антигенными свойствами, что индуцирует выработку аутоантител.

Цель. Оценка иммунологических изменений в пред- и послеоперационном периоде у больных с поражением коленного сустава.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 22 пациента с посттравматическим остеоартрозом III стадии коленных суставов. Средний возраст пациентов составил 58,1±1,8 лет. Группу контроля составили 20 условно здоровых лиц без патологии опорно-двигательного аппарата (12 мужчин и 8 женщин).

Иммунологические исследования проводились в пред- и послеоперационном периоде (3-6 сутки). Дифференцировку лейкоцитов по субпопуляциям (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) осуществляли на гематологическом анализаторе MEK 8222 K (Nihon Konden, Япония). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом лазерной проточной цитофлюориметрии на цитометре BD FACSCantoII (BD, США). Идентификация лимфоцитов и определение их субпопуляционного состава осуществлялась с помощью набора реагентов для прямой иммунофлюоресценции BD Multitest 6-Color TBNK Reagent (BD, США). Распознавание зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), В-лимфоцитов ($CD3^-CD19^+$), естественных киллеров NK-клеток ($CD3^-CD16^+CD56^+$) проводили с помощью моноклинальных антител, меченых фикоэритрином (PE), флуоресцинизотиоцианатом (FITC), перидинин-хлорофилл протеином (Per-CP), алофикоцианином (APC). Статистическая обработка данных была проведена с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 6.0.

Результаты. Проведенное исследование выявило иммунологические изменения у пациентов с посттравматическим остеоартрозом коленных суставов в пред- и послеоперационном периоде после эндопротезирования коленных суставов.

Изменения, касающиеся иммунной системы, заключались в нарушении Т-клеточного звена иммунитета, что проявлялось дисбалансом иммунорегуляторных субпопуляций в виде снижения содержания Т-супрессоров при повышении количества Т-хелперов. При этом имелось увеличение количества NK-клеток, вероятно, связанное с накоплением продуктов деградации хрящевой ткани. В послеоперационном периоде после эндопротезирования изменения показателей иммунологического исследования, показали адекватную реакцию организма на оперативную травму, усугублявшую тяжесть иммунодефицитного состояния, связанного с основным заболеванием.

Заключение. Результаты проведенного иммунологического исследования могут быть полезны в подготовке больных к предстоящему оперативному вмешательству с целью коррекции имеющегося иммунодефицита, а так же для устранения последствий хирургической травмы, вызывающей вторичное иммунодефицитное состояние, с помощью иммуно-корректоров в послеоперационном периоде.

ЧАСТОТА ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ ПРИ ФУРУНКУЛЕЗЕ

Белохвостикова Т.С., Коршунова Е.Ю.

ФГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» – филиал РМАНПО, Иркутск, Россия

Лечение хронических рецидивирующих гнойных инфекций мягких тканей в любых возрастных группах до настоящего времени остается сложной проблемой в связи с увеличением затяжных и вялотекущих форм заболеваний. В структуре возбудителей фурункулеза в последние годы значительных изменений не происходит. В то же время появление новых данных о процессах эвазии патогенов возможно внесет ясность в причины нарушения санационной воспалительной реакции врожденного иммунитета при фурункулезе. В большинстве исследований среди причин хронизации процесса указываются нарушения иммунитета, связанные с неблагоприятными средовыми факторами. В связи с этим анализ причин возникновения фурункулеза и изменений иммунитета в процессе заболевания является актуальной проблемой.

Целью настоящего исследования явился ретроспективный анализ 43 пациенток в возрасте от 18 до 55 лет с установленным диагнозом фурункулеза, обратившихся за консультацией иммунолога. Из них обратились самостоятельно 8, в остальных случаях были направлены врачами вбольшинстве случаев хирургического профиля. Правилом исключения из группы явилось наличие гликемии и установленного диагноза сахарного диабета. Число предшествующих хирургических вмешательств колебалось от 3 до 18. Всем больным выполнялся общий анализ крови, исследование уровня сывороточного железа, ферритина, иммунограмма с исследованием популяций и субпопуляций лимфоцитов, показателей фагоцитоза, иммуноглобулинов IgG, A, M, уровень IgE, по возможности выполнялся бактериологический посев. После изучения анамнеза в некоторых случаях проводились дополнительные исследования для выявления коморбидной патологии. Среди причин рецидивов рассматривались нарушения хирургических принципов лечения, фоновые заболевания, свойства возбудителя гнойного процесса, наличие сопутствующих вирусных инфекций, изменения гематологических и иммунологических показателей.

В результате комплексного исследования здоровья женщин, коморбидные заболевания отмечены в 74,5% случаев, из них чаще отмечались хронические заболевания ЛОР-органов и желудочно-кишечного тракта, вирусные инфекции. В иммунограмме обнаружены изменения фагоцитоза в 95,3%, причем чаще снижение показателя, параллельное с увеличением внутриклеточной спонтанной кислородпродуцирующей метаболической активности фагоцитов. В клеточном иммунитете показатели популяций Т-и В-лимфоцитов менялись в 9,3%, низкий уровень IgA в повышение IgE отмечено в одинаковом числе случаев – 6,9%. В 1 случае нарушений клинико-лабораторных показателей иммунитета не обнаружено, отмечен отказ пациентки от хирургической санации, самолечение. Показатели феррокинетики отличались от нормальных суммарно в 51,1% случаев. Бактериологическое исследование проведено у 18 женщин, число посевов с повышенным титром возбудителя отмечено у 12 пациенток, в двух случаях с признаками резистентности к антибактериальным препаратам.

Таким образом, возникновение рецидивов фурункулеза связано с множеством причин. Их них немаловажное значение имеют дефекты хирургической санации очага инфекции, обусловленные самолечением. Часто причины рецидивов связаны с нарушениями фагоцитарной способности нейтрофилов. В этой связи среди причин рецидивов необходимо рассматривать полноценность предшествующей антибактериальной терапии, как известно, замещающей эти функции. Вопрос повторных курсов антибиотикотерапии в случае выявления таких дефектов должен быть обязательно рассмотрен. В половине случаев фурункулез сочетался с анемическим синдромом, обусловленным как перераспределительным, так и истинным дефицитом железа, что диктует необходимость комплексного подхода к диагностике и лечению, дифференцированного назначения препаратов железа. Выявленные нарушения в системе иммунитета потребовали проведения иммунокоррекции лишь у 18 пациенток. В течение года после проведения комплексного лечения с рецидивами обратилась 1 пациентка.

Следовательно, выявление иммуногематологических и метаболических нарушений позволяет выявлять причины и предупреждать рецидивы фурункулеза, рефрактерные к стандартному комплексу лечения, сократить число осложнений, улучшить прогноз заболевания.

ИССЛЕДОВАНИЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 У ПАЦИЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ОРТОДОНТИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ

Головин И.Ю.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, Россия

Введение. На сегодняшний день одним из наиболее распространенных и приоритетных методов лечения, применяемый в ортодонтии, является лечение с помощью брекет-системы. Одним из видов осложнений при использовании брекет-систем является опасность поражения пародонта. Однако патофизиологические механизмы влияния воспалительного процесса в тканях пародонта на результаты ортодонтического лечения с применением брекет-систем изучены не достаточно.

Экспрессия ММП-2 происходит по конститутивному пути, что способствует активации трансформирующего фактора роста β, высвобождая его из матрикса, а также способности влиять на проницаемость сосудистой стенки и ангиогенез, ингибируя его при формировании раневого процесса.

Цель и задачи. Определить уровень содержания металлопротеиназы-2 в слюне у пациентов, находящихся на ортодонтичском лечении несъёмными ортодонтическими аппаратами (брекет-система)

Материалы и методы. Объектом исследования были 28 пациентов стоматологической клиники ООО «Ортодонтикс групп». В I группу вошли 14 пациентов с осложнением в виде хронического катарального гингивита. В II группу вошли 14 пациентов без инфекционно-воспалительных осложнений. В группу контроля вошли 5 клинически здоровых добровольца. Определение ММП-2 в слюне проводили методом твёрдофазного ИФА с применением реактивов R&D Diagnostics Inc. (США) Статистическая обработка материала проводилась методами параметрической описательной статистики с использованием t критерия Стьюдента с помощью компьютерной программы «Biostat». Статистически достоверным считали различия при значимости $p < 0,05$.

Результаты. В общей группе пациентов уровень ММП-2 в слюне, статистически не отличался по сравнению с группой контроля (0,170,03 нг/мл и 0,150,04 нг/мл, $p>0,05$).

У пациентов II группы зарегистрированы более высокие значения ММП-2 в слюне, в сравнении с пациентами с инфекционно-воспалительным осложнением в виде хронического катарального гингивита (0,200,03 нг/мл и 0,120,03 нг/мл, $p < 0,05$).

Заключение. Зарегистрировано высокое значение матриксной металлопротеиназы-2 в слюне у пациентов, находящихся на ортодонтичеком лечении с помощью брекет-системы, без инфекционно-воспалительных осложнений, что может быть связано с активацией трансформирующего фактора роста β. Для подтверждения или опровержения необходимы дальнейшие исследования.

ЗАВИСИМОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ СЕПСИСОМ ОТ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Долгушин И.И., Савочкина А.Ю., Абрамовских О.С., Четвернина Е.А., Торопова Л.Р.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия

Введение. Сепсис был и продолжает оставаться наиболее частой причиной летальных исходов в отделениях реанимации и интенсивной терапии, несмотря на использование современных антибактериальных препаратов и технологий современной терапии. Известно, что в большинстве случаев сепсис, вызванный антибиотикорезистентными штаммами бактерий, характеризуется тяжелым прогрессирующим течением и отсутствием тенденции к спонтанному выздоровлению. Именно поэтому для эффективного лечения сепсиса необходим поиск и создание новых антибиотиков для борьбы с устойчивыми к противомикробным препаратам бактериями.

Цель и задачи. Сравнить показатели функциональной активности нейтрофилов у больных сепсисом в зависимости от возбудителя и его антибиотикорезистентности.

Материалы и методы. Были исследованы образцы крови 30 пациентов (13 женщин, 17 мужчин, в возрасте 28-82 лет) больных сепсисом. Больные были разделены на две группы: возбудителями сепсиса в первой группе (группа I) были антибиотикорезистентные микроорганизмы, во второй группе (группа II) – микроорганизмы чувствительные к антибиотикам. Диагностика клинического материала осуществлялась при помощи автоматизированной системы BacT/ALERT3D60 (BioMerieux, Франция). Для посева крови использовались стандартные коммерческие флаконы с готовой питательной средой. Идентификация выделенных микроорганизмов проводилась с помощью рутинных микробиологических методов и анализатора VITEK® 2 Compact (BioMerieux, Франция). Определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам проводилось с помощью анализатора VITEK® 2 Compact. В периферической крови проводили подсчет лейкоцитарной формулы, оценивали функциональную активность нейтрофилов: фагоцитарную активность нейтрофилов, лизосомальную активность, оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, подсчет нейтрофильных внеклеточных ловушек. Все полученные данные были подвергнуты статистической обработке.

Результаты. Анализ результатов микробиологического исследования крови пациентов с сепсисом показал, что большинство идентифицированных микроорганизмов являются полирезистентными к антибактериальным препаратам. В свою очередь проведенное исследование у пациентов из групп I и II позволило установить достоверное увеличение общего количества лейкоцитов в группе I. Показатели поглотительной активности нейтрофилов (активность фагоцитоза) в группе I достоверно выше соответствующих показателей больных с сепсисом в группе II. Результаты индуцированного и спонтанного НСТ-теста и фагоцитарное число у больных в I группе также повышены. А также наблюдалась тенденция к увеличению нейтрофильных внеклеточных ловушек в I группе.

Заключение. Сепсис характеризуется резистентностью и полирезистентностью возбудителей к антибиотикам, что в свою очередь снижает эффективность антибактериальной терапии. Это может привести к гиперактивации иммунной системы, первой линией защиты которой является клеточный компонент врожденного иммунитета. Таким образом, показатели функциональной активности нейтрофилов у больных с сепсисом, возбудителем которого является антибиотикорезистентный микроорганизм, при сравнении с септическими больными, у которых возбудители устойчивы к антибиотикам, отличаются и характеризуются увеличением. Что говорит о необходимости поиска новых антибактериальных препаратов, чтобы избежать гиперактивации иммунной системы, которая в большинстве случаев приводит к летальному исходу.

РОЛЬ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА В ОБРАЗОВАНИИ РУБЦОВОЙ ТКАНИ

Костоломова Е.Г.[1], Стрелин С.А.[2], Суховей Ю.Г.[1], Унгер И.Г.[1], Акунеева Т.В.[3]

[1] ООО «Тюменский филиал Института клинической иммунологии», Тюмень, Россия
[2] ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1», Тюмень, Россия
[3] ФГБОУ ВО «Тюменский государственный университет», Тюмень, Россия

Раневой процесс – это единство воспаления, регенерации и фиброза. Процессы заживления подчиняются тем же принципам, что и любая соединительная ткань в организме, которые регулируется через клеточно-клеточные и клеточно-матриксные сигналы и процессы пролиферации и апоптоза. Сбой строго последовательных и протекающих зачастую одновременно процессов гистогенеза приводит к формированию патологических рубцов.

Цель. Изучить индекс пролиферации и апоптоза кератиноцитов и фибробластов кожи рубцовой ткани после оперативных вмешательств.

Материалы и методы. В качестве источника исследуемых клеток использовали биоптаты кожи, полученные при операционном вмешательстве (блефаропластика) здоровых взрослых доноров, рубцовая ткань была получена от пациентов при иссечении послеоперационного рубца.

Пролиферативную активность клеток изучали при помощи моноклональных антител Ki-67.

Для оценки процессов программированной клеточной гибели использовали моноклональные антитела к Fas-рецепторами (CD 95/Apo 1) и Bcl-2.

В развитии апоптоза важную играет «дикий» («wild») тип гена – онкосупрессора wt p53 и кодируемый им протеин p53. Используется для определения числа клеток, находящихся в стадии апоптоза.

Результаты и обсуждение. Индекс пролиферации определяли при помощи моноклонального антитела Ki-67 (MIB-1), идентифицирующего ядерный антиген пролиферативных клеток. Индекс пролиферации фибробластов составил 65,14%±0,01 в рубцовой ткани и 27,14%±0,05 в контроле, этот же показатель кератиноцитов кожи был равнен 25,1%±0,01 и 16,22%±0,04 соответственно .

Присутствие на мембране клетки рецептора $CD95^+$, свидетельствует о готовности ее к апоптозу. Экспрессия белка Fas на мембране фибробластов составила 46,22%±0,02 в ткани рубца и 29,0%±0,01 в контроле. Кератиноциты: рубец 37,23%+0,02; контроль 19,5%+0,04 .

Путем изменения транскрипции промитотических генов Bcl-2 поддерживается клеточный рост, что затрудняет вхождение клетки в клеточный цикл. По нашим данным,

ингибитор апоптоза Bcl-2 присутствует в фибробластах: рубцов 46,11±0,03; контроль 11,02±0,02.

Главным фактором запускающим каскад реакций, затрудняющих вхождение клетки в клеточный цикл, является белок p53. Активированный p53 способствует усилению экспрессии белка Bax и угнетает экспрессию Bcl-2. В здоровой коже p53 не выявляется. Получено, что как фибробласты, так и кератиноциты рубцов экспрессируют белок p53 15,41±0,02 и 11,15±0,0 соответственно.

Заключение. 1. В рубцовой ткани наблюдается активная пролиферация фибробластов, апоптоз которых ингибируется Bcl-2. Возможно, такие фибробласты пролиферируют (обнаружены Ki-67$^+$ позитивные клетки) и не вступают в апоптоз, что скорее всего является причиной образования рубца.

2. Несмотря на активно протекающие процессы пролиферации кератиноциты рубцовой ткани активно элиминируются апоптозом, что скорее всего сдерживает гипертрофию эпидермиса.

Для понимания роли процессов апоптоза и пролиферации в образовании рубцовой ткани необходимы дополнительные исследования, результаты которых, возможно, помогут разработать патогенетически обоснованное лечения и профилактики образования рубцов.

АЛЬФА-ГЛОБУЛИНЫ МОЗГА И АНТИТЕЛА К НИМ КАК МАРКЕРЫ РЕПАРАТИВНЫХ И ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПОСЛЕ НЕЙРОТРАВМЫ

Коханов А.В., Мяснянкин А.А., Серебряков А.А.

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

Вызываемые нейротравмой, в том числе и позвоночно-спинномозговой травмой (ПСМТ), пролонгированные нарушения параметров гомеостаза не исчерпываются специфической посттравматической реакцией. Среди механизмов развития непредвиденных осложнений лечения спинальной травмы можно выделить дисбаланс аварийных гуморальных и клеточных реакций, вызывающих как дегенеративно-деструктивные, так и регенеративно-репаративные изменения в структурах спинного мозга. Для их оценки и прогнозирования осложнений ПСМТ актуально исследование специфических иммунохимических маркеров, таких как нейроспецифические белки и антител к ним.

Цель. Определение уровней органоспецифических альфа-глобулинов мозга человека и антител к ним в сыворотках крови больных с ПСМТ в различные периоды после нейротравмы.

Материалы и методы. Для количественного определения альфа1- и альфа2-глобулинов мозга и уровня антител к ним применяли иммуноферментный анализ (ИФА). Антитела к очищенным антигенам мозга и, разработанные на их основе иммуноферментные тест-систем к альфа1- и альфа2-глобулинам мозга, были получены авторами самостоятельно по общепринятым схемам. Верификацию моноспецифических тест-систем проводили с референтными наборами на эти антигены из банка тест-систем кафедры биохимии Астраханского ГМУ. Клинический материал представлен данными 142 пациентов мужского и женского пола в возрасте от 19 до 65 лет с изолированными закрытыми позвоночно-спинномозговыми травмами различной степени тяжести и 30 пациентов в возрасте от 23 до 66 лет, госпитализированных с последствиями и осложнениями ПСМТ. Кровь забирали на 1-3 , 5-7 и 14-19 сутки после поступления больных в стационар и в поздние периоды с интервалами от нескольких месяцев до года при амбулаторно-поликлиническом обследовании.

Результаты. С помощью кроличьих антисывороток к экстрактам дефинитивной ткани головного мозга человека идентифицированы два новых органоспецифических антигена мозга с подвижностью альфа-глобулинов. Комбинацией хроматографических методов получены очищенные препараты термостабильного и кислотостабильного альфа-глобулинов мозга с молекулярными массами 139 и 145 КДа. Сконструированы тест-системы для иммуноферментного анализа (ИФА). Чувствительность разработанных тест-систем для ИФА составила: для α1-ТС–глобулина мозга – 5 нг/мл, для α2-КС-глобулина мозга – 10 нг/мл. Повышенные (по сравнению с донорами) концентрации альфа-глобулинов мозга обнаружены в крови пострадавших через 1-3 дня после ПСМТ ($p < 0,001$ для обоих белков). α1-ТС–глобулин имел пик в крови пациентов на 5-7 сутки после ПСМТ с последующим снижением его уровня. Наоборот, статистически значимый повышенный уровень α2-КС-глобулина продолжал сохраняться до 14-19 суток после ПСМТ. Антитела к альфа1- и альфа2-глобулинам мозга в сыворотках крови пациентов в остром периоде закрытой ПСМТ методом ИФА идентифицированы в концентрациях, достоверно не отличавшихся от уровней этих антител в сыворотках доноров. Статистический анализ исследованных показателей у пострадавших с ПСМТ различной степени тяжести, разделенных на подгруппы с осложненным и неосложненным течением посттравматического периода, выявил в остром периоде нейротравмы достоверную прямую связь концентрации нейроспецифических антигенов с объемом и степенью повреждения ткани спинного мозга, а в отдаленном периоде нейротравмы связь нейровегетативных осложнений с наличием повышенных уровней антител к альфа1- и альфа2-глобулинам мозга.

Заключение. Определение в сыворотке пациентов с ПСМТ органоспецифических альфа-глобулинов мозга может применяться для оценки объема и степени повреждения ткани спинного мозга, а уровня антител к ним – для прогноза поздних патологических синдромов, сопутствующих нейротравме позвоночника.

НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ В ПРАКТИЧЕСКОЙ СТОМАТОЛОГИИ

Лабис В.В.[1], Базикян Э.А.[1], Сизова С.В.[3], Асадчиков В.Е.[4], Бузмаков А.В.[4], Хайдуков С.В.[3], Козлов И.Г.[2]

[1] Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия
[2] Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия
[3] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия
[4] Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

Введение. На сегодняшний день патогенез развития мукозитов и периимплантитов считают многофакторным процессом и соотносят в основном с особенностями микробной контаминации в полости рта пациентов или образованием «биопленки», а также механической

перегрузкой дентальных имплантатов, за счет иррационального ортопедического подхода к восстановлению жевательной функции с опорой на дентальные имплантаты. По нашему мнению, поиск иммунологических аспектов, связанных с нанотехнологическим подходом в изучении осложнений дентальной имплантации, поможет в новом свете отобразить первопричину их возникновения.

Цель. Поиск нового этиологического звена в развитии отсроченных воспалительных осложнений дентальной имплантации и методы их профилактики с помощью проточной цитометрии.

Задачи. Получение наноразмерных частиц с поверхности дентальных имплантатов в условиях лаборатории. Оценка данных частиц, полученных в растворе, с помощью трансмиссионной электронной масс-спектрометрии и элементного анализа, а также методом динамического светорассеяния. Изучение образования комплексов наноразмерная частица-белки сыворотки и плазмы человека. Взаимодействие наноразмерных частиц с клеточными линиями THP-1, HMC-1, JURKAT. Микробиологические аспекты взаимодействия наноразмерных частиц со штаммами: *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia Coli,* в условиях имитации воспаления с помощью интактной и гретой сыворотки. Идентификация наноразмерных частиц в периимплантатных тканях методом микротомографии при проведении хирургических ревизий, а также изучение иммунологических маркеров воспаления в капиллярной крови костного ложа методом проточной цитометрии. Разработка способа персонифицированного подбора системы дентального имплантата до проведения операции дентальной имплантации с целью минимизации воспалительных осложнений в постоперационном периоде с помощью модифицированного базофильного теста методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. Метод динамического светорассеяния с помощью прибора фирмы 90 Plus Partical Size Analyzer Brookhaven instruments corporation (США) в мультимодальном режиме. Микротомографические исследования проводились на микротомографе ТОМАС (Бузмаков А.В. и соавт., 2016), разработанном в Институте кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, с разрешением 9 мкм при использовании полихроматичного рентгеновского излучения (максимальная энергия излучения 25 кэВ). Материалом иммунологического исследования являлась периферическая и капиллярная кровь пациентов. Абсолютное и относительное количество лимфоцитов в исследуемых образцах проводили на гематологическом анализаторе UniCel DxH 800 (Beckman Coulter, США). Идентификацию субпопуляций лимфоцитов проводили методом шестицветной проточной цитофлюориметрии. Для окрашивания клеток были использованы мАТ: CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD23, CD25, CD27, CD38, CD45RA, CD45R0, CD56, CD127, CCR7 (CD197), HLA-DR (все Beckman Coulter, США), меченые различными флуорохромами: FITC, PE, ECD, PC5.5, PC7, APC. Окрашенные клетки анализировали на проточном цитофлюориметре Navios (США). Математическую обработку данных проводили при помощи программы Kaluza v. 1.2 (Beckman Coulter, США) и др.

Результаты. Идентификация наноразмерных частиц металла как в лабораторных условиях, при имитации нагрузки, так и в клинической практике, при проведении хирургических ревизий, дает возможность говорить о новом этиологическом звене в физиологической репарации костной ткани, а также патологических процессах воспаления при внедрении «биоинертного» сплава металла.

Заключение. Персонифицированная профилактика воспалительных осложнений с помощью модифицированного базофильного теста и метода проточной цитометрии может уменьшить количество послеоперационных воспалительных осложнений, связанных с развитием мукозитов и периимплантитов, увеличив тем самым срок службы дентальных имплантатов, особенно у пациентов с выраженным аллергоанамнезом.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОНСЕРВАТИВНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛОКАЛИЗОВАННЫХ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ И ПОДКОЖНО-ЖИРОВОЙ КЛЕТЧАТКИ

Норка А.О.[1], Бацунов О.К.[1, 2], Кузнецова Р.Н.[1, 2]

[1] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Локализованная гнойная инфекция кожи и подкожно-жировой клетчатки проявляется наличием гнойного очага без симптомов общей реакции организма на воспаление. Хорошо известно, что в результате повреждения и инфицирования тканей в организме человека разворачивается сложная последовательность реакций, направленных на предотвращение дальнейшей тканевой деструкции, изоляцию и уничтожение патогена, а также активацию репаративных процессов. Наиболее часто встречаемой гнойно-воспалительной патологией является рожистое воспаление, флегмона, фурункулез. Для лечения данной группы заболеваний предложены многочисленные методы и средства, в том числе и применение иммунотропных препаратов. Но до сих пор не разработаны клинико-иммунологические показания для дифференциального применения иммуномодулирующей терапии. При этом выявляемые изменения в большинстве случаев носят разноплановый характер, что связано, как с разнообразием клинических форм и особенностями их течения, так и с различными подходами к иммунологическому обследованию.

Цель и задачи. Разработка дифференцированного подхода к лечению рецидивирующих гнойно-воспалительных заболеваний кожи и подкожно-жировой клетчатки.

Материалы и методы. Всего было обследовано 32 пациента в возрасте 18 до 55 лет, страдающих рецидивирующими локализованными гнойно-воспалительными заболеваниями кожи и подкожно-жировой клетчатки. Для оценки иммунологического профиля мы определяли концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови методом турбидиметрии с использованием коммерческих тест-систем (Вектор-Бест). Относительное и абсолютное количество Т- и В-лимфоцитов, а также основных субпопуляций определяли методом проточной цитометрии. Материал для определения цитокинового профиля на данном этапе работы законсервирован.

Все обследования пациентов проводились в стадии обострения заболевания.

Результаты. У больных отмечается сниженный уровень концентрации lgA и относительного содержания В-лимфоцитов по сравнению с группой здоровых лиц, при этом наблюдалось достоверное снижение В2-клеток ($p < 0,05$) и В-клеток памяти ($p < 0,01$).

При этом были выявлены сдвиги субпопуляционного состава лимфоцитов – снижение относительного количества $CD45^+CD3^+$ лимфоцитов ($p = 0,034$) и соотношения CD4/CD8 ($p = 0,012$) с одновременным повышением $CD45^+CD3^+CD8^+$ клеток ($p < 0,001$) и $CD45^+CD3^+$ $CD4^+CD8^+$ клеток ($p < 0,001$).

Заключение. Таким образом, необходим дифференциальный подход к лечению рецидивирующих гнойно-воспалительных заболеваний кожи и подкожно-жировой клетчатки в связи с тем, что до сих пор остается открытой проблема обоснования назначения и критериев эффективного использованиях иммунокоррегирующих препаратов, так как лечение больных состандартом не улучшает прогноза заболевания.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИКОПИДА ПРИ АНАЛИЗЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ ХРОНИЧЕСКИМ РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ФУРУНКУЛЕЗОМ

Перова М.В.[2], Кузнецова Р.Н.[1,3], Бацунов О.К.[1,3], Тотолян Арег А.[1,3]

[1] ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[2] СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 39», Санкт-Петербург, Россия
[3] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Актуальность темы исследования: В настоящее время существует тенденция к росту хронических бактериальных и вирусных заболеваний, для которых характерны непрерывно рецидивирующее течение и малая эффективность антибактериальной и симптоматической терапии. К ним относится хронический рецидивирующий фурункулез (ХРФ), характеризующийся частыми рецидивами, вялотекущими обострениями, толерантными к проводимой антибактериальной терапии, и в ряде случаев требующий стационарного лечения. Примечательно, что ХРФ часто возникает у лиц молодого и среднего возраста без наличия у них сопутствующей патологии. На амбулаторном этапе пациенты ХРФ получают стандартную терапию (хирургическое и антибактериальное лечение), что, очевидно, является недостаточным для решения вопроса о полном выздоровлении пациента. В возникновении и развитии ХРФ большее значение большая роль отводится нарушениям нормального функционирования и взаимодействия различных звеньев иммунной системы. Отмечено, что у пациентов ХРФ присутствуют изменения в составе субпопуляций лимфоцитов, нарушения фагоцитарного и гуморального иммунного ответа. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области клинической иммунологии, эффективное лечение ХРФ остается достаточно сложной задачей. В связи с этим необходимо разрабатывать критерии подбора иммунокорригирующих препаратов для сочетанной терапии пациентов ХРФ. Ликопид-глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) – представляет собой синтетический аналог структурного фрагмента оболочки (пептидогликана) бактериальных клеток. ГМДП является активатором врожденного и приобретенного иммунитета, усиливает защиту организма от вирусных, бактериальных и грибковых инфекций; оказывает адьювантный эффект в развитии иммунологических реакций.

Цель. Повышение эффективности терапии пациентов хроническим рецидивирующим фурункулезом путем включения в комплексное лечение иммунокорригирующих препаратов – ликопида.

Материалы и методы. В работе оценивались иммунологические показатели 24 пациентов ХРФ – мужчин и женщин старше 18 лет, страдающих ХРФ различной степени тяжести, характеризующиеся вялым, затяжным течением и частыми рецидивами (не менее 2 раз в год), толерантностью к проводимой антибактериальной терапии и отсутствием сопутствующей патологии. Пациентам назначался препарат Ликопид в дозе 10 мг 1 раз в день в течение 10 дней. Иммунологическое исследование выполнялось до назначения и через 1 месяц после приема Ликопида. Контрольную группу составили 25 условно здоровых доноров. Материалом исследования служили периферическая кровь и плазма крови. Методом проточной цитофлюориметрии проводили фенотипирование лимфоцитов (основных и малых субпопуляций) и количественное определение активности окислительного взрыва гранулоцитов (фагобурст-тест) на проточном цитофлюориметре FACS Canto II. Методом иммунотурбрдиметрии определеляли концентрацию сывороточных иммуноглобулинов на анализаторе Daytona. Проводили определение количества подклассов иммуноглобулинов G методом ИФА.

Результаты. При анализе фенотипирования основных и малых субпопуляций лимфоцитов у пациентов ХРФ до и после назначения ликопида в сравнении с условно здоровыми донорами было выявлено следующее: повышение общего числа лимфоцитов у пациентов ХРФ (20% пациентов до и после приема ликопида), снижение Т-хелперов (25% до и после), повышение дубль-позитивных клеток (25% до и после), повышение NK-клеток (25% до и 20% после), повышение NK-цитолитических клеток (29,1% до и после), повышение NK-цитокинпродуцирующих клеток (25% до и 8,3% после), снижение TNK-клеток до назначения ликопида (20% пациентов) и повышение их числа после (12,5% пациентов); снижение количества В-лимфоцитов (16,6% до и 4,1% после), снижение числа В1- клеток (70,8% до и 54,1% после). При анализе активности окислительного взрыва гранулоцитов у пациентов ХРФ до и после назначения ликопида в сравнении с условно здоровыми донорами было выявлено следующее: увеличение числа гранулоцитов, продуцирующих активные формы кислорода без стимулятора в (25% пациентов до и после); снижение гранулоцитов, продуцирующих активные формы кислорода с *E. coli* (37,5% до и 16,6% после); увеличение числа гранулоцитов, продуцирующих активные формы кислорода с fMLP после назначения ликопида (20,1% пациентов); увеличение числа моноцитов, продуцирующих активные формы кислорода без стимулятора (25% дои после приема ликопида); снижение моноцитов, продуцирующих активные формы кислорода с *E. coli* (50% до и 29,1% после); снижение числа моноцитов, продуцирующих активные формы кислорода с fMLP (29,1% пациентов до и 33,3% после); снижение числа моноцитов, продуцирующих активные формы кислорода с PMA (41% до и 29,1% после). Концентрация иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG в плазме крови пациентов ХРФ существенно не отличалась до и после приема ликопида и не выходила

за пределы референтных значений. Наблюдалось снижение концентрации IgG4 до и после назначения ликопида (33% пациентов). Клинически наблюдалась стойкая клиническая ремиссия (полное исчезновение фурункулов в течение 1 года наблюдений) у 70,9% пациентов и уменьшение количества рецидивов и тяжести течения заболевания у 29,1%.

Заключение. В результате приема ликопида у пациентов ХРФ наблюдалось изменение показателей фагоцитарного звена – тенденция к нормализации числа клеток, продуцирующих активные формы кислорода без стимулятора и в пристутствии стимулятора *E. coli* и PMA; тенденция к нормализации показателей состава субпопуляций лимфоцитов. Не было существенных изменений со стороны гуморального звена до и после лечения. Учитывая высокую клиническую эффективность, можно говорить о возможности применения ликопида в комплексной терапии пациентов ХРФ.

СОДЕРЖАНИЕ В КРОВИ ДЕФЕНСИН-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ СОЧЕТАННОЙ И ОЖОГОВОЙ ТРАВМЕ

Пивоварова Л.П., Осипова И.В., Арискина О.Б., Малышев М.Е.

ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Тяжёлая травма и развитие шока создают предпосылки для генерализации инфекции как за счёт нарушения гемодинамики и кислородного режима, так и за счёт нарушения обменных процессов и угнетения факторов противоинфекционной защиты. К важнейшим микробицидам нейтрофилов относятся α-дефензины с широким спектром антибактериальной и цитотоксической активности.

Цель и задачи. Совершенствование диагностики и раннего прогнозирования гнойных и репаративных осложнений при сочетанной (СТ) и ожоговой (ОТ) травмах, сопровождающихся развитием шока; изучение динамики содержания в крови дефенсин-положительных нейтрофильных гранулоцитов (дефенсин$^+$НГ) в плазме крови как факторов эндогенной бактерицидности при СТ и ОТ.

Материалы и методы. Проведено обследование 110 пострадавших с СТ и шоком II и III степени; средний возраст – 34 (26; 46 лет), находившихся на лечении в отделении сочетанной травмы, и 24 пострадавших с ОТ с индексом Франка (ИФ) больше 70 баллов, средний возраст – 36 (27; 50 лет), находившихся на лечении в ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе с 2013 по 2015 гг. Группу сравнения составили 48 здоровых волонтеров, сопоставимых по возрасту и полу с пострадавшими. Тяжесть травмы оценивали, рассчитывая балл шокогенности травмы (БШТ) по шкалам Ю.Н. Цибина и соавт. (1974) и ISS (Injury Severity Score).

Оценивали динамику содержания дефенсин+НГ, растворимых дефенсинов α, IL-6, IL-8, IL-10, регистрировали уровень люминолзависимой хемилюминесценции НГ в крови пострадавших с сочетанной и ожоговой травмой.

Результаты. У пострадавших с СТ абсолютное содержание нейтрофильных гранулоцитов, содержащих α-дефенсины (HNP 1-3), было увеличено по сравнению с нормальными величинами 1,85 (1,24; 2,60) × 10^9/л во все сроки наблюдения и было максимальным при поступлении (в 3,3 раза). Выявлена положительная корреляционная зависимость между содержанием дефенсин$^+$НГ и тяжестью травмы (БШТ, r = 0,366 и ISS, r = 0,564). Также отмечена положительная корреляционная зависимость между содержанием дефенсин$^+$НГ и спонтанной хемилюминесценцией НГ (r = 0,325), содержанием IL-6 в сыворотке крови (r = 0,538).

У пострадавших с ОТ содержание α-дефенсин положительных НГ увеличивалось в 8,6 раза по сравнению с нормой и составляло 15,9 × 10^9/л. Отмечена положительная корреляция между содержанием дефенсин$^+$НГ и спонтанной хемилюминесценцией полинуклеаров крови (r = 0,322). У пациентов с тяжелой ожоговой травмой и летальным исходом наблюдали увеличение содержания растворимых дефенсинов α в течение первых суток после термической травмы.

Динамика содержания α-дефенсин$^+$НГ в ранний период СТ и ОТ имела однонаправленный характер: многократное увеличение в момент поступления, снижение к 3 суткам после инцидента (в 2,7 раза при СТ и в 6,2 раза при ОТ), повторное возрастание к 10 суткам наблюдения.

Выводы. У пострадавших с тяжелой механической и термической травмой содержание в крови α-дефенсин$^+$НГ зависит от тяжести повреждений и интенсивности воспалительного ответа организма на повреждение, свидетельствует о достаточном бактерицидном потенциале микрофагоцитов. Бактерицидная способность клеток, обусловленная антимикробными пептидами, дополняется продукцией активных форм кислород.

СОДЕРЖАНИЕ В КРОВИ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АДГЕЗИНЫ И СЕЛЕКТИНЫ, У ПОСТРАДАВШИХ С ТРАВМАТИЧЕСКИМ ШОКОМ

Пивоварова Л.П., Осипова И.В., Арискина О.Б., Малышев М.Е.

ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Молекулы адгезии – селектины и интегрины – являются главными факторами контакта между клетками, участвуют в процессах эмиграции лейкоцитов из кровотока и поступления их в очаг воспаления.

Цель и задачи. Совершенствование диагностики и раннего прогнозирования гнойных и репаративных осложнений при сочетанной механической травме, сопровождающейся развитием шока, направленное на улучшение результатов лечения пострадавших. Задачи: исследовать количество клеток, экспрессирующих адгезины и селектины, при травматическом шоке и в раннем периоде сочетанной травмы (СТ).

Материалы и методы. Обследовали 29 пострадавших с сочетанной травмой и шоком II и III степени, находившихся на лечении в отделении сочетанной травмы ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе с 2013 по 2015 г.г. Средний возраст – 34 (26; 46 лет). Тяжесть травмы оценивали, рассчитывая балл шокогенности травмы (БШТ) по шкалам Ю.Н. Цибина (1974) и ISS (Injury Severity Score). Группу сравнения составили 48 здоровых волонтеров (средний возраст – 33,5 (28,8; 43,5). Исследовали содержание в крови CD54$^+$, CD62L$^+$, CD102$^+$ лейкоцитов иммуноцитохимическим методом с использованием моноклональных антител и системы визуализации Novocastra, UK.

Результаты. У пострадавших с травматическим шоком содержание L-селектина, маркером которого является антиген CD62L, было увеличенным по сравнению с нормой на всех сроках наблюдения. Содержания CD62L максимально увеличивалось при поступлении – в 5,8 раз, незначительно снижалось на 1, 3, 5 сутки наблюдения и вновь возрастало к 10 суткам (в 5,3 раза). У умерших пострадавших значение показателя при поступлении и на 1 сутки после травмы возрастало по сравнению с нормой в 23 и 19 раз соответственно и в 2,9 и 3,3 раза – по сравнению с выжившими пациентами. Выявлена положительная корреляция между содержанием $CD62L^+$ в крови и тяжестью повреждений при сочетанной травме по ISS ($r = 0,467$, $p < 0,05$).

Значительное увеличение содержания L-селектина во все сроки наблюдения, особенно в период поступления и 1 сутки, объясняется начальным этапом контакта между лейкоцитами и эндотелиальными клетками с последующей миграцией клеток крови из сосудистого русла в ткани и в очаг воспаления.

Количество $CD54^+$ (ICAM-1) и $CD102^+$ (ICAM-2) клеток также было увеличено на всех сроках наблюдения по сравнению с нормой (в 4-5,5 раза). Отмечено увеличение содержания $CD54^+$ клеток в 1 сутки после травмы в 2,8 раза, увеличение содержания $CD102^+$ клеток при поступлении и на 1 сутки после травмы у умерших пострадавших в 1,5 и 3 раза, по сравнению с выжившими. Выявлена положительная корреляция между содержанием $CD54^+$, $CD102^+$ клеток и количеством баллов ISS ($r = 0,441$ и $r = 0,497$ соответственно).

Увеличение содержания клеток, экспрессирующих адгезины и селектины, в остром периоде травматической болезни патогенетически оправдано и необходимо для обеспечения контакта между лейкоцитами и эндотелиальными клетками, эмиграции лейкоцитов из кровотока, поступления их в очаг воспаления.

Выводы. При травматическом шоке степень усиления адгезивных свойств клеток крови соответствует тяжести механических повреждений.

К ВОПРОСУ О ПРИМЕНЕНИИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ ПРИ ОДОНТОГЕННЫХ ФЛЕГМОНАХ

Романчук А.Л., Дубов В.С., Чагина Е.А.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, Россия

Введение. Иммуномодулирующая терапия является одним из самых важных компонентов патогенетической терапии гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области. Сложность и многостадийность реакций иммунной системы в условиях повреждения организма до сих пор не позволила сформировать однозначных рекомендаций для иммунокоррекции (Перова Н.Ю. и соавт., 2015; Фомичев Е.В.и соавт., 2014). Нельзя не отметить ряд разночтений в результатах исследований как по динамике про- и противовоспалительных цитокинов, так и в подходах к назначению этих препаратов. Считаем, что иммунокоррекция должна базироваться на конкретных сведениях об изменении регуляторного и эффекторного звеньев иммунитета, быть персонифицированной, для чего требуется проведение иммуномониторинга с оценкой собственного эффекта иммуномодуляторов. Отсутствуют данные о клинико-иммунологической эффективности препарата стимфорте при флегмонах челюстно-лицевой области (ЧЛО).

Цель. Проанализировать эффективность препарата стимфорте при флегмонах ЧЛО.

Материалы и методы. Обследовано 57 человек с флегмонами ЧЛО средней степени тяжести, которые были распределены на три группы, все пациенты получали традиционную терапию. Дополнительно пациенты I группы (основная) получали – стимфорте (18 чел.), II (группа сравнения) – препарат ликопид (20 чел.) и III группа – получали только традиционную терапию (19 чел.). В сыворотке обследованных определяли TNFα, IL-1β, IL-10, IL-17, IL-22, IL-4, TGF-β1 методом ИФА с применением реактивов R&D diagnostics Inc. (США). Статистическая обработка проведена непараметрическими методами.

Результаты. Выявлена гиперцитокинемия TNFα, IL-10, IL-17, IL-22 и TGF-β1. Определен дефицит IL-1β и IL-4 в крови пациентов с флегмонами ЧЛО средней степени тяжести. На фоне терапии определено, что у пациентов III группы, получавших только традиционную терапию, к 10 дню болезни у 80% не происходило нормализации показателей цитокинового профиля. Глюкозаминлмурамилдипептид (ГМДП – препарат ликопид) и стимфорте относятся к группе таргетных средств, активирующих врожденный иммунитет. Применении ликопида в комплексной терапии привело к умеренному повышению IL-1β, снижению количества TNFα, IL-17 и IL-22. Что в целом согласуется с данными Н.Ю. Перовой с соавт. (2015) [1]. Использование в терапии у пациентов I группы краун-подобного эфира немикробного происхождения (стимфорте), действующего на TLR-4 рецепторы, способствовало увеличению IL-1β и IL-4, и снижению продукции TNFα и IL-17, что коррелировало с улучшением клинического течения болезни.

Заключение. Использование иммуномодуляторов в комплексной терапии одонтогенных флегмон средней степени тяжести обеспечивают снижение TNFα, IL-17 и увеличение IL-1β, IL-4, что способствует улучшению клинического течения болезни.

ИММУННАЯ ДИСФУНКЦИЯ, АССОЦИИРОВАННАЯ С ОСТРЫМ ДЕСТРУКТИВНЫМ ПАНКРЕАТИТОМ И ПРОГНОСТИЧЕСКИМИ ШКАЛАМИ

Чигаева Е.В.

ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский институт», Ростов-на-Дону, Россия

Термин «иммунная дисфункция, ассоциированная с острым деструктивным панкреатитом и прогностическими шкалами в медицине критических состояний» относится к основным синдромным нарушениям, возникающим у тяжелой категории больных и используется для прогностической оценки результатов каждого варианта лечения. Острый деструктивный панкреатит (ОДП) является одной из самых сложных проблем в неотложной хирургии и одним из потенциально фатальных заболеваний с широкой вариацией клиническим форм и разнообразных местных, а также системных осложнений, которые с современных позиций рассматриваются как этапы эволюции единого патоморфологического процесса, протекающего в условиях эндогенного инфицирования с развитием системного воспаления и вторичного

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ ЧИГАЕВОЙ Е.В.)

Пациент с ОДП	Лейкоцит/ лимфоцит	$CD3^+$ %	$CD3^+CD4^+$ %	$CD3^+CD8^+$ %	$CD19^+$ %	$CD3^-CD16^+$ %	IgG г/л	IgA г/л	IgM г/л	СРБ г/л	ПКТ Нг/мл	SAPS II	SOFA
П., 34 г.	17,3/13	83	62	22	8	3	14,4	2,7	3,7	121	отр	11	1
М.,47 л.	19,2/11	51	28	13	13	34	7,4	1,2	0,5	187	отр	14	1

иммунодефицита. Возникновение ОДП сопровождается механизмами управляемой стимуляции эндогенными (DAMP) соединениями (стерильное повреждение тканей) и экзогенными (PAMP) соединениями (в т.ч. бактериальная транслокация). Эти механизмы приводят к повреждению регуляторной и эффекторной фаз иммунного ответа с формированием в начале заболевания ОДП преимущественно «провоспалительного фенотипа», а затем «иммунодефицитного фенотипа», клинически проявляющегося панкреатогенным и/или септическим шоком, тяжелым абдоминальным сепсисом и полиорганной недостаточностью.

Цель. Оценить изменения в иммунном статусе больных с ОДП тяжелой степени при использовании оценочных и прогностических шкал, характеризующегося различными фенотипами иммунной дисфункции в ежедневной клинической практике в рамках обязательного медицинского страхования для определения тактики и прогноза ведения пациентов.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 19 больных с ОДП (15 мужчин и 4 женщины) тяжелой степени, проходивших лечение в отделениях хирургии и ОРИТ МБУЗ «Городская больница №1 им. Н.А. Семашко г. Ростова-на-Дону», поступивших по скорой помощи в первые трое суток от начала заболевания. Средний возраст больных составил 41,8±6,2 года. Исходную степень тяжести определяли по шкале SAPS II. Для оценки тяжести ОП и прогноза развития заболевания применяли шкалу критериев первичной экспресс-диагностики тяжести ОП С-Петербургского НИИ скорой медицинской помощи им. И.И. Дженилидзе. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности определяли по шкале SOFA. При оценке степени выраженности синдрома системной воспалительной реакции придерживались критериев ACCP/SCCM. В качестве контроля обследовано 15 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Оценка иммунного статуса проводилась в первые сутки пребывания в стационаре и включила в себя определение общего количества лейкоцитов и лимфоцитов, $CD3^+$ лимфоцитов, $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов, $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, $CD19^+$ лимфоцитов, $CD3^-CD16^+$ лимфоцитов методом проточной цитофлюориметрии, иммуноглобулины G, A, M сыворотки крови (г/л) методом нефелометрии, функциональную активность нейтрофилов в НСТ-тесте, ЦИК, СРБ, прокальцитониновый тест (ПКТ).

Результаты и обсуждение. В приведенной таблице представлены «два типа» иммунного статуса, которые были выявлены при иммунологическом обследовании у данной категории больных.

В субпопуляционном составе лимфоцитов выявлена закономерность – чем ниже содержание $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов 29±8%, тем выше содержание $CD3^-CD16^+$ лимфоцитов 29±7% при снижении общего содержание иммуноглобулинов сыворотки, особенно IgM до 0,6±0,2 г/л (n = 7). При референтных значениях $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов – достоверно снижается содержание $CD3^-CD16^+$ лимфоцитов 4±2%. У всех пациентов (n = 19) отмечалась абсолютная лимфопения на фоне лейкоцитоза с повышением уровня СРБ более чем в 10 раз при отрицательном прокальцитониновом тесте. В настоящее время, используя возможности прогностических шкал, актуально создать иммунологическую модель для прогностической оценки результатов каждого варианта лечения больных с ОДП и эффективного мониторинга течения заболевания и его осложнений в режиме скорой/неотложной медицинской помощи.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА ПРИ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

Шохина М.Д., Снимщикова И.А., Халилов М.А., Честнихина А.Д., Афонина И.А., Кабина Н.А.

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», Медицинский институт, Орёл, Россия

Введение. Изучению роли нарушений иммунного ответа при гнойных ранах посвящены многочисленные исследования, однако закономерности дисрегуляции компонентов врождённого иммунитета при раневой инфекции остаются дискутабельными и нуждаются в уточнении. Известно, что одной из адапторных молекул, продуцируемых клетками в ответ на активацию, является оксид азота, оказывающий мультимодальное действие на различные клетки-мишени.

Цель и задачи. Целью данной работы являлось изучение динамики изменений продукции метаболитов оксида азота (NO) у больных с раневой инфекцией. В связи с этим нами решались задачи по исследованию уровня метаболитов NO в сыворотке крови, раневом экссудате, а также в культуре мононуклеарных фагоцитов крови больных гнойными ранами.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением находились 145 пациентов с различными причинами возникновения гнойных ран (средний возраст 42,7±3,5 лет), получавших традиционное лечение: 65 – с ранами после вскрытия абсцессов и флегмон мягких тканей; 20 – с послеоперационными ранами, 30 – с посттравматическими ранами; 30 – с флегмонозно-некротической формой рожи. Для получения раневого экссудата (РЭ) использовали стерильные марлевые тампоны, которые помещали в рану с экспозицией на 20-30 секунд. После аппликации пропитанный тампон вносили в пробирку с 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида на 30 минут с последующим его удалением после центрифугирования в течение 5 минут при 1500 оборотов/мин. Мононуклеары периферической

крови здоровых лиц и больных с раневой инфекцией выделяли с использованием метода дифференциального центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографин. Разделение суммарной фракции мононуклеаров на моноциты и лимфоциты осуществляли посредством избирательной адгезии моноцитов к пластику. Для определения способности клеток к продукции метаболитов оксида азота (нитратов и нитритов) мононуклеарные фагоциты крови (МНФ) в концентрации 2 млн/мл инкубировали в течение 24 часов в сывороточной среде RPMI-1640 в лунках 96-луночных планшетов при 37 ˚С в атмосфере 5% CO_2. В качестве индуктора синтеза оксида азота использовали TNFα в концентрации 25 пкг/мл. Спонтанную и стимулированную продукцию NO в пробах оценивали спектрофотометрически при длине волны 540 нм с помощью реактива Грисса. Результат рассчитывали по кривой с использованием стандартных растворов нитрита натрия. Для определения иммунологических показателей, принимаемых за физиологическую норму, были обследованы 20 здоровых лиц (средний возраст 45,1±0,5 лет).

Результаты. Анализ результатов показал, что при типичном течении раневого процесса пик суммарной продукции нитритов и нитратов в биологических жидкостях приходится на 1-2 сутки со снижением к 5-7 дню. При проведении клинико-иммунологических параллелей между изменением спонтанной и цитокининдуцированной продукции NO при типичном, затяжном и хроническом течении раневого процесса было установлено, что у всех пациентов с вялотекущей и хронической раневой инфекцией оксид азота в экссудате из раны регистрировался в более низких концентрациях (1,1±0,05 мкмоль/л и 0,3±0,03 мкмоль/л, соответственно), что может иметь важное значение в развитии осложнений. Более низкий уровень метаболитов NO был выявлен также при хронических гнойных ранах в сыворотке крови и супернатантах МНФ крови. Следует отметить, что резкое нарастание концентрации NO (более 6,5 мкмоль/л) в раневом экссудате, как правило, на 7-8 сутки на фоне типичного течения раневого процесса сопровождалось последующим развитием инфекционных осложнений.

Заключение. Полученные результаты позволяют рассматривать динамику показателя NO в качестве одного из важных прогностических маркеров течения раневого процесса при гнойных ранах, что обосновывает актуальность его изучения при данной патологии.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В ПЕДИАТРИИ

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ

Арипова Т.У., Мусаходжаева Д.А, Шоазизов Н.Н., Джумаева Д.Н.

Республиканский научный центр иммунологии Министерства здравоохранения РУз, , Ташкент, Узбекистан
Ташкентский педиатрический медицинскую институт, Ташкент, Узбекистан

Повторные заболевания органов дыхания у детей раннего возраста представляют серьезную медико-социальную проблему, остающуюся одной из приоритетных в отечественной педиатрии. От формирования адекватной защитной реакции на различные возбудители и аллергены зависит состояние здоровья в последующие возрастные периоды и истоки хронических и рецидивирующих заболеваний органов дыхания. И в этом плане иммунокоррекция, как метод терапии у часто болеющих детей, патогенетически обоснован, что и предопределяет его широкое распространение в педиатрии.

Целью исследования явилось изучение параметров иммунной системы у детей первых трех лет жизни, часто болеющих респираторными заболеваниями для обоснования проведения иммунокорригирующей терапии.

Обследовано 68 детей в возрасте от 1,5 до 3 лет, имеющих 6 и более эпизодов острых респираторных инфекций в год. Контрольную группу составили 20 практически здоровых детей того же возраста. Оценку параметров иммунного статуса проводили определением содержания $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD20^+$ лимфоцитов. Сывороточные IgA, IgM, IgG определяли методом радиальной иммунодиффузии в геле. Концентрацию общего IgE в сыворотке определяли методом ИФА. Уровень ЦИК определяли методом их преципитации полиэтиленгликолем 6000 по В.Ю. Климову. Уровень провоспалительных цитокинов (TNFα и IFNγ) в сыворотке крови методом ИФА. В группе часто болеющих детей наблюдался ряд статистически достоверных отличий от показателей контрольной группы, снижение уровня $CD3^+$, $CD4^+$ ($P < 0,01$). Также, наблюдалось уменьшение количества зрелых В-лимфоцитов ($p < 0,05$) и снижение иммунорегуляторного индекса ($p < 0,05$). Угнетение фагоцитарного звена выражалось в снижении функциональной активности нейтрофилов ($p < 0,01$). При оценке цитокинового статуса больных отмечается повышение продукции IL-2, IL-4 и TNFα ($p < 0,01$) на фоне снижения уровня IFN ($p < 0,01$), что расцениваеся как проявление нарушений противовирусного иммунитета, которое может являться инициальным фактором развития инфекции. Наблюдалось некоторое повышение IgE (как результат повышенной продукции Th2-типа). Повышение уровня IgM в сыворотке в целом по группе можно охарактеризовать только в виде тенденции, так как оно регистрировалось не у всех больных и демонстрировало значительную вариабельность данных. Кроме того, выявлено достоверное снижение IgA ($p < 0,01$) и тенденция к снижению IgG. Препаратом выбора стал иммуномодулятор Полиоксидоний. При терапии Полиоксидонием отмечается стабилизация фагоцитарной активности до значения физиологической нормы. Полиоксидоний действует на клеточном уровне: с одной стороны он стимулирует продукцию IL-2 иммунокомпетентными клетками, с другой – экспрессию CD25, обеспечивает восстановление пролиферативной активности лимфоцитов. Применение Полиоксидония в комплексном лечении часто и длительно болеющих детей способствовало положительным иммунологическим изменениям. Так, отмечено статистически значимое повышение содержания Т-лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$) по сравнению с исходным на фоне снижения содержания незрелых В-лимфоцитов ($CD72^+$). Выявлено статистически достоверное снижение уровня IgM, синтеза продукции IL-2, IL-4, TNFα в 1,5-2 раза при повышении уровня IFNγ и IgA.

Таким образом, иммунологические изменения, которые наблюдались у часто и длительно болеющих детей, можно квалифицировать как вторичное иммунодефицитное состояние, при котором включение в состав комплексной терапии препарата Полиоксидоний повышает эффективность лечения и уменьшает вероятность возникновения осложнений.

ОЦЕНКА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С ЭПИЛЕПСИЕЙ НА ФОНЕ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ПАРАЛИЧА

Артыкова М.А.

Институт усовершенствования врачей, Ташкент, Узбекистан

Детский церебральный паралич (ДЦП) и эпилепсия являются одними из самых инвалидизирующих заболеваний в неврологии детского возраста. Склонность к эпилепсии имеют 15-90% детей с ДЦП. Эпилепсией страдает почти половина пациентов со спастической тетраплегией и спастической гемиплегией, несколько реже она встречается у детей со спастической диплегией.

Больные ДЦП представляют собой группу с сочетанным поражением нервной и иммунной систем. Среди маркеров нейродеструктивных и репаративных меха-

низмов особое внимание уделяется провоспалительным цитокинам, которым отводится основная роль в осуществлении бидиректоральной связи между нервной и иммунной системами организма.

Целью исследования явилось изучение уровня TNFα и IFNγ у детей с эпилепсией при ДЦП. Обследовано 85 детей в возрасте до 5 лет. Из них 48 детей с ДЦП и 37 детей с эпилепсией на фоне ДЦП. 19 практически здоровых детей составили контрольную группу. Патология ДЦП и эпилепсии устанавливалась на основании клинико-инструментальных, анамнестических, генеалогических, биохимических методов исследования. Уровень TNFα и IFNγ определяли в сыворотке периферической крови и в спиномозговой жидкости (СМЖ) методом ИФА (ООО «Цитокин», Россия).

Анализ результатов, полученных при изучении содержания TNFα выявил некоторое различие: в сыворотке периферической крови у детей с ДЦП уровень TNFα в 2,8 раза выше контрольных значений ($P < 0,001$). В то время как у детей с эпилепсией при ДЦП он составил в среднем 36,4±1,04 пг/мл, что достоверно выше значений контрольной группы ($P < 0,05$), но ниже значений детей с ДЦП в 2 раза ($P < 0,01$).

Установлено, что TNFα ответственен за прогрессирующее повреждение нейронов и является важным пусковым фактором в нейропротективной интервенции после острого периода повреждения мозга. Показано, что TNFα имеет отношение к повреждению миелина и олигодендроцитов, может вызвать артериальную гипотензию ишемических повреждений вещества мозга. Вместе с тем высокая концентрация этого цитокина может играть регулирующую роль. Возможно, повышенный уровень TNFα у детей с ДЦП связан с влиянием перенесенной гипоксии. При изучении уровня IFNγ в сыворотке крови было выявлено достоверное его снижение по сравнению с данными контрольной группы (22,3±1,8 пг/мл) ($P < 0,05$). Причем более глубокий дефицит наблюдался у детей с эпилепсией на фоне ДЦП ($P < 0,01$).

Уровень цитокинов в спинномозговой жидкости у детей с ДЦП показали, что присоединение эпилепсии способствует повышенному уровню TNFα ($P < 0,05$) и дефициту интерферона-γ ($P < 0,05$).

О дивиации цитокинового профиля по пути Th1-типа (провоспалительного) можно судить по содержанию интерферона-γ. Участие цитокинов в повреждении белого вещества мозга и убыли нейронов представляется закономерным, если учесть, что цитокины активно индуцируют апоптоз. Проникшие в нервную систему активированные Т-клетки, вторично активированные макрофаги и клетки микроглии выделяют провоспалительные цитокины, что ведет к развитию ограниченной воспалительной реакции. В этих очагах начинают продуцироваться антитела против собственного миелина (антимиелиновые антитела), концентрация которых быстро возрастает за счет системно образующихся через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Начинается процесс гибели олигодендроглиоцитов. Увеличивается проницаемость ГЭБ, что способствует усилению аутоиммунных реакций. По данным некоторых авторов была гипотеза, что повышенный уровень провоспалительных цитокинов может быть предиктором развития эпилепсии. Кроме того, было высказано предположение, что повышенные уровни провоспалительных цитокинов могут вызвать повреждение нейронов в течение всей жизни.

ДИСФУНКЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ОТВЕТ НА СТРЕСС У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., Тимофеева А.В.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Введение. Аутизм – это расстройство развития нервной системы, которое характеризуется тяжелыми и устойчивыми нарушениями социального взаимодействия и стереотипным поведением. Этиология расстройств аутистического спектра (РАС) не известна, и, вероятно, включает в себя сложные взаимодействия между генетическими, эпигенетические и экологическими факторами (Iwata K., 2011). В настоящее время считается, что иммунная дисфункция может способствовать прогрессии РАС, однако механизмы такого воздействия остаются не изученными (Napolioni V., 2013).

Цель. Определить профиль цитокинов: IL-6, TNFα, IL-1β, IL-10, и уровень гормонов стресса: кортизола, адренокортикотропного гормона (АКТГ), в плазме крови детей с РАС.

Материалы и методы. В исследование были включены 20 мальчиков с РАС, находящихся на реабилитации в социально-реабилитационном центре «Здоровье» г. Челябинска. Отбор детей проводился врачом – психиатром центра «Здоровье» на основании клинического диагноза и анамнеза заболевания. Для оценки клинико-динамических характеристик состояния были использованы оценочные шкалы CARS (Childhood Autism Rating Scale) и CARS2-HF. В зависимости от возраста дети были разделены на 2 группы: дошкольники (3-6 лет) – 11 человек и дети младшего школьного возраста (7 – 11 лет) – 9 человек. В качестве группы контроля было обследовано 16 мальчиков с типичным развитием соответствующего возраста. Работа одобрена этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016.). У всех родителей получено информированное согласие на участие в исследовании.

Уровень цитокинов: IL-6, TNFα, IL-1β, IL-10 (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) и гормонов: кортизола (ООО «Хема», Москва) и АКТГ (Biomerica, Германия) определяли в плазме крови здоровых детей и детей с РАС методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкциям производителей. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали критерий Краскела–Уоллиса с апостериорными парными сравнениями по Коноверу–Инману. Различия считали статистически значимыми при $p \le 0,05$.

Результаты. Нами обнаружено, что дети с РАС дошкольного возраста имели статистически значимо высокие уровни IL-1β в плазме крови по сравнению со здоровыми детьми того же возраста. Различий в уровнях IL-6, TNFα и IL-10 между группами здоровых детей и детей с РАС не выявлено (см. табл.).

ТАБЛИЦА. ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И ОТВЕТА НА СТРЕСС У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И ДЕТЕЙ С РАС (К ТЕЗИСАМ БУРМИСТРОВОЙ А.Л. И ДР.)

Показатель	Здоровые дети дошкольники пг/мл	Дети с РАС дошкольники пг/мл	Здоровые дети школьники пг/мл	Дети с РАС школьники пг/мл
IL-6	3,24 (2,89-3,96)	2,85 (2,32-5,15)	2,87 (2,30-3,41)	2,72 (2,34-3,41)
TNFα	2,14 (1,53-2,88)	2,55 (1,58-3,46)	2,05 (1,58-2,46)	2,32 (1,86-2,69)
IL-1β	2,72 (1,59-3,55)	4,38* (3,10-7,19)	3,53 (2,30-4,15)	2,63 (2,11-3,64)
IL-10	11,84 (8,64-12,80)	9,27 (6,46-24,34)	6,97 (3,87-9,87)	6,11 (5,38-7,03)
кортизол	725 (450-1460)	450 (270-1300)	1425 (880-2080)	590 (305-1350)
АКТГ	4,09 (0,01-15,54)	21,32* (11,56-175,68)	9,86 (0,01-16,98)	24,22* (13,60-164,42)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и 25-75 квартилей; * – различия между здоровыми и больными детьми.

Известно, что IL-1β участвует в регуляции гомеостаза синаптической пластичности в гипокампе (Ashwood P., 2011), а также в активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГН-оси), которая является основой для эмоций и социальных взаимодействий, нарушенных при аутизме (Gadek-Michalska A., 2012; Hamza R.T., 2010). Поэтому мы определили уровни кортизола и АКТГ в плазме крови детей с типичным развитием и индивидуумов с РАС. Нами обнаружены большие межиндивидуальные различия в уровнях этих гормонов, независимо от возраста и наличия/отсутствия РАС. Несмотря на это, концентрация АКТГ в плазме крови детей с РАС в обеих возрастных группах была статистически значимо повышена по сравнению с аналогичным показателем здоровых детей. Уровень кортизола не имел значимых различий, но наблюдалась тенденция к его снижению у индивидуумов с РАС (см. табл.). Наши данные согласуются с данными Hamza R.T. et al. (2010), о низких базовых уровнях кортизола и высоких – АКТГ в сыворотке крови детей с аутизмом, что может свидетельствовать о дисфункции ГГН-оси. Предлагаемые механизмы такой дисфункции могут включать нарушения: в доставке АКТГ к рецепторам коры надпочечников, в биосинтезе кортизола, или в ингибировании отрицательной обратной связи между кортизолом и АКТГ.

Заключение. Таким образом, нами обнаружено повышение уровней IL-1β и АКТГ в плазме крови детей с РАС, что может свидетельствовать об участии дисфункций иммунной системы и ГГН-оси в патофизиологии аутизма.

$CD3^+CD294^+$ ЛИМФОЦИТЫ КАК МАРКЕРЫ Tx2 И Tc2 ИММУННОГО ОТВЕТА

Бычкова Н.В.[1], Синельникова Н.А.[2], Чиненова Л.В.[1], Калинина Н.М.[1]

[1] ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Популяция Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CRTH2 (CD294), является гетерогенной и состоит из Т-хелперов 2 и Т-цитотоксических 2, характеризуется определенным профилем внутриклеточных цитокинов (синтез IL-4, IL-5, IL-13 и отсутствие синтеза IFNγ), а также совокупной экспрессией хемокиновых рецепторов CCR3 и CCR4.

Цель. Оценить количество $CD3^+CD294^+$ лимфоцитов в периферической крови у пациентов с аллергическими и аутоиммунными заболеваниями.

В проведенное исследование включены пациенты с атопическим дерматитом (АД) (n = 82, возраст 3,5±3 года), спонтанной (СК) (n = 32, возраст 8,5±0,9 лет) и смешанной крапивницей с преобладанием индуцированных форм (ИК) (n = 30, возраст 11,8±0,9 лет), рассеянным склерозом (РС) (n = 27, возраст 37±10 лет). Группы сравнения – условно здоровые взрослые (n = 13, возраст 38±10 лет), условно здоровые дети (n = 9, возраст 9±3 лет). Идентификация $CD3^+CD294^+$ лимфоцитов проведена с использованием набора Allergenicity kit (BECKMAN-COULTER, USA) методом проточной цитометрии (FC 500, BECKMAN-COULTER, USA). В сыворотке крови пациентов определен уровень общего иммуноглобулина Е (Immulite, USA).

Популяция $CD3^+CD294^+$ была значительно меньше у детей, чем у взрослых, и составила в группе здоровых детей 0,3±0,05% от лимфоцитов, у пациентов с ИК 0,5±0,05%, СК – 0,7±0,05% ($p < 0,05$), АД – 1,2±0,06% ($p < 0,01$). В группе здоровых взрослых лимфоциты $CD3^+CD294^+$ составили 0,6±0,06%, у пациентов РС – 1,4±0,06% ($p < 0,01$). Выявлена прямая достоверная корреляционная зависимость между количеством лимфоцитов $CD3^+CD294^+$ и содержанием IgE в сыворотке крови в группах пациентов с АД ($R = 0,6$, $p < 0,01$), СК ($R = 0,5$, $p < 0,05$), РС ($R = 0,6$, $p < 0,05$), что подтверждает способность Т-хелперов 2 индуцировать синтез IgE плазматическими клетками. Среди Т-лимфоцитов молекула CRTH2 преимущественно экспрессируется на $CD4^+$ лимфоцитах, что свидетельствует о Tx2 типе иммунного ответа. В нашем исследовании у одного взрослого пациента с псориазом и выраженной лекарственной аллергией выявлено 19,5% $CD3^+CD8^+CD294^+$ клеток при преобладании в крови популяции $CD3^+CD8^+$ (ИРИ 0,5). Иммунный ответ у пациента проходил по Tx2 типу, что подтверждается высокими уровнями спонтанной продукции и содержания в сыворотке интерлейкина 4 при нормальном уровне интерферона-γ. Иммунный ответ протекал в сочетании с повышенным относительным количеством $CD3^+CD8^+$ и $CD3^+CD8^+CD294^+$.

Исследование фенотипических особенностей Т-лимфоцитов поможет дифференцированной оценке Тх2 и более редкого Тс2 гуморального иммунного ответа у пациентов с аллергической и аутоиммунной патологией и их роли в патогенезе заболевания, что обусловит назначение адекватной персонифицированной терапии.

ЦИТОКИНЫ, СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА И ФУНЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ОСТРОМ ГЕМАТОГЕННОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ У ДЕТЕЙ

Гаврилюк В.П., Конопля А.И., Ефременков А.М.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Стандартная схема лечения детей с острым гематогенным остеомиелитом (ОГО) базируется на стратегии активной хирургической санации остеомиелитического очага в комплексе с системной антибактериальной терапией. Однако стоит отметить, что у больных остеомиелитом на фоне агрессивных внешних воздействий, таких как травма или операция, длительно текущего воспалительного процесса, применения массивных доз антибиотиков развиваются нарушения иммунологической реактивности организма. При этом иммунокоррекции и детоксикации в комплексном лечении хронического остеомиелита уделяется недостаточно внимания.

Цель и задачи. Определить уровень в плазме крови цитокинов, компонентов системы комплемента и функционально-метаболическую активность нейтрофилов при остром гематогенном остеомиелите у детей.

Материалы и методы. На базе Курской областной детской больницы №2 и Детской областной клинической больницы г. Белгорода находилось 23 ребенка в возрасте от 6 до 15 лет (средний возраст 8,2±0,9 лет) с острым гематогенным остеомиелитом длинных трубчатых костей, местно-очаговой формы, которым выполнялось экстренное оперативное вмешательство – остеоперфорации. Определение уровня TNFα, IL-1α, IL-1β, IFNγ, IL-6, IL-8, Г-КСФ, РАИЛ, IL-4, IL-10, IL-2, C3, C3α, C4, C5, C5α, фактора H, C1-ингибитора проводилось с помощью тест-систем (ООО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург) методом твердофазного иммуно-ферментного анализа. Группа контроля состояла из детей, проходивших обследование и лечение по поводу кишечной колики.

Результаты. В условиях ОГО выявлено повышение уровня в плазме крови провоспалительных цитокинов: TNFα, IL-1α, IL-1β, IFNγ, IL-6, IL-8 и Г-КСФ, и противовоспалительных цитокинов: РАИЛ, IL-4 и IL-10. У больных с ОГО до лечения установлено повышение активности комплемента, что проявляется повышение концентрации в C3, C4 и C5, C3a и C5a. При этом концентрация компонентов системы комплемента, обладающих ингибирующей активностью – фактора H и C1-инг., оказалась также повышена. При поступлении у данной категории пациентов повышены показатели активности и интенсивности фагоцитоза, активность их кислородзависимых систем. Сразу после оперативного лечения у детей с ОГО в плазме крови еще больше возрастает концентрация TNFα, IL-6, IL-8, РАИЛ, C3a и C5a, возрастает активность кислородзависимых систем нейтрофилов периферической крови. На фоне стандартной терапии, включающей инфузионную и антибактериальную терапию, к 14 суткам наблюдается нормализация фагоцитарного индекса нейтрофилов периферической крови, снижается, но не до уровня нормы, концентрации TNFα, Г-КСФ, C3 и C1-инг.-компонентов системы комплемента.

Заключение. По-видимому, патогенез выявленных иммунных нарушений у детей с ОГО на фоне проводимого оперативного лечения складывается из следующих компонентов. При всех многочисленных причинах развития данной патологии общим является нарушение структурного и энергетического гомеостаза в клетках-мишенях поврежденных органов и тканей, происходит усиление генерации активных метаболитов кислорода, образующиеся свободные окислительные радикалы нейтрализуются биоантиоксидантами различной химической природы, что вызывает выраженные изменения иммунного статуса на системном уровне. На фоне возникающего вторичного иммунодефицитного состояния у детей с ОГО проведение оперативного лечения с анестезиологическим пособием, кровопотерей, антибиотикотерапией имеет место углубление нарушений целого ряда показателей иммунного статуса, развивается «окислительный стресс», что усугубляет выраженность иммунных сдвигов.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОКСИДАТИВНОГО СТАТУСА ГРАНУЛОЦИТОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

Гусева О.Е., Лебедько О.А.

Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – НИИ Охраны материнства и детства, Хабаровск, Россия

Введение. В настоящее время одним из актуальнейших направлений фундаментальных исследований в пульмонологии является изучение молекулярных механизмов хронизации воспалительного процесса (Robb C.T., Regan K.H., 2016; Serhan C.N., 2017), поиск путей коррекции, в данном аспекте постоянно расширяется представление о роли свободных радикалов (СР). На современном этапе хронические воспалительные заболевания легких (ХВЗЛ) характеризуются длительным рецидивирующим течением, преобладанием стертых клинических форм, сложностью в выборе эффективного медикаментозного сопровождения. Важно отметить, что, несмотря на неуклонный рост заболеваемости ХВЗЛ у детей, в литературе имеется недостаточно сведений об особенностях процессинга и детоксикации свободных радикалов при данной патологии.

Цель и задачи. Изучение особенностей оксидативного статуса гранулоцитов у детей с ХВЗЛ, сочетанных с дефектами органогенеза респираторной системы, в периоде ремиссии; исследование процессинга супероксид-анион радикалов гранулоцитами цельной крови у детей с ХВЗЛ в периоде ремиссии.

Материалы и методы. В исследование были включены 54 пациента с ХВЗЛ, сочетанными с дефектами органогенеза респираторной системы, в периоде клинико-лабораторной ремиссии. В зависимости от возраста пациентов выделены подгруппы: I – от 6 до11 лет; II – от 12 до 17 лет. Контрольную группу составили 40 детей I, II группы здоровья. Исследование оксидативного метаболизма гранулоцитов цельной крови проводили по методикам хемилюминесцентного анализа У.Р. Фархутдинова (2007), V. Witko-Sarsat et al. (2003). Регистрировали значения базального свечения – S luc (светосумму люцигенин-за-

висимого свечения, величина которой прямо коррелирует с образованием супероксид-анион-радикалов) и S luc+zym – светосумму стимулированного опсонизированным зимозаном свечения. Регистрировали коэффициент стимуляции (отношение уровней S luc+zym/ S luc), раскрывающий величину резервных возможностей гранулоцитов.

Результаты. У детей младшей возрастной подгруппы спонтанная генерация супероксид радикала гранулоцитами цельной крови превышала контрольные значения в 2,6 раза. При стимуляции клеточного ответа показатели превышали контрольные – в 2,1 раза. Исследование коэффициента стимуляции позволило зарегистрировать снижение резервных возможностей гранулоцитов крови – коэффициент стимуляции был ниже контрольных значений в 1,2 раза. У пациентов старшей возрастной подгруппы была зарегистрирована аналогичная динамика параметров люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

Заключение. Снижение резервных возможностей гранулоцитарной системы у детей с ХВЗЛ в периоде ремиссии на фоне гиперпродукции этими клетками супероксид-анион радикала может иметь важное значение в персистировании воспалительного процесса в бронхолегочной системе.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ $CD14^+CD16^+$ У НОВОРОЖДЕННЫХ В КРИТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Дударева М.В.[1], Сизякина Л.П.[2], Дударев И.В.[2]

[1] ФГБУ «Институт акушерства и педиатрии» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия
[2] ФГБУ ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», Ростов-на-Дону, Россия

Одно из самых грозных осложнений неонатального периода связанно с аспирацией амниотической жидкости загрязненной меконием. Синдром мекониальной аспирации (СМА) осложняет от 1,7 до 35,8% своевременных родов, при этом летальность новорожденных от СМА составляет 5-40%. Не вызывает сомнения ведущая роль иммунной системы в развитии, клиническом течении и исходах гнойно-воспалительных заболеваний у этих детей. В связи с этим остается актуальным поиск объективных высокочувствительных и специфичных маркеров для ранней диагностики сепсиса у новорожденных.

Цель. Изучение экспрессии $CD14^+CD16^+$ у новорожденных с синдромом мекониальной аспирации.

Материалы и методы. Для решения поставленной задачи было обследовано 175 новорожденных с СМА. Исследования проводили на 3-х цветном проточном цитометре Beckman Coulter (США) с использованием реагентов фирмы Beckman Coulter.

Моноцитарно-макрофагальная система участвует в острых и хронических воспалительных реакциях, играет важную роль в защите организма. По экспрессии рецепторов $CD14^+$ и $CD16^+$ выделяют 2 субпопуляции: классические моноциты с фенотипом $CD14^+CD16^-$ и резидентные моноциты с фенотипом $CD14^+CD16^+$.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что здоровые новорожденные имели значительно более низкий процент $CD14^+CD16^+$ моноцитов, чем у новорожденных с СМА (5,51±0,15% против 9,72±0,52%) ($P < 0,05$). Существенное увеличение экспрессии $CD14^+CD16^+$ моноцитов наблюдалось у новорожденных с СМА осложненных сепсисом (22,25±3,57%) ($P < 0,05$). У этих детей отмечено достоверное снижение IL-1β и IL-4 при одновременном повышении плазменного уровеня IL-6, IL-8. Благодаря ранней диагностике и своевременной модификации антибактериальной и интенсивной терапии лишь у 2 пациентов этой группы зарегистрирован летальный исход. При патолого-анатомическом исследовании у всех погибших детей выявили признаки неонатального сепсиса. Найдено, что уровень IL-1β в крови у новорожденных, умерших с основным диагнозом «септическая инфекция», в исходе заболевания резко снижался до минимальных цифр, граничащих с чувствительностью тест-системы. Было определено повышение экспрессии на моноцитах $CD16^+$ рецепторов до 33,4±3,1% ($P < 0,05$). Таким образом, резкое снижение концентрации IL-1β и существенное повышение экспрессии на моноцитах $CD16^+$ рецепторов в крови детей в критическом состоянии может расцениваться как неблагоприятный прогностический признак. Очевидно, что мониторинговое определение относительного содержания $CD16^+$ на моноцитах позволяет с высокой степенью вероятности диагностировать развитие неонатального сепсиса у новорожденных детей с СМА на доклинической стадии. Полученные результаты позволяют оптимизировать интенсивную терапию в плане проведения обоснованной иммунокоррекции.

Выводы. Снижение концентрации IL-1β в крови новорожденных, состояние которых осложнилось присоединением септической инфекции имеет неблагоприятную прогностическую значимость. Моноциты новорожденных с септическими осложнениями в значительно большей степени экспрессируют $CD16^+$, чем моноциты новорожденных без таковых. Уровень $CD14^+CD16^+$ может служить прогностическим маркером септического осложнения.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (VEGF) У ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Евсеева Г.П., Ефименко М.В., Холодок Г.Н., Савицкая Е.А.

Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания – НИИ охраны материнства и детства, Хабаровск, Россия

Проблема легочно-плевральных осложнений при внебольничной пневмонии (ВП) у детей сохраняется, что создает проблемы для врачей с выбором стартовой терапии и удорожает лечение. К настоящему времени достаточно подробно описаны изменения концентрации цитокинов при различной патологии, но роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) – сигнального белка, участвующего в васкулогенезе и ангиогенезе и являющегося частью системы, которая восстанавливает подачу кислорода к тканям, у детей с ВП изучена на сегодняшний день недостаточна, а его физиологическая активность вызывают большой интерес.

Целью исследования явилось изучение уровней спонтанной и митоген-индуцированной продукции VEGF у детей с осложненным плевритом и неосложненным течением ВП.

Было проведено комплексное обследование 108 детей, госпитализированных по поводу внебольничной пневмонии. Из них 84 ребенка с неосложненным тече-

нием ВП и 24 ребенка – с ВП, осложненной плевритом. Длительность заболевания составила 3-5 дней в обеих группах и статистически не различалась. Проводилась оценка продукции клетками цельной крови интерлейкинов: IL-1, интерферон-гамма (IFNγ), фактор некроза опухолей (TNFα), сосудистый фактор роста эндотелия (VEGF) и др. Для определения спонтанной выработки цитокинов в пробирку с 1,0 мл крови добавляли 0,3 мл среды RPMI 1640. Для определения индуцированной выработки цитокинов клетки крови стимулировали микроорганизмом *S. pneumonae* (серотип 7, 11; штаммы 7C и 11AD). Содержание уровня цитокинов в супернатанте спонтанной и индуцированной *S. pneumoniae* крови проводили иммуноферментным методом с помощью наборов ЗАО Вектор-БЕСТ (Россия, г. Новосибирск). Статистическая обработка материала проведена с применением пакета STATISTICA для Windows (версия 10.0). Учитывая, что распределение вариант выборки отличалось от нормального, для характеристики распределения вариант использовались медиана (Me) и 25-75 квартили. Для оценки различий применялся непараметрический критерий Манна–Уитни «U-тест». Для определения взаимосвязей между показателями использовался коэффициент корреляции Спирмена. Был рассчитан индекс индуцированной активности цитокиновой продукции (ИИАЦ): отношение уровня митогениндуцированной продукции цитокинов к уровню спонтанной продукции цитокинов. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

У детей с ВП с неосложненным течением заболевания при поступлении спонтанная продукция VEGF составила 19,71 пг/мл (7,23-35,35), индуцированная – 23,37 пг/мл (16,46-35,96; $p < 0,05$). ИИАЦ составил 1,18. У детей с ВП, осложненной плевритом, уровень VEGF при поступлении был в 5,9 выше, чем в группе детей с неосложненным течением заболевания и составил 115,7 пг/мл (44,99-186,51), индуцированная продукция – 174,48 пг/мл (105,26-224,7), $p < 0,05$. ИИАЦ равнялся 1,5. Возможно, клетки, испытывающие больший дефицит кислорода при осложненном течении ВП, стимулируют повышение выделения VEGF. Полученные данные соотносятся с данными исследователей о том, что физиологические функции VEGF зависят от определенных уровней VEGF и защитными свойствами обладают низкие уровни VEGF. На сегодняшний день VEGF рассматривают как мультифункциональный цитокин, продуцирующийся различными типами клеток – макрофагами, фибробластами, лимфоцитами, полиморфноядерными клетками. Активация рецепторов на клетках ведет к включению многочисленных внутриклеточных пострецепторных сигнальных каскадов, запускающих ангиогенез и индуцирующих провоспалительные реакции. Так, корреляционный анализ выявил отрицательную взаимосвязь между концентрацией IL-1 и VEGF у детей с неосложненным течением заболевания ($r = -0,46$, $p < 0,05$) при отсутствии такой связи у детей с осложненным течением ВП и положительную зависимость между содержанием спонтанного уровня INFγ и VEGF у детей с неосложненным течением ВП ($r = 0,28$, $p < 0,05$) и у детей с плевритом ($r = 0,42$, $p < 0,05$).

Таким образом, у детей с осложненной ВП индуцирование иммунокомпетентых клеток цельной крови приводит к увеличению секреции VEGF. Выявленные различия концентрации спонтанного и митоген-индуцированного синтеза позволяет рассматривать его как перспективный маркер формирования осложненного течения ВП у детей для совершенствования ранней диагностики течения заболевания.

ПОКАЗАТЕЛИ СОДЕРЖАНИЯ МОНОЦИТАРНОГО ХЕМОАТТРАКТАНТНОГО ПРОТЕИНА 1 (MCP-1) У ДЕТЕЙ С ПЛЕВРИТОМ

Ефименко М.В., Евсеева Г.П., Холодок Г.Н.

Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания – НИИ охраны материнства и детства, Хабаровск, Россия

Весьма актуальной становится задача поиска современных механизмов ранней диагностики осложненного течения внебольничной пневмонии у детей, когда первичные симптомы при неосложненной и осложненной пневмонии идентичны. В последние годы одним из ведущих направлений в диагностике заболеваний является исследование молекулярных маркеров повреждения, одним из которых можно считать моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1). Под действием хемотаксических цитокинов осуществляется миграция лейкоцитов в очаг воспаления.

Цель. Изучение уровней спонтанной и митоген-индуцированной продукции MCP-1 у детей с ВП, осложненной плевритом, и с неосложненным течением ВП.

Было проведено комплексное обследование 108 детей, госпитализированных по поводу внебольничной пневмонии. Из них 84 ребенка с неосложненным течением ВП и 24 ребенка – с ВП, осложненной плевритом. Длительность заболевания составила 3-5 дней в обеих группах и статистически не различалась. Проводилась оценка продукции клетками цельной крови интерлейкинов, в том числе моноцитарного хемоатрактантного протеина-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1). Для определения спонтанной выработки цитокинов в пробирку с 1,0 мл крови и добавляли 0,3 мл среды RPMI 1640. Для определения индуцированной выработки цитокинов клетки крови стимулировали микроорганизмом *S. pneumonae* (серотип 7, 11; штаммы 7C и 11AD). Содержание уровня цитокинов в супернатанте спонтанной и индуцированной *S. pneumoniae* крови проводили иммуноферментным методом с помощью наборов ЗАО Вектор-БЕСТ (Россия, г. Новосибирск). Статистическая обработка материала проведена с применением пакета STATISTICA для Windows (версия 10.0). Учитывая, что распределение вариант выборки отличалось от нормального, для характеристики распределения вариант использовались медиана (Me) и 25-75 квартили. Для оценки различий применялся непараметрический критерий Манна–Уитни «U-тест». Для определения взаимосвязей между показателями использовался коэффициент корреляции Спирмена. Был рассчитан индекс индуцированной активности цитокиновой продукции (ИИАЦ): отношение уровня митогениндуцированной продукции цитокинов к уровню спонтанной продукции цитокинов. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$

Результаты. У детей с ВП с неосложненным течением заболевания при поступлении спонтанный уровень MCP1 составил 225,36 пг/мл (130,11-324,52), индуцированный – 245,19пг/мл (153,24-477,01), $p > 0,05$. ИИАЦ составил 0. У детей с ВП, осложненной плевритом, уровень MCP-1 при поступлении был в 3,5 выше, чем в груп-

пе детей с неосложненным течением заболевания и составил 789,32 пг/мл (405,94-1176,0), индуцированный – 1332,1 пг/мл (982,33-1682,0), $p < 0,001$. ИИАЦ составил 1,7. Установлена прямая корреляция MCP-1 со стимулированным уровнем провоспалительного цитокина IL-17 ($r = 0,77$, $p < 0,05$) при неосложненной ВП. При осложненной ВП у детей определены взаимосвязи IL-17 как со спонтанным показателем MCP-1 ($r = 0,46$, $p < 0,05$), так и стимулированным уровнем ($r = 0,41$, $p < 0,05$) и отрицательная корреляция MCP-1 со стимулированным уровнем противовоспалительного цитокина IL-4 ($r = -0,7$, $p < 0,05$). Высокое значение MCP-1 у детей с плевритом может быть, с одной стороны, маркером активации защитных сил иммунной системы, с другой – возможным триггером запуска осложненного течения заболевания. Полученные данные соответствуют исследованиям о роли хемокина MCP-1 в иммунопатогенезе как белка острой фазы – свидетеля и участника иммунного ответа. Высокие концентрации MCP-1 в крови больных в течение длительного времени, по-видимому, можно расценивать как маркер напряженности иммунной системы.

Таким образом, у детей с осложненной ВП индуцирование иммунокомпетентных клеток цельной крови приводит к увеличению концентрации MCP-1. Выявленные различия концентрации спонтанного и митоген-индуцированного синтеза позволяет рассматривать его как перспективный маркер формирования осложненного течения ВП у детей для совершенствования ранней диагностики течения заболевания.

ФЕНОТИП И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУННЫХ КЛЕТОК В ПУПОВИННОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ПЕРВЫХ СУТОК ЖИЗНИ

Жукова А.С., Ванько Л.В., Тимофеева Л.А.

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Развитие плода в условиях низкой антигенной стимуляции обусловливает незрелость его иммунной системы. В то же время, сразу после рождения ребенка кожа и слизистые дыхательной и пищеварительной систем заселяются микрофлорой, что ведет к активации и дифференцировке иммунных клеток. Однако в настоящее время недостаточно данных о различиях в состоянии иммунной системы у плода и новорожденного. Целью данного исследования была оценка субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток, функциональной активности фагоцитов и концентрации ряда цитокинов, хемокинов и ростовых факторов в пуповинной и периферической венозной крови новорожденных детей первых суток жизни.

Исследование проведено на образцах крови 17 здоровых доношенных детей: из вены пуповины и периферической вены детей в возрасте 1 суток. Клинический анализ крови выполнен на анализаторе Sysmex XT-2000i (Япония), фенотипирование проводили методом проточной цитометрии на приборе FACSCalibur (BD Biosciences, США), используя флуоресцентно меченные моноклональные антитела к поверхностным маркерам. Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции по способности продуцировать активные формы кислорода (АФК) при индукции опсонизированным зимозаном (ОЗ). Содержание цитокинов определяли мультиплексным методом с применением коммерческого набора, согласно протоколу (BioRad, США). Статистическую обработку данных проводили, используя пакет программ MedCalc (Бельгия). Проверку нормальности распределения данных осуществляли с применением критерия Шапиро–Уилка. Для оценки различий применяли непараметрический критерий Вилкоксона, различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как медиана (25-й – 75-й процентили). Наличие корреляционных связей оценивали, исходя из показателей коэффициента корреляции Спирмена. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ.

Определено, что в крови новорожденных в возрасте 1 суток относительное и абсолютное содержание нейтрофильных гранулоцитов выше, чем в пуповинной крови ($P < 0,05$). Установлено, что интенсивность экспрессии (MFI) CD16 на нейтрофильных гранулоцитах в периферической крови незначительно снижена, а CD64 на моноцитах – повышена по сравнению с пуповинной: 804,9 (612,04-945,81) против 979,6 (816,48-1169,92) и 427,8 (316,77-492,04) против 358,3 (289,73-410,93) соответственно. Выявлена более низкая экспрессия антиген-презентирующей молекулы HLA-Dr на клетках периферической крови детей по сравнению с пуповинной: 119,9 (113,74-159,06) против 148,6 (136,06-221,51). При анализе субпопуляционного состава лимфоцитов отмечено более высокое относительное содержание NK-клеток в крови новорожденных 1-х суток жизни по сравнению с пуповинной: 14,9 (10,54-21,04) и 9,2 (4,93-10,40) соответственно. Количество клеток различных субпопуляций, в том числе $CD3^+CD4^+$T-хелперных, $CD3^+CD8^+$T-цитотоксических, $CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$T-регуляторных, $CD3^+CD16,CD56^+$NKT-клеток, $CD19^+CD5^+$B1-, $CD19^+CD5^-$B2-лимфоцитов, $CD19^+CD27^+$B-клеток памяти в пуповинной и периферической крови новорожденных не различалось. Интенсивность ОЗ-индуцированной внеклеточной и суммарной продукции АФК в первые часы после рождения значимо повышалась. Обнаружена прямая корреляционная зависимость между интенсивностью люминол-зависимой хемилюминесценции и содержанием нейтрофильных гранулоцитов: $r = 0,802$ $P < 0,0001$ в пуповинной крови и $r = 0,741$ $P = 0,006$ в периферической детской крови. По-видимому, усиление интенсивности индуцированной хемилюминесценции может быть связано с физиологическим нейтрофилезом, развивающимся у новорожденных в течение первых часов жизни вследствие активного взаимодействия пищеварительной и дыхательной систем с антигенами внешней среды. Исследование содержания цитокинов выявило значимо более высокий уровень TNFα, IL-1β, IL-7, IL-8, IL-10, IL-4 и ГМ-КСФ в периферической крови по сравнению с пуповинной ($P < 0,05$ во всех случаях). Концентрация IL-6, MCP-1 и MIP-1β в плазме периферической крови детей была выше более, чем в два раза, по сравнению с аналогичными значениями в пуповинной крови ($P < 0,01$). Повышение содержания цитокинов и хемокинов может быть обусловлено активным заселением слизистых оболочек иммунными клетками и их взаимодействием с антигенами. Содержание ростовых факторов Г-КСФ и IL-2, провоспалительных цитокинов IFNγ, IL-12, IL-5 и противовоспалительного IL-13 изменялось незначительно ($P > 0,05$).

Исходя из полученных данных, можно заключить, что иммунная система новорожденного в отличие от иммунной системы плода имеет признаки умеренного системного воспаления.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

Иванова О.Н.

Медицинский институт Северо-Восточного Федерального университета им. М.К. Аммосова, Якутск, Россия

Экстремальные климато-географические условия Крайнего Севера оказывают влияние на иммунологические механизмы формирования и особенности клинических проявлений аллергической патологии и требуют изучения.

Цель. Изучить особенности иммунного статуса у детей Республики Саха (Якутия).

Материалы и методы. Обследовано здоровых 1000 детей в возрасте от 0 до 7 лет методом свободной выборки. Все исследования проводились в период низких температур (зимнее время года). Определение субпопуляций Т- и В-лимфоцитов производилось методом ИФА с помощью моноклональных антител. Определение иммуноглобулинов проводилось турбодиметрическим методом путем измерения скорости светорассеяния при образовании иммунных комплексов при кинетическом измерении на мультискане. Уровень IL-1, IL-13, TNF, IFN в сыворотке определяли с помощью метода ИФА, согласно инструкции прилагаемой к наборам антител.

Статистические расчеты выполнены на базе прикладных программ SAS и SPSS.

Результаты. У детей Северных улусов Республики Саха (Якутия) отмечается наибольшее снижение показателей Т- и В-клеточного звена, а также преимущественно содержания сывороточного иммуноглобулина А, повышение уровня IL-13, TNF, снижение уровня IFN. Снижение показателей Т-клеточного звена отмечаются у детей, проживающих в Северных улусах (Верхоянск, Усть-Нера и т.д.), преимущественно субпопуляции Т-хелперов ($CD4^+$). Средние показатели содержания компонентов комплемента С3 и С4 в во всех регионах Якутии ниже, чем по России, наиболее низкий уровень показателей отмечен в Центральных и Северных улусах. Установленные закономерности свидетельствуют о влиянии климато-географических особенностей каждого региона на иммунную резистентность детей, проживающих на территории Республики Саха (Якутия), высокий риск инфекционной патологии (ОРВИ).

Таким образом, частые ОРВИ у детей Крайнего Севера часто сопровождаются повышением уровня IgE, отражают имеющийся вторичный иммунодефицит, являющийся следствием дисбаланса клеточных субпопуляций Th1/Th2 и превалирования цитокинового профиля, характерного для стимуляции Th2.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ГБ

Курбатова О.В.[1], Радыгина Т.В.[2], Сурков А.Н.[2], Закиров Р.Ш.[2], Самохина И.В.[2], Герасимова Д.Г.[3], Фрейдлин Е.В.[2], Петричук С.В.[2]

[1] ФГБНУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[2] ФГБНУ «Научный центр здоровья детей», Москва, Россия
[3] ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Гликогеновая болезнь (ГБ) – группа орфанных наследственных болезней, которые обусловлены недостаточностью ферментов, участвующих в обмене гликогена; характеризуются избыточным накоплением его в различных органах и тканях, в первую очередь печени и мышцах. В результате дефектов ферментной системы печени, нарушено превращение глюкозо-6-фосфат в глюкозу, это затрагивает процессы гликогенолиза и глюконеогенеза, что приводит к гипогликемии голодания с лактацидозом, гиперурикемии и гипертриглицеридемии. Для детей с ГБ характерны частые бактериальные инфекций верхних дыхательных путей и ЛОР-органов, бактериальные инфекции кожи и подкожной клетчатки,стоматиты, гингивиты, пародонтиты, эзофагиты, и др. Любое нарушение обмена в организме, помимо явных клинических проявлений заболевания, приводит к биохимическим изменениям, которые в свою очередь ведут к снижению количества пирувата, нарушению синтеза ацетил-СоА с дальнейшим развитием митохондриальной недостаточности. Метаболизм является основополагающим для ряда клеточных функций и служит источником внутриклеточной энергии, имеются убедительные данные, что обмен веществ регулирует дифференцировку и эффекторные функции иммунокомпетентных клеток. Процесс активации Т-клеток требует, чтобы в клетке произошло метаболическое перепрограммирование: метаболизм провоспалительных Т-хелперов характеризуется перевесом в сторону гликолиза, превалирующего над митохондриальным метаболизмом, тем не менее, для активации эфекторных функций клетки требуется высокий уровень окислительного фосфорилирования.

Цель. Выявить особенности метаболизма лимфоцитов в популяциях лимфоцитов (лф.) у детей с печеночными формами ГБ.

Материалы и методы. Обследовано 22 ребенка с печеночными формами ГБ. Группа сравнения (гр.ср.) составила 24 условно здоровых ребенка. Всем детям было проведено иммуноцитохимическое определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и глицерол-3-

ТАБЛИЦА. ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ (К ТЕЗИСАМ КУРБАТОВОЙ О.В. И ДР.)

фермент/популяция	ГБ, Me (верх.; нижн. квартиль)	Гр. ср., Me (верх.; ниж. квартиль)	P
СДГ в Т-лф	137,5 (113,6; 163,7)	161,2 (155,4; 172,1)	0,000019
СДГ в В-лф	66,9 (48,1; 89,2)	87,2 (75,6; 97,7)	0,00015
СДГ в NK-клетках	152,5 (131,4; 175,3)	168,1 (152,7; 192,6)	0,002076
ГФДГ в Т-лф	106,1 (96; 129)	63,3 (49,3; 79)	0,000012
ГФДГ в В-лф	83,3 (77; 97,5)	46,3 (31,7; 52,2)	0,000033
ГФДГ в NK-клетках	131,7 (98,5; 167,3)	70,7 (57,8; 89,3)	0,000001

фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) в лф. периферической крови с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США). Активность ферментов оценивали в популяциях Т-лф ($CD3^+CD45^+$), включая Th17-лф. ($CD3^+CD4^+CD161^+CD45^+$), регуляторные Т-клетки ($CD3^+CD4^+CD127_{low}^+CD45^+$), активированные хелперы ($CD3^+CD4^+CD127h^+CD45^+$) и Th2-лф ($CD3^+CD4^+CD294^+CD45^+$), в В-лф ($CD3\text{-}CD19^+CD45^+$) и в NK-клетках ($CD3^-CD16^+CD56^+$). Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с помощью пакета Statistica 6.0, критерий Манна–Уитни.

Результаты. Было выявлено, что популяции Т-лф и NK-клеток характеризуются более высоким уровнем активности СДГ и ГФДГ, чем популяция В-лф (табл.). Активность СДГ в субпопуляциях лимфоцитов у пациентов с ГБ была достоверно ниже таковой в гр.ср. Активность ГФДГ была достоверно выше во всех исследованных популяциях по сравнению с гр.ср., что может свидетельствовать об активации иммунокомпетентных клеток и переключении энергообмена на аэробный гликолиз (эффект Варбурга). В популяциях Th17-лф и активированных хелперах (основных эффекторных клеток) активность СДГ была выше, чем активность ГФДГ, тогда как в популяциях регуляторных Т-клеток и Th2-лф активности ферментов были приблизительно одинаковыми. Учитывая, что для активации эфекторных функций клетки требуется высокий уровень окислительного фосфорилирования, а у пациентов с ГБ отмечается сниженная активность СДГ, иммунокомпетентные клетки не могут выполнять свои эффекторные функции в полном объеме, что и приводит к частым интеркуррентным заболеваниям.

Выводы. Показатели активности внутриклеточных ферментов в популяциях лимфоцитов у пациентов с ГБ значимо отличались от показателей гр.ср. Рекомендуется проведение исследования метаболической активности иммунокомпетентных клеток во время плановой госпитализации пациентов в стационар для возможной коррекции выявленных нарушений с целью профилактики интеркуррентных заболеваний.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ДЕТЕЙ С КАРИЕСОМ

Милехина С.А., Климкина Т.Н.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», Владивосток. Россия

Введение. Кариес зубов относится к числу наиболее распространенных болезней человечества, существенно влияющих на состояние здоровья. Как свидетельствуют материалы исследований, стоматологическая заболеваемость среди детского населения России на протяжении нескольких лет остается весьма высокой (Кисельникова Л.П., 2009; Кузьмина Э.М., 2010).

Цель. На основе анализа стоматологического статуса и мониторинга локального иммунитета дать клинико-иммунологическую характеристику при кариесе зубов у детей.

Материалы и методы. Углубленно обследовано 104 человека с установленным диагнозом кариес в возрасте 7-14 лет, разного пола и 20 человек с интактными зубами (здоровые дети, группа контроля). Материалом исследования служили сыворотка крови и нестимулированная слюна. Исследование включало: изучение стоматологического статуса, определение секреторного IgA в слюне, оценки уровня TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-13 в слюне и в сыворотке крови, оценки содержания растворимых рецепторов к цитокинам (sTNFα RII, IL-6 SR) в слюне и в сыворотке крови методом ИФА. Использовали методы корреляционного анализа между количественным (r Пирсона) и качественными признаками – критерий χ^2, Спирмена.

Результаты. При оценке цитокинового профиля смешанной слюны у детей с кариесом установлено, что в общей группе статистически значимо повышен уровень как провоспалительных (TNFα, IL-1β), так и противовоспалительных (IL-10, IL-13) цитокинов по сравнению с контролем. При субкомпенсированном кариесе увеличено содержание в слюне TNFα ($r = 0,8$; $p < 0,05$) с недостаточностью его растворимого рецептора ($r = -0,64$; $p < 0,05$) в группе детей, нуждающихся в санации. В этой группе детей также установлено повышение IL-6 ($r = 0,76$; $p < 0,76$) и его растворимого рецептора ($r = 0,81$; $p < 0,02$). Установлено, что уровень IL-10 в слюне был выше при компенсированном кариесе, как в группе детей с санированной полостью рта, так и в группе, нуждающихся в лечении. Наиболее выраженное нарушение цитокинового профиля крови зарегистрировано у детей с субкомпенсированным кариесом и несанированной полостью рта. Установлена гиперпродукция TNFα, IL-1β, существенное увеличение растворимого рецептора IL-6 и дефицит растворимого рецептора TNFα II типа. Корреляционный анализ выявил прямую зависимость интенсивности кариеса с уровнем IL-1β ($r = 0,44$; $p < 0,05$); растворимым рецептором IL-6 ($r = 0,63$; $p < 0,05$) и обратную – с содержанием растворимого рецептора TNFα II типа ($r = -0,72$; $p < 0,05$) в сыворотке крови.

Заключение. Активация противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-13), индуцирующих выработку секреторного IgA ($r = 0,82$; $0,81$; $p < 0,05$) определена при компенсированном кариесе. При субкомпенсированном кариесе зафиксировано истощение продукции противовоспалительных цитокинов, увеличение TNFα, IL-6, его растворимого рецептора и дефицит растворимого рецептора TNFα II типа. Установлено увеличение sIgA в слюне детей с кариесом, особенно в возрастной группе 11-14 лет. У детей с кариесом выявлен дисбаланс цитокинового профиля сыворотке крови с превалированием провоспалительных медиаторов.

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Осиков М.В., Альмухаметова О.Н.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия

Изменения иммунного статуса у недоношенных новорожденных (НН) сопряжены с высоким риском развития гнойно-септических осложнений и летальности. В то же время, сведения о регуляции иммунного ответа у НН, представленные в литературе, неоднозначны и противоречивы. Плейотропные эффекты эритропоэтина (ЭПО), в том числе иммунотропные, при различной патологии у взрослых, продемонстрированные в клинических и в экспериментальных условиях, а также сведения об эффектах ЭПО у НН в отношении коррекции анемии, неврологических расстройств, позволяют предположить его влияние на иммунный статус у НН.

Цель. Исследовать влияние ЭПО на концентрацию некоторых цитокинов в крови у НН.

Материалы и методы. Работа выполнена на 30 новорожденных в Клинике ФГБОУ ВО ЮУГМУ Мини-

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ ЭПО НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ У НН С ОНМТ, Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$) (К ТЕЗИСАМ ОСИКОВА М.В. И АЛЬМУХАМЕТОВОЙ О.Н. «ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ»)

Показате-ли, пг/мл	8 сутки			18 сутки		
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3
IFNγ	0	0	0	0	0	0
IL-4	1,39 (0,98-2,02)	7,03 (4,21-9,08)*	0 (0-1,64) #	0,02 (0-1,82)	1,85 (1,92-1,85)*	1,03 (0-2,80)*
IL-10	16,10 (4,64-30,36)	28,94 (24,60-33,47)*	13,21 (10,89-14,33)*#	16,74 (12,36-24,04)	25,41 (25,41-31,76)*	17,39 (8,51-19,75) #

Примечание. * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1, # – с группой 2.

стерства здравоохранения РФ. Группа 1 (n = 10) – доношенные новорожденные (ДН), группа 2 (n = 10) – НН с очень низкой массой тела (ОНМТ) (ГВ от 29 недель до 31 недели и 6 дней включительно), группа 3 (n = 10) – НН с ОНМТ, которым вводили ЭПО с 6 суток после рождения в дозе 200 МЕ/кг через 48 часов. Показатели оценивали на 8 сутки и 18 сутки после рождения, когда суммарная доза введенного ЭПО составила соответственно 400 МЕ/кг и 1400 МЕ/кг. Концентрацию в сыворотке IL-4, IL-10, IFNγ определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе PersonalLAB (Италия) с применением тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (Россия). Уровень цитокинов выражали в пг/мл. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica for Windows v. 10.0.

Результаты. Установлено, что у ДН, а также у НН с ОНМТ, в том числе после применения ЭПО на 8 и 18 сутки жизни уровень IFNγ в сыворотке находится ниже пороговых значений для его определения на анализаторе. Концентрация противоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 в сыворотке у НН с ОНМТ на 8 сутки превышает соответствующие значения у ДН в 5 и 1,8 раз соответственно, а на 18 сутки – в 5, 8 и 1,5 раза соответственно. Применение ЭПО в суммарной дозе 400 МЕ/кг на 8 сутки после рождения приводит к снижению концентрации в сыворотке IL-4, IL-10, их значения не отличаются от соответствующих значений у ДН. На 18 сутки жизни после введения ЭПО в суммарной дозе 1400 МЕ/кг концентрация IL-4 в сыворотке значимо не отличается от значений в группе 2 и превышала значения в группе ДН; концентрация IL-10 на 18 сутки в условиях применения ЭПО снижалась и не отличалась от значений в группе ДН.

Заключение. Таким образом, у НН с ОНМТ изменения цитокинового профиля в крови на 8 и 18 сутки жизни включают низкие значения IFNγ, увеличение концентрации в сыворотке IL-4 и IL-10. Применение ЭПО в суммарной дозе 400 МЕ/кг на 8 сутки жизни приводит к снижению концентрации в сыворотке IL-4 и IL-10, а после применения ЭПО в суммарной дозе 1400 МЕ/кг на 18 сутки жизни – к снижению концентрации в сыворотке только IL-10. Полученные данные свидетельствуют об изменениях цитокиновой регуляции ммунного ответа у НН с ОНМТ, укладываются в концепцию функциональной незрелости иммунной сисктмы НН, могут вносить вклад в патогенез инфекционных и других осложнений у НН, а также об иммунотропных эффектах ЭПО, его роли в коррекции иммунного статуса у НН с ОНМТ.

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ГИБЕЛЬ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Осиков М.В., Альмухаметова О.Н., Федоров И.А.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия

Введение. Ежегодно более 4 млн. новорожденных умирают из-за последствий инфекций, из них более 1 млн (35%) приходится на недоношенных детей, эти показатели неуклонно растут на протяжении последних 20 лет (Shane A.L. et al., 2014). Ранее нами было показано, что у недоношенных новорожденных (НН) наблюдается лимфоцитопения, ассоциированная с гнойно-септическими осложнениями (Осиков М.В. и др., 2016). В связи с этим, актуальным является поиск эндогенных иммуномодуляторов и обоснование их применения у НН.

Цель. Исследовать влияние различных доз эритропоэтина (ЭПО) на показатели гибели лимфоцитов крови НН в экспериментальных условиях *in vitro*.

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ ЭПО НА ПОКАЗАТЕЛИ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ У НН С ЭНМТ, Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$) (К ТЕЗИСАМ ОСИКОВА М.В. И ДР. «ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ГИБЕЛЬ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*»)

Показатели	Контроль + физ. р-р	+ ЭПО 30 МЕ/л	+ ЭПО 15 МЕ/л	+ ЭПО 7,5 МЕ/л	+ ЭПО 3,75 МЕ/л
Annexin-5-FITC$^-$/7-AAD$^-$, %	89,20 (74,30-91,95)	90,10 (88,80-90,50)	92,30 (90,30-92,45)	90,35 (84,00-92,20)	89,30 (75,05-91,45)
Annexin-5-FITC$^+$/7-AAD$^-$, %	9,55 (6,95-24,35)	9,05 (8,45-10,00)*	7,15 (6,80-8,80)*	3,65 (0,85-6,90)*	7,35 (4,10-9,25)*
Annexin-5-FITC$^+$/7-AAD$^+$, %	0,45 (0,20-0,90)	0,35 (0,20-0,55)*	0,35 (0,15-0,55)*	0,30 (0,20-0,40)*	0,35 (0,25-0,45)*

Примечание. * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой контроля по критерию Вилкоксона.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 32 новорожденных в Клинике ФГБОУ ВО ЮУГМУ Министерства здравоохранения РФ, разделенных на 2 группы: группа 1 (n = 12) – НН с очень низкой массой тела (ОНМТ) (ГВ от 29 недель до 31 недели и 6 дней включительно); группа 2 (n = 10) – НН с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) (ГВ от 27 недель до 28 недель и 6 дней включительно). К 100 мкл суспензии лимфоцитов (5×10^6/л), выделенных из пуповинной крови, добавляли 100 мкл физиологического раствора (контроль) или ЭПО («Эпокрин», Россия), разведенного в физиологическом растворе в концентрациях 30 МЕ/л; 15 МЕ/л; 7,5 МЕ/л; 3,75 МЕ/л, что соответствует 200%, 100%, 50%, 25% от его нормальной концентрации в крови здоровых взрослых людей. Инкубировали 30 мин при 37 °С. На проточном цитофлуориметре Navios (BeckmanCoulter, США) с использованием тест систем из набора «Annexin5-FITC/7-AAD kit» (BeckmanCoulter, США) дифференцировали клетки: интактные (Annexin-5-FITC$^-$/7-AAD$^-$), с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC$^+$/7-AAD$^-$), с поздними признаками апоптоза и частично некротические (Annexin-5-FITC$^+$/7-AAD$^+$).

Результаты. Установлено, что добавление ЭПО в дозах 15 МЕ/л и 30 МЕ/л к лимфоцитам, выделенным из пуповинной крови НН с ОНМТ не изменяет экспрессию маркеров апоптоза и некроза на клетках, а также представительство интактных лимфоцитов ($p > 0,05$). Применение ЭПО в дозах 7,5 МЕ/л и 3,75 МЕ/л приводит к увеличению количества лимфоцитов с ранними признаками апоптоза ($p < 0,05$) и увеличению представительства интактных лимфоцитов ($p < 0,05$). Результаты оценки влияния ЭПО на экспрессию маркеров гибели лимфоцитов у НН с ЭНМТ представлены в таблице. ЭПО во всех используемых дозах снижает представительство клеток с ранними маркерами апоптоза, а также клеток с поздними маркерами апоптоза и некротических клеток. Наиболее выраженный эффект зафиксирован при использовании ЭПО в дозе 7,5 МЕ/л.

Заключение. Таким образом, эффект ЭПО на экспрессию маркеров апоптоза и некроза в лимфоцитах, выделенных из пуповинной крови НН, зависит от степени недоношенности (т.е. структурно-функциональных изменений лимфоцитов) и дозы ЭПО. У НН с ОНМТ ЭПО в средних и малых дозах, не превышающих его 50% уровень в крови, увеличивает количество лимфоцитов с признаками апоптоза, т.е. ЭПО выступает в роли инициатора гибели клеток. В данном случае, по всей видимости, наблюдается феномен негативной селекции дисфункциональных клеток. В отношении лимфоцитов, выделенных из крови НН с ЭНМТ ЭПО с максимальным эффектом в дозе 7,5 МЕ/л выступает в роли протекторного фактора, ограничивающего гибель клеток путем апоптоза/некроза.

ПОЯВЛЕНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ С ФЕНОТИПОМ CD64$^+$CD32$^+$CD11b$^+$ – РАННИЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ БИОМАРКЕР ВРОЖДЕННОЙ ПНЕВМОНИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Смерчинская Т.В.[1], Нестерова И.В.[2], Чудилова Г.А.[1], Ломтатидзе Л.В.[1], Ковалева С.В.[1]

[1] ФГОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Краснодар, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, Москва, Россия

Дыхательные нарушения различной этиологии – наиболее часто встречающаяся патология в периоде новорожденности, не всегда не имеют инфекционно-воспалительную этиологию. При этом под маской дыхательных расстройств может протекать врожденная пневмония бактериальной или вирусной этиологии. Иммунная система новорожденных находится в состоянии физиологической супрессии, в связи с чем, при врожденной пневмонии бактериальной этиологии очень важным является своевременное назначение антибактериальной терапии. Используемые в практике неонатолога методы лабораторной диагностики, подтверждающие врожденную пневмонию и другие бактериальные инфекции (ускоренное СОЭ, СРБ, прокальцитонин), не во всех случаях оказываются информативными, что требует поиска новых биомаркеров. Следовательно, разработка новых высокоинформативных методов ранней диагностики врожденной пневмонии у новорожденных с использованием иммунологических биомаркеров является актуальной задачей. Многочисленными исследованиями показано неадекватное функционирование нейтрофильных гранулоцитов (НГ) при инфекционно-воспалительных процессах у новорожденных, описано повышение экспрессии поверхностной мембранной НГ молекулы CD64$^+$ в период развития острого бактериального воспаления. В то же время исследований, посвященных изучению фенотипа НГ, с одномоментной оценкой экспрессии нескольких рецепторов на их мембране, у здоровых новорожденных и у новорожденных с врожденной пневмонией, практически, не проводилось.

Целью исследования явилось изучение особенностей одномоментной экспрессии молекул CD64, CD32, CD11b, с оценкой их возможной диагностической значимости, в субпопуляции НГ с фенотипом CD64$^+$CD32$^+$CD11b$^+$ у здоровых новорожденных, а также у новорожденных, страдающих врожденной пневмонией бактериальной этиологии.

В исследование были включены 32 новорожденных (19 мальчиков, 13 девочек) поступивших в отделение реанимации и интенсивной терапии Краснодарской Детской краевой клинической больницы в возрасте 3-15 суток, массой тела – 2880-4370 г, с гестационным возрастом – 38-40 недель с диагнозом: врожденная пневмония (ВП). Проведение клинических, функциональных, рентгенологических и лабораторных, в том числе иммунологических и микробиологических, исследований осуществлялось в первые сутки поступления новорожденных в стационар. При этом только через 7-10 суток имело место подтверждение бактериальной этиологии врожденной пневмонии. Контрольную группу составили 22 практически здоровых доношенных новорожденных (10девочек и 12 мальчиков) с гестационным возрастом – 38-40 недель, весом – 2880-4370 г на 3-6 сутки жизни. Забор периферической крови для иммунологических исследований производился из периферической венозной сети (подкожные вены тыла кисти). Исследовались маркеры поверхностной цитоплазматической мембраны НГ: проведена одномоментная оценка экспрессии молекул CD64, CD32, CD11b методом проточной цитофлуорометрии на CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием панели моноклональных антител: CD64-FITC, CD32-PE, CD11b-PC5 (фирма Beckman Coulter, США). Оценивался процент НГ (%НГ), одномоментно экспрессирующих CD64, CD32, CD11b. Статистическая обработка полученных данных производилась с использованием программы для IBM PC "BIOSTAT". Проведение сравнительного анализа продемонстрировало, что у здоровых доношенных новорожденный контрольной группы коли-

чество НГ с фенотипом $CD64^+CD32^+CD11b^+$ составляет лишь 1,63±0,68%, при этом у доношенных новорожденных с врожденной пневмонией бактериальной этиологии имеет место значительное, – в 12,9 раза повышение количества НГ с фенотипом $CD64^+CD32^+CD11b^+$ – до 21,07±0,88% ($p < 0,001$). Использование многоцветного цитофлуорометрического исследования позволило получить информацию об особенностях одномоментной экспрессии нескольких мембранных рецепторов НГ (FcγRI, FcγRII, C3b), имеющих большое значение для реализации фагоцитарной функции НГ, у здоровых доношенных новорожденных и у новорожденных с врожденной пневмонией бактериальной этиологии. Установлено, что у доношенных новорожденных с врожденной пневмонией имеет место значительное повышение количества НГ периферической крови с фенотипом $CD64^+CD32^+CD11b^+$ – в 12,9 раза достоверно превышающее количество НГ с подобным фенотипом у здоровых доношенных новорожденных. Исследование количества НГ периферической крови с фенотипом $CD64^+CD32^+CD11b^+$ может быть использовано с диагностической целью: в качестве раннего биомаркера врожденной пневмонии бактериальной этиологии, что позволит своевременно оптимизировать лечебную тактику и подтвердить необходимость проведения антибактериальной терапии.

АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ГЕМАТОГЕННЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

Трофимов В.В., Гаврилюк В.П., Костин С.В., Конопля А.И., Ефременков А.М.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия
Курская областная детская больница № 2, Курск, Россия
Детская областная клиническая больница, Белгород, Россия

Введение. Среди нозологических форм острой хирургической инфекции у детей по тяжести течения, трудностям диагностики и неблагоприятным исходам доминирующее место принадлежит острому гематогенному остеомиелиту. Частое поражение суставов, деформации и патологические переломы, метастазы гнойной инфекции, значительная частота множественных поражений скелета, наличие фатальных осложнений дополняют характеристику тяжести и создают предпосылки к разнообразию клинических проявлений остеомиелитов. Важная роль в патогенезе острого гематогенного остеомиелита отводится факторам иммунной защиты, для этого необходимо определение изменений в иммунной системе, для разработки схем их коррекции и методов поддержки иммунной системы.

Цель и задачи. Установить уровень в плазме крови компонентов системы комплемента при остром гематогенном остеомиелите у детей.

Материалы и методы. Под постоянным наблюдением на базе ОБУЗ «Курская областная детская больница № 2» находилось 16 детей в возрасте от 8 до 15 лет (средний возраст 9,6±0,7 лет) с острым гематогенным остеомиелитом, местно-очаговой формы, которым выполнялось экстренное оперативное вмешательство. Лабораторные методы исследования крови проводились на 1 и 30 сутки с момента поступления в стационар по общепринятым методикам. Количественная оценка уровней C3, C4, C3a, C5, C5a-компонентов системы комплемента, фактора H и C1-ингибитора проводилась с помощью тест-систем (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Группа контроля состояла из 12 здоровых доноров-добровольцев того же возраста.

Результаты. У детей с острым гематогенным остеомиелитом в плазме крови выявлено повышение уровня компонентов системы комплемента – C3, C3a, C4, C5, C5a и регуляторов – фактора H и C1-инг. Сразу после оперативного лечения (остеоперфорации) в плазме крови выявлено еще большее повышение концентрации C3a и C5a, фактора H и C1-инг. К моменту выписки из стационара после стандартного комплексного лечения нормализуется концентрация C3 и C5a-компонента комплемента и фактора H, тогда как концентрация C3a и C4 остается на прежнем уровне, а уровень C1-инг. повышается больше, чем до лечения.

Заключение. Из вышесказанного можно сделать вывод, что при остром гематогенном остеомиелите у детей система комплемента находится в активном состоянии (происходит повышение общей активности комплемента, об этом можно судить по концентрации C3a, C5 и C5a). Мощная стимуляция системы комплемента, реализуется как по классическому пути, так и по альтернативному путям (об этом свидетельствует повышение C4–компонента и C3-компонента соответственно). Несмотря на активное состояние системы комплемента, компенсаторно происходит повышение концентрации ингибиторов классического и альтернативного путей активации (повышение концентрации C1-инг. и фактора H).

ИЗМЕНЕНИЯ В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ БРОНХИТОМ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА

Файзуллаева Н.Я., Азизова З.Ш., Джумаева Д.Н.

Республиканский научный центр иммунологии Министерства здравоохранения РУз, Ташкент, Узбекистан

Несмотря на сложную организацию и совершенство защитных механизмов слизистых оболочек, бактериальные и вирусные патогены нередко успешно преодолевают все барьеры, проникают во внутреннюю среду организма и вызывают заболевание. **Целью** исследования явилось изучение состояния иммунной системы детей с хроническим бронхитом. Были обследованы 53 ребенка в возрасте от 4 до 7 лет, находившиеся в отделении пульмонологии научно-практического медицинского центра педиатрии МЗ РУз с диагнозом хронический бронхит. В зависимости от этиологического фактора дети были разделены на 4 группы: 9 детей с острым бронхитом, 16 – с хроническим обструктивным бронхитом легких, 15 – с хроническим бронхитом на фоне паразитарной инвазии и 9 детей с асмоидным бронхитом. 35 практически здоровых детей того же возраста составили контрольную группу. Был применен комплекс тестов, включающий: иммунофенотипирование (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20), определение уровня цитокинов (IL-1, IL-8), иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, C3 компонента комплемента и лактоферрин.

Результаты исследования показали, что при ОБ и ХОБ наблюдаются изменения, сопровождающиеся лейко- и лимфоцитозом ($P < 0,05$), снижением общего пула Т-лимфоцитов и Т-хелперов ($P < 0,05$). И как результат дисбаланса субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у детей с острым бронхитом, иммунорегуляторный индекс ($CD4^+/CD8^+$) смещен в сторону подавления хелперной активности. При ОБ и ХОБ резко снижен уровень $CD25^+$ ($P < 0,05$)

и повышен $CD95^+$ ($P < 0,01$). Число $CD16^+$, $CD20^+$ и $CD23^+$ в периферической крови повышено ($P < 0,05$). Концентрация IgG и IgA снижена ($P < 0,05$), а IgM и IgE – повышена ($P < 0,5$). Уровень С3 компонента комплемента выше контрольных значений ($P < 0,01$), а уровень лактоферина выше значений контрольной группы ($P < 0,01$) при ОБ и ниже у детей с ХОБ ($P < 0,05$). При ОБ и ХОБ уровень IL-1β, IL-6, IL-8 был выше значений контрольной группы, а уровень IFNγ ниже ($P < 0,01$). У детей с хроническим бронхитом на фоне паразитарной инвазии снижен уровень Т-лимфоцитов и субпопуляций ($CD4^+$ и $CD8^+$). На фоне сниженного содержания Т-лимфоцитов и его субпопуляций уровень киллерной активности, содержание В-лимфоцитов, $CD23^+$ клеток и лимфоцитов с маркером апаптоза ($CD95^+$) достоверно снижены ($P < 0,01$). При этом наблюдалось сниженное содержание лимфоцитов с маркером ранней активации ($CD25^+$) ($P < 0,05$). Уровень IgG в 1,5 раза, а уровень IgA – в 1,4 раза был ниже контрольных значений ($P < 0,01$). Концентрация IgM была в пределах контрольных значений, наблюдалась гиперпродукция общего IgE ($P < 0,001$). Повышенный уровень С3 компонента комплемента и лактоферрина характерно для паразитарной инвазии. У детей с ХБ на фоне паразитарной инвазии уровень изученных цитокинов достоверно повышен, как провоспалительных (IL-1β, IL-6, IL-8) так и противовоспалительного – IL-4, ($P < 0,05$-$0,01$). При этом наблюдается повышенный уровень IFNγ.

Астматический бронхит – инфекционно-аллергическое заболевание нижних дыхательных путей, характеризующееся гиперсекрецией слизистой, отеком стенок, спазмом крупных и средний бронхов. При астматическом бронхите, в отличие от бронхиальной астмы, обычно не возникает приступов выраженного удушья. Тем не менее, в пульмонологии астматический бронхит расценивается как состояние предастмы.

Астматический бронхит имеет полиэтиологическую природу. При этом непосредственными аллергенами могут выступать как неинфекционные агенты, так и инфекционные факторы (вирусные, грибковые, бактериальные, паразитарные).

В состоянии иммунной системы детей с асматическим бронхитом наблюдаются изменения, сопровождающиеся снижением общего пула $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ ($P < 0,01$-$0,05$). Киллерная активность ($CD16^+$) и лимфоциты ранней активации ($CD25^+$) достоверно снижены ($P < 0,01$). Наблюдается повышение уровней $CD20^+$-, $CD23^+$ и $CD95^+$ лимфоцитов ($P < 0,01$-$0,05$). При изучении гуморального звена были выявлены нарушения в синтезе иммуноглобулинов, которые выражались сниженным уровнем IgG и гиперпродукцией IgA, IgE ($P < 0,01$-$0,05$). Выявлен сниженный синтез С3-компонента комплемента и лактоферрина ($P < 0,05$). Наблюдалась гиперсекреция всех изученных цитокинов.

Таким образом, механизм формирования воспаления при бронхитах напрямую связан с дисбалансом и изменением функциональной активности параметров иммунной системы. Слизистые респираторного тракта постоянно подвергаются воздействию разнообразных чужеродных веществ, аллергенов и микроорганизмов. Барьерная функция слизистых, заключающаяся в предотвращении фиксации и проникновения патогенных микроорганизмов во внутреннюю среду организма, осуществляется комплексом защитных механизмов: барьерной механической функцией слизистых, рецепторами врожденного и адаптивного иммунитета

В целом снижение иммунокомпетентности при бронхолегочных заболеваниях, связанных с сочетанным действием патогенов обусловлено следующими основными механизмами:

– перераспределением иммунокомпетентных клеток с опустошением зон, обеспечивающих наиболее благоприятные условия для развития оптимального иммунного ответа (например селезенка, лимфотические узлы);

– активацией различных органных систем (генов, рецепторного аппарата клеток, сигнальных путей), сопровождающихся изменением функциональной активности иммунокомпетентных клеток;

– усилением запрограммированной гибели клеток (апоптоз) под действием различных факторов.

АНАЛИЗ ЧАСТЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *CFTR* В УЗБЕКИСТАНЕ

Файзуллаева Н.Я., Хегай Т.Р.

Республиканский научный центр иммунологии Министерства здравоохранения РУз, Ташкент, Узбекистан

Муковисцидоз (МВ, CF) – аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR*, муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости. Ген *CFTR* расположен на длинном плече хромосомы 7 в области q31, имеет протяженность около 250 т.п.н. и включает 27 экзонов. К настоящему времени выявлено более 1800 мутаций и около 250 полиморфизмов в гене *CFTR*. Распределение и частота *CFTR*-мутаций значительно различаются в разных странах и этнических группах. Наиболее распространенной из *CFTR*-мутаций, приводящих к МВ, у европейцев является мутация F508del.

Цель. Анализ распределения частот наиболее распространенных мутаций в гене CFTR в Узбекистане.

Молекулярно-генетический анализ проведен у 58 больных МВ детей из неродственных семей в возрасте от 1,5 месяцев до 16 лет. Контрольную группу составили 60 здоровых детей. Генотипирование мутаций (CFTR dele2,3(21kb), CFTR_F508del, CFTR_G542X, CFTR_W1282X, CFTR_N1303K, CFTR_2143delT, CFTR_2184insA, CFTR_3849+10kbC > T) осуществлялось методом RT-PCR с использованием реагентов «НПО ДНК-Технология» и «Синтол» (г.Москва, РФ), анализ кривых плавления и по «конечной точке», качественный анализ. Материал для исследования: Периферическая кровь. Выделение ДНК из лейкоцитов венозной крови человека проводилось модифицированным спиртово-солевым методом.

Статистический анализ данных проводили при помощи программы R и Statgraphics Plus 5,0. Были изучены 8 наиболее частых мутаций гена CFTR ассоциированных с муковисцидозом. Анализ генетической ассоциации гена *CFTR* на модели «случай–контроль» показал, что среди детей с муковисцидозом наиболее частой и достоверной была мутация CFTR_F508del, с показателем OR = 13,73 при p = 0,001. Другой рисковой мутацией была установлена CFTR_N1303K: OR = 14,18 при p = 0,01. Остальные шесть мутаций выявлены не были ни в одном случае. Таким образом, показана достоверная роль 2-х мутаций гена *CFTR* в развитии муковисцидоза.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЯ ПИЩЕВОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВОМ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Черевко Н.А.[1], Скирневская А.В.[1], Березовская К.В.[3], Муравейник О.А.[3], Новиков П.С.[1], Кондаков С.Э.[2], Розенштейин М.Ю.[4], Розенштейн А.З.[4], Резапов Б.Р.[4]

[1] Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Томск, Россия
[2] Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[3] МО Центр семейной медицины, Томск, Россия
[4] ImmunoHealth-РУС, Москва, Россия

Введение. Аутизм – это многофакторное неинфекционное заболевание, нарастающее по частоте в современной популяции, не зависимо от регионов и континентов проживания, в 2015 г. в мире каждому 68 ребенку диагностировался аутизм. Очевидно, что развитие патологий нервной системы и в частности, аутизма, связано с дисбалансом про – и противовоспалительных цитокинов иммунного ответа в результате внутриутробных инфекций, аллергических заболеваний матерей, особенностей врожденного и адаптивного иммунитета у детей в частности по отношению к пищевым антигенам (пАГ) в ранний постнатальный период (4-6 мес.) формирования пищевой толерантности (ПТ) и дальнейшего ее поддержания. ПТ неразрывно связанна с особенностями микробиома и иммунной системой кишечника. С одной стороны процесс ПТ генетически детерминирован, с другой – в окружение современного изменяющегося пищевого пристрастия человека, ПТ представляет активный иммунологический процесс, обеспечивая поддержание «постоянства своего» за счет контроля за пАГ, посредством элиминации последних эффекторными механизмами фагоцитоза, IgG и IgE опосредованными реакциями ГНТ и ГЗТ. Данное состояние может инициировать и поддерживать дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов, активировать эпигенетические механизмы регуляции генома, участвующие в развитии многофакторных заболеваний, в том числе аутизма.

Цель. Исследовать иммунологические особенности толерантности к пищевым антигенам в корреляции с цитокиновым профилем и тяжестью клинических проявлений детей с диагностированным РАС. Задачи вытекали из поставленной цели.

Материалы и методы. Исследуемый материал: венозная кровь и сыворотка детей с РАС (n = 40, контроль n = 20 возраст 7±2 года). Оценивали: формулу крови, СРБ, ферритин, интерлейкины 4,6,10,17 и интерферон γ. Диагностику нарушений иммунологической толерантности к 111 тестируемым пищевым АГ(пАГ), распределенным по кластерам, проводили на основе многокомпонентного ИФА с использованием методологии, разработанной компанией «Иммунохелс», позволяющей на основании теории статистических методов обработки, определить индивидуальный критерий «норма-патология» на основе исследования вида функции распределения плотности вероятности IgG-иммунных откликов по шкале измерений. Маркером являлась концентрация специфических иммуноглобулинов G (sIgG) к конкретному пАГ. Использовалась величина ΔIgG, позволяющая оценить интенсивность иммунной реакции на пАГ, (ΔIgG = IgGi–IgGin, где IgGi – концентрация sIgG в сыворотке пациента i, IgGin – индивидуальная норма пациента i). Для оценки физического и психического развития использовали специализированную анкету ATEC (bernard Rimland and Stephen M. Edelson of the Autism Research Institute) – балльный тест от 0 (норма) до 178 баллов (глубокий аутизм). Статистическая обработка данных проводили с помощью программного пакета SPSS Statistics 17.0; использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Сравнение качественных данных проводили с помощью критерия Фишера. Оценка риска (Odds Ratio) произведена по формуле Д. Альтмана (1991 г.).

Результаты. Выявлены особенности повышенных событий частоты встречаемости гиперпродукции sIgG к пАГ, отражающий механизмы нарушения ПТ: злаков, молочных продуктов, бобовых и пасленовых. Установлена высокая частота встречаемости дрожжевой сенсибилизации, в частности к пекарским дрожжам, к грибам *Candida alb*. Выявлена корреляция между повышенной концентрацией в сыворотке IL-6 и IL-17 с количественными характеристиками специфической гиперчувствительности (сГЧ)- ΔIgG к пАГ злаков и пАГ молочного кластера. Установлено, что в группе детей с РАС как средние, так и максимальные значения величин ΔIgG, специфичных к АГ глютена, белков пшена, ржи и овса статистически значимо выше, чем в группе относительно здоровых детей. Шанс развития симптомов аутизма у детей с нарушенной пищевой толерантностью к пАГ овса в 14,3 раз выше по сравнению с детьми без сГЧ к продуктам, содержащих овес (OR = 14,3; 1,6-127,2; $p < 0,05$). С увеличением значения ΔIgG к пАГ белков пшеницы увеличивалась СОЭ и концентрация СРБ в сыворотке крови (rho = 0,315 и 0,420 соответственно), повышение тиреотропного гормона. Обнаружено, что в группе детей с РАС среднее значение sΔIgG к казеину в 6 раз выше, чем в контрольной группе. Установлена статистически значимая прямая корреляционная связь между количеством баллов, полученных при прохождении теста «ATEC» детьми с РАС, и количеством молочных продуктов, к пАГ которых наблюдалась сГЧ (rho = 0,421), а также с величиной ΔIgG, специфичных к пАГ творога (rho = 0,424), плавленого сыра (rho = 0,406), йогурта (rho = 0,379), казеина (rho = 0,456). Выявлена обратная корреляционная связь между величиной ΔIgG, Candida alb. и концентрацией ферритина в сыворотке крови (коэффициент корреляции Спирмена rho = -0,435).

Таким образом, у детей с РАС имеют место иммунологические признаки воспаления, связанные с ролью пищевого антигена и показателями теста ATEC.

СОДЕРЖАНИЕ СЕКРЕТОРНОГО IgA В КОПРОФИЛЬТРАТАХ У ДЕТЕЙ С ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА В ДИНАМИКЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА

Шамова К.П., Устьянцева Л.С.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

Значительную роль в защите ребенка от различных патогенов играет секреторный IgA. Секреторный IgA (sIgA) нейтрализует вирусы, вызывает агглютинацию, нарушает рост бактерий и тромозит их подвижность. Кроме того, он препятствует адгезии бактерий к клеткам эпителия

слизистой оболочки, способствует росту роста индигенной флоры (у младенцев – преимущественно бифидобактерий), препятствует росту условно-патогенной микрофлоры. О количестве IgA, синтезируемого в кишечнике, чаще всего судят по его уровню в копрофильтратах. Выработка (sIgA) зависит от таких факторов как грудное молоко и характер микробной колонизации.

Цель. Оценить содержание секреторного IgA в копрофильтратах недоношенных детей с экстремально низкой массой тела и здоровых доношенных новорожденных в динамике постнатального периода.

Материалы и методы. Проведено иммунологическое обследование 103 новорожденных, из них: 1-я группа – 42 ребенка с ЭНМТ, родившихся на 22-27 неделе гестации, 2-я группа – 43 ребенка с ЭНМТ, родившихся на 28-31 неделе гестации. Группу сравнения (3-ю группу) составили 18 доношенных новорожденных (обследовались только на 5 сутки). Содержание sIgA определяли с помощью коммерческих тест-систем – Immundiagnostik (Германия). Исследование крови проводили на 5-7 сутки, в 1 месяц жизни и по достижению постконцептуального возраста 38-40 недель. Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel и Statistica 6. Данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, $Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$). Сравнение количественных признаков проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. Уровень значимости (p) с учетом поправки Бонферрони принимали равным 0,017.

Результаты. Сразу после рождения все доношенные новорожденные прикладывались к груди матери. Дети с ЭНМТ на 5 сутки жизни энтерально получали молозиво (50% и 23% в 1-й и 2-й группах). В возрасте 30 суток практически половина детей обеих групп (44% и 63,6%) получали грудное молоко. К возрасту доношенного ребенка в 36,5% и 34% случаев новорожденные с ЭНМТ находились исключительно на грудном вскармливании. Остальная часть детей – на смешанном или искусственном. На 5-7 сутки у 70% детей с ЭНМТ микрофлора в кишечнике отсутствовала. Напротив, к месячному возрасту у 70% детей с ЭНМТ кишечник был колонизирован, кишечная микробиота в большинстве случаев была представлена грамположительными микроорганизмами (в 31,5% и 32,5% случаев). По достижению возраста 38-40 недель в 100% и 76% случаев у детей 1-й и 2-й групп отмечалось наличие кишечной микрофлоры, в этот период жизни кокковая микрофлора вытеснялась грамотрицательными бактериями (в 62% и 40% случаев). При исследовании sIgA у всех детей с ЭНМТ на 5-7 сутки жизни обнаружено его повышенное содержание в копрофильтратах (8,69 (6,94-12,8) г/л и 12,67 (9,6-13,2) г/л против 0,2 (0,2-0,67) г/л $p_{1-3,\ 2-3}$ = 0,01) относительно аналогичных показателей группы сравнения. Статистически значимых различий между новорожденными основных групп не выявлено. По достижению возраста 30 суток, уровень sIgA в группах детей с ЭНМТ не изменялся (10,12 (3,56-10,92) г/л и 9,6 (6,76-10,23) г/л, в 1-й и 2-й группах, p_{1-2} = 0,051). К возрасту доношенного ребенка у детей 1-й группы содержание sIgA в копрофильтратах несколько снизилось (0,76 (0,17-9,85) г/л), а у детей 2-й группы сохранялось на высоком уровне 9,54 (4,42-10,88) г/л p_{1-2} = 0,051).

Заключение. У всех детей с ЭНМТ в течение неонатального периода отмечается повышенное содержание sIgA в копрофильтратах, что возможно обусловлено большим содержанием данного иммуноглобулина в молозиве и молоке женщин, родивших раньше срока. Снижение секреции sIgA у недоношенных детей меньшего гестационного возраста свидетельствует о неполноценном иммунном ответе на условно-патогенную микрофлору.

НАСЛЕДСТВЕННАЯ И ПРИОБРЕТЕННАЯ ТРОМБОФИЛИЯ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ГЛАЗНОГО ДНА

Шумилов П.В., Ильина А.Я., Мищенко А.Л., Шморгун Т.В., Баринова А.С., Ахалова Е.А., Целоева Х.И., Соловьева И.В., Харламова Т.С., Побединская О.С.

ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Введение. В настоящее время по данным литературы у новорожденных детей с тромбофилией в большом проценте случаев диагностируется гипоксически-ишемическое поражение ЦНС. В связи с этим у детей с различной формой тромбофилии оценка состояния глазного дна представляет собой клинический интерес для подтверждения различного генеза поражения ЦНС.

Цель. Оценка состояния глазного дна у новорожденных детей с наследственной тромбофилией и у детей с циркуляцией в кровотоке антифосфолипидных антител (АФА) и родившихся у женщин с антифосфолипидным синдромом (АФС).

Материалы и методы. Новорожденные дети с верифицированной наследственной тромбофилией и новорожденные дети с циркуляцией в кровотоке АФА и родившиеся у женщин с АФС.

Результаты. Нами проведен сравнительный анализ генетического анамнеза, оценка состояния здоровья и результатов офтальмоскопии у детей как с наследственной тромбофилией, так и у детей с циркуляцией в кровотоке АФА. Исследуемые группы: I группа – дети с наследственной тромбофилией (n = 30) и II группа – дети с циркуляцией АФА (n = 20). У детей I группы среди полиморфизмов генов преобладали: PAI-I – 86,7%, MTHFR и MTRR – по 66,7% соответственно, FXII и FXIII – по 63,3% соответственно, ITGA2 – 60% и FGB – 56,7%. У детей II группы, родившихся у женщин с верифицированным АФС, были определены в кровотоке АФА. По нашим данным у детей I группы достоверно чаще диагностировалась ишемия мозга (96,7% и 75% соответственно, $p < 0,01$). У детей обеих групп в достаточно высоком проценте случаев отмечались морфофункциональная незрелость (43,3% и 60% соответственно) и коньюгационная желтуха (36,6% и 40% соответственно). Также практически у каждого второго ребенка с наследственной тромбофилией были диагностированы функциональные нарушения ЖКТ (46,7%). Изменения со стороны глазного дна были выявлены у 100% детей I группы и у 80% детей II группы. При оценке результатов офтальмоскопии было констатировано, что у детей I группы по сравнению с детьми II группы достоверно чаще отмечалось венозное полнокровие (100% и 50% соответственно, $p < 0,01$), а также извитость артерий (83,3% и 20% соответственно, $p < 0,01$). Тогда как спазм артерий в достаточно высоком

проценте случаев был констатирован у детей обеих групп (63,3% и 60% соответственно). Необходимо отметить, что у детей II группы достоверно чаще отмечалась экскавация диска зрительного нерва по сравнению с детьми I группы (30% и 6,7% соответственно, $p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, для новорожденных детей при оценке состояния здоровья независимо от формы тромбофилии было характерно, во-первых, ГИП ЦНС, причем достоверно чаще у детей с наследственной тромбофилией, а во-вторых, МФН и коньюгационная желтуха. Особенностью состояния глазного дна у детей с наследственной тромбофилией на фоне ГИП ЦНС (96,7%), коньюгационной желтухи (36,6%), морфофункциональной незрелости (43,3%) и функциональных нарушений ЖКТ (46,7%) патогномоничными были венозное полнокровие (100%) и извитость артерий (83,3%). В то же время для детей с цирк АФА на фоне ГИП ЦНС (75%), морфофункциональной незрелости (60%) и с коньюгационной желтухи (40%) патогномоничной была экскавация диска зрительного нерва (30%). Поэтому данные изменения состояния глазного дна можно рассматривать, с одной стороны, как офтальмоскопический эквивалент различных форм тромбофилии у новорожденных детей, а с другой стороны, как метод, верифицирующий ГИП ЦНС у детей с тромбофилией.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА

Александров А.В., Шилова Л.Н., Алехина И.Ю., Александрова Н.В., Емельянов Н.Н., Бенедицкая Е.В., Емельянова О.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии», Волгоград, Россия

Введение. Изучение воспалительных ревматических заболеваний (РЗ) привело к раскрытию важной роли ферментов антиоксидантной системы (АОС) и пуринового метаболизма (ПМ) в патогенезе системной красной волчанки (СКВ) и ревматоидного артрита (РА). Образование аутоантител (Ат) к аутоантигенным структурам, в том числе и ферментам, в результате свободнорадикальных реакций может являться одной из возможных причин развития функциональной недостаточности энзимов при данных патологиях. Расширение спектра Ат при РЗ возможно при переводе растворимых ферментов в нерастворимую форму с сохранением их биологических свойств.

Цель и задачи. Изучение влияния метода эмульсионной полимеризации на растворимые биополимеры (ферменты АОС и ПМ) для использования их в качестве антигенной матрицы при создании антигенных наносистем (АНС).

Материалы и методы. В качестве антигенов использовали коммерческие препараты (Sigma, США) основных ферментов АОС и ПМ: супероксиддисмутаза (СОД, Cat. № S 9636), глутатионредуктаза (ГР, Cat. № G 3664), каталаза (Кат, Cat. № C 3556), ксантиноксидаза (КО, Cat. № X 2252), а также аденозиндезаминаза (АДА, Cat. № A 5043), 5'-нуклеотидаза (5-НТ, Cat. № N 5880), пуриннуклеозидфосфорилаза (ПНФ, Cat. № N 3514), гуаниндезаминаза (ГДА, Cat. № G 5752). АНС с иммобилизированным в их структуру антигеном (ферментом) получали методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота (Гонтарь И.П. и соавт., 2002 г.).

Результаты. Получены АНС, представляющие собой двойные полиакриламидные гранулы правильной сферической формы с размером частиц от 10 до 100 мкм и средним диаметром гранул 55±6,8 мкм (при соотношении полимерный носитель: железо 2:1, в пересчете на сухую массу). Процедура иммобилизации ферментов не вызывала изменения их биологических свойств (различия во всех случаях недостоверны, $p < 0,05$) (см. табл.).

Следует отметить, что включение фермента в пространственную решетку полиакриламидного геля, составляющего основу АНС, (иммобилизированная форма) придает антигену (ферменту) новые свойства, благодаря которым он приобретает определенные преимущества перед растворимой формой. Такой метод приводит к возникновению незначительных конформационных изменений, сохраняющих активность фермента, но, в то же время, способствующих, например, экспрессии гидрофобных участков молекулы энзима, содержащих «скрытые эпитопы». Данное обстоятельство способно оказать существенное влияние на повышение чувствительности иммуноферментного метода при определении антител к ферментам в сыворотке крови больных РЗ. Кроме того, полученные нерастворимые формы антигенов (энзимов) возможно адаптировать для определения антител к растворимым энзимам с помощью метода непрямой иммунофлюоресции с использованием коммерческих люминесцирующих сывороток.

Заключение. Перевод растворимых биополимеров (энзимов АОС и ПМ) в нерастворимую форму методом эмульсионной полимеризации позволяет сохранить их биологические свойства и делает АНС универсальными для использования в различных иммунологических методах диагностики РЗ.

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ (К ТЕЗИСАМ АЛЕКСАНДРОВА А.В. И ДР.)

Фермент	Ферментативная активность	
	Иммобилизированная форма	Растворимая форма
СОД, Ед	37,64±0,12	38,06±0,72
ГР, Ед	120,1±0,83	122,4±0,79
КАТ, мКАТ/л	25,15±3,97	24,42±4,06
КО, мкмоль/л/мин	4,06±2,65	3,92±2,74
АДА, Ед/мл	58,19±5,22	59,47±4,91
5'-НТ, ЕД/л	38,69±4,12	41,85±5,44
ПНФ, мкмоль/л/мин	20,99±2,82	22,14±2,71
ГДА, МЕ/л	27,55±3,67	28,17±3,46

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Вавилов Н.В.[1], Шилов Ю.И.[1, 2]

[1] ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, Пермь, Россия
[2] ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Введение. Одна из важнейших функций клеток системы мононуклеарных фагоцитов – удаление биологического «мусора», в частности окисленных белков (Garibaldi S. et al., 2017). Окислительная модификация белков (ОМБ) – одно из основных последствий протекания свободно-радикального окисления в живых системах, опосредованное воздействием активных форм кислорода и реактивных форм азота. ОМБ могут не только активировать процессы воспаления при атеросклерозе и хронических заболеваниях почек, но и регулировать дифференцировку макрофагов (Garibaldi S. et al., 2017). Для изучения этих механизмов нами модифицирован один из распространенных методов для определения ОМБ (Reznick A.Z., Packer L., 1994), который был адаптирован для современных планшетных спектрофотометров.

Цель. Усовершенствование метода оценки окислительной модификации белков и его адаптация для планшетных спектрофотометров.

Материалы и методы. Исследовали сыворотку периферической крови 10 практически здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 19 до 23 лет. Сущность модификации метода заключалась в пропорциональном уменьшении объемов реагентов, замене некоторых реактивов на сходные по физико-химическим свойствам. Так, этилацетат как растворитель гидрофобных соединений заменён на ацетон, 6М раствор гуанидина гидрохлорида как растворитель денатурированного белка – на 8М раствор мочевины. Концентрация соляной кислоты для растворения 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) снижена с 2,5М на 1М раствор, так как ДНФГ хорошо растворяется в 1М растворе соляной кислоты. Не проводили второе отмывание осадка 10% раствором ТХУ, так как уже после первого осаждения 20% раствором ТХУ осадок приобретает нужную консистенцию. Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного спектрофотометра (PowerWave BioTEK Instruments, Inc., USA) с кварцевым 96-луночным планшетом (black quartz microplate with 96 wells, Hellma, USA). В две микропробирки типа Эппендорф вносили по 200 мкл сыворотки крови. Далее в пробирку с опытной пробой добавляли 400 мкл 0,1М раствора ДНФГ, а в контрольную – 400 мкл растворителя ДНФГ (1М раствор HCl). Пробирки оставляли на 1 ч при комнатной температуре в темноте. Затем в каждую пробирку добавляли 600 мкл 20% раствора ТХУ (m/V). Пробы инкубировали в течение 10 мин на льду и центрифугировали в течение 10 мин для осаждения белковых преципитатов. Супернатант удаляли. Пробы трижды промывали 400 мкл раствора этанол/ацетон (1:1) (V/V) для удаления не связавшегося ДНФГ и примеси липидов. Осадок высушивали в течение 12-18 ч. Далее осадок растворяли в 400 мкл 8М раствора мочевины. Образовавшиеся 2,4–динитрофенилгидразоны (ДНФ) регистрировали при следующих длинах волн: при 370 нм – нейтральные кетон-ДНФ (кДНФн), при 430 нм – основные кетон-ДНФ (кДНФо) и при 530 нм – нейтральные альдегид-ДНФ (аДНФн). Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мг общего белка сыворотки, который определяли микробиуретовым методом. Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и t-критерия Стьюдента для парных данных.

Результаты. В ходе исследований установлено, что уровень кДНФн сыворотки крови здоровых доноров составляет 1,24±0,15 нмоль/мг белка, что соответствует результатам, полученным как в классическом варианте реакции, так и данным литературы. Уровень кДНФо составляет 0,74±0,11 нмоль/мг белка, а аДНФн – 0,37±0,07 нмоль/мг белка. Таким образом, суммарная концентрация окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров составляет 2,35±0,11 нмоль/мг белка. Выявлено, что на долю аДНФн приходится 16%, на долю кДНФо – 31,5%, на долю кДНФн – 52,5% окисленных белков. Соотношение окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров аДНФн:кДНФо:кДНФн составляет 1:2:3,3.

Заключение. Таким образом, результаты, полученные с помощью предложенной в настоящей работе модификации метода, соответствуют классическому варианту метода.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ

Жоголев К.Д., Журкин М.А., Рубова С.Р., Жоголев С.Д., Харитонов М.А., Сбойчаков В.Б., Клецко Л.И., Андреев В.А., Азаров И.И., Аминев Р.М., Котов С.С., Горенчук А.Н., Жоголев Д.К., Удальцов О.Е.

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

Цель. Определить частоту встречаемости агентов различной природы при внебольничных пневмониях у военнослужащих иммунологическими и молекулярно-генетическими методами.

Материалы и методы. Помимо классического бактериологического метода, с помощью которого в мокроте определяются агенты только бактериальной природы, применяли метод иммуноферментного анализа, позволяющий определять концентрацию антител к респираторным вирусам (аденовирусам, РС-вирусам, вирусам гриппа А и В) и атипичным возбудителям (микоплазмам, хламидиям, легионеллам) в сыворотке крови, а также применяли иммунохроматографические экспресс-тесты для выявления вирусных агентов из мокроты и молекулярно-генетический метод – полимеразную цепную реакцию (ПЦР), позволяющую выявлять в плазме крови и мокроте фрагменты ДНК/РНК (антигены) как классических, так и атипичных возбудителей и агентов вирусной природы. Обследовано 150 больных внебольничной пневмонией военнослужащих по призыву в возрасте 18-22 года.

Результаты. По обобщенным данным из возбудителей бактериальной природы преобладали пневмококки, обнаруженные у 24,1% больных пневмонией. Гемофильная палочка выявлена у 8,3 %, золотистый стафиллококк – у 6,5%, клебсиелла – у 3,7% больных. Из атипичных возбудителей часто выявлялись микоплазмы – в 21,3% случаев и в 2 раза реже – хламидии – в 10,2% случаев. Также были выявлены возбудители нозокомиальной инфекции:

синегнойная палочка – в 7,4%, ацинетобактер – в 5,6% случаев. Из агентов вирусной природы преобладали аденовирусы, определяемые у 51,9 % больных. РС-вирусы были обнаружены в 34,3%, вирус гриппа А – в 16,7%, вирус гриппа В – в 2,8% случаев. Подавляющее большинство пневмоний (75 %) имели вирусно-бактериальную этиологию.

Заключение. Применение метода иммуноферментного анализа, иммунохроматографических экспресс-тестов и ПЦР-диагностики наряду с классическим бактериологическим методом позволяет значительно увеличить полноту выявляемости возбудителей пневмоний, определять помимо классических агентов бактериальной природы атипичные возбудители и вирусы. С помощью этих методик установлено преимущественно вирусно-бактериальная природа внебольничных пневмоний у военнослужащих, что необходимо учитывать как при лечении, назначая в этих случаях наряду с антибиотиками противовирусные средства, так и при медикаментозной профилактике (вместе с пневмококковой вакциной следует применять противогриппозную вакцину, противовирусные и иммунотропные средства).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАЛЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО МЕТОДА SmartFlare

Капитанова К.С.[1, 2], Закиров Р.Ш.[3], Топтыгина А.П.[1, 2]

[1] ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Министерства образования и науки РФ, Москва, Россия
[3] ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Субпопуляция $CD3^+CD4^+$, называемая Т-хелперы (Th), опосредует иммунный ответ, участвуя и регулируя все реакции адаптивного и почти все реакции врожденного иммунитета. К настоящему моменту охарактеризованы следующие субпопуляции Т-хелперов: Th1, Th2, Th17, фолликулярные Т хелперы (Tfh) и регуляторные Т-клетки (Treg). Существует несколько способов идентификации этих субпопуляций, но наиболее эффективным критерием считается маркирование их по наличию главных транскрипционных факторов, мастер-регуляторов дифференцировки соответствующих субпопуляций: T-bet для Th1, GATA-3 для Th2, Bcl-6 для Tfh, RORC2 для Th17 и FoxP3 для Treg. Методические особенности метода SmartFlare позволяют осуществлять работу с живыми клетками, отслеживая динамику синтеза мРНК соответствующего транскрипционного фактора по накоплению флуоресцентной метки в каждой клетке индивидуально, а также использовать эти клетки в последующих экспериментах.

Цель. Совершенствование методов идентификации субпопуляций Т-хелперов на основе технологии SmartFlare для изучения механизмов формирования иммунного ответа у человека.

На лимфоцитах периферической крови (ЛПК), выделенных с помощью градиентного центрифугирования от 10 детей (5 мальчиков и 5 девочек) в возрасте от 4 до 10 лет с диагнозом атопический дерматит, лабораторно подтвержденном наличием высокого уровня IgE и специфических антител к пищевым и бытовым аллергенам (основная группа), и 10 здоровых детей того же возраста (контрольная группа) на проточном цитофлуориметре CantooII (BD Biosciences. США) определяли субпопуляции $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов в комбинациях: Th2-$CD4^+CD294^+$, Th17-$CD4^+CD45R0^+CD161^+$, Treg-$CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$, Tfh-$CD4^+CXCR5^+$, выражая в процентах от гейта $CD3^+CD4^+$. Одновременно на этом же цитофлуориметре с помощью зондов SmartFlare определяли количество клеток, экспрессирующих мРНК для GATA-3(Th2), Bcl-6 (Tfh), RORC2 (Th17) и FoxP3 (Treg), для чего ЛПК культивировали при 37 °С во влажной атмосфере и 5% CO_2 в 96-луночных панелях в среде RPMI-1640 с глютамином и добавлением гентамицина и 10% FCS в присутствии и без 5 мкг/мл ФГА. Время инкубации варьировало от 16 до 40 часов. В лунки добавляли разведения Scramble-отрицательный контроль или Uptake-положительный контроль, меченые флуорохромами Cy3 или Cy5 или один из целевых зондов GATA-3, FoxP3, RORC2, BCL-6, постановку осуществляли в триплетах.

Показано, что технология SmartFlare позволяет выявлять мРНК транскрипционных регуляторов основных субпопуляций $CD4^+$ в живых лимфоцитах. Флуорохром Cy5 лучше детектируется на проточных цитометрах на канале FL4-APC, тогда как Cy3 – на канале FL2-PE, но сигнал слабее, чем у Cy5. Оптимальное время инкубации для лимфоцитов – 24 часа. При оценке субпопуляций $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов по поверхностным маркерам у детей с атопическим дерматитом выявлено значимое снижение уровня Treg и Th17 и повышение уровня Th2 лимфоцитов ($p < 0,05$), а уровень Tfh не отличался от группы здорового контроля. При оценке субпопуляций по уровню мРНК методом SmartFlare обнаружено значимое снижение процента лимфоцитов, экспрессирующих мРНК GATA3, FoxP3 и Bcl6 ($p < 0,05$), а уровень экспрессии мРНК RORC2 не отличался от здоровой группы.

Таким образом, удалось показать, что метод SmartFlare пригоден для выявления мРНК транскрипционных факторов основных субпопуляций $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов и позволяет более детально исследовать иммунопатогенез заболеваний.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ IgG К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Кормщикова Е.С.[1], Парамонов И.В.[1], Рылов А.В.[1], Кудашева Э.Ю.[2]

[1] ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России», Киров, Россия
[2] ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Вопросы диагностики клещевого энцефалита (КЭ) актуальны на сегодняшний день в связи с расширением ареала вируса КЭ и ухудшением эпидемиологической обстановки за счет неуклонного роста заболеваемости среди не привитого и не получавшего экстренной профилакти-

ки при укусах клеща городского населения. Определение содержания антител IgG к вирусу КЭ с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) широко практикуется в настоящее время не только для диагностики инфекции и оценки эффективности проведенной профилактической вакцинации, но и скрининга субстанции для получения препаратов иммуноглобулинов человека против КЭ и контроля их специфической активности. Известно, что именно антитела IgG, вырабатываемые организмом человека в ответ на гликопротеин gE вируса КЭ, обладают протективным эффектом в борьбе с инфекцией и определение их содержания имеет наибольшую диагностическую ценность. В результате анализа коммерческих тест-систем для ИФА, разрешенных к применению в практике здравоохранения РФ, установлено, что при их изготовлении в качестве модельных антигенов используют как вирусные частицы, полученные культуральным методом, так и выделенный gE или его рекомбинантные фрагменты, при этом отечественные производители конструируют тест-системы на основе дальневосточных тест-штаммов вируса КЭ («Софьин» и «205»), а зарубежные – западных («Neudoerfl» и «K-23»). Существенно отличаются и предлагаемые способы интерпретации результатов с использованием диагностических наборов разных производителей.

Цель. Проведение сравнительного анализа результатов количественного определения содержания антител IgG к вирус КЭ в образцах сыворотки и препаратов иммуноглобулина человека, полученных с использованием нескольких тест-систем для ИФА.

Материалы и методы. Объектами исследования служили образцы сыворотки крови здоровых доноров и серии препаратов иммуноглобулинов человека против КЭ (ФГУП НПО «Микроген», ГБУЗ «Челябинская ОСПК»). В работе использовали наборы реагентов «ВектоВКЭ-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), «ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-G» (НПО «Диагностические системы», Россия), NovaLISA TBE/FSME IgG (NovaTec Immundiagnostica, Германия). Обработку результатов исследования проводили в программах «ПАРАЛАЙН» (ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения РФ), Statistica ver. 12 (StatSoft, Inc.) при доверительной вероятности 95%.

Результаты и обсуждение. Согласно инструкциям по применению содержание IgG к вирусу КЭ выражают в Е/мл («ВектоВКЭ-IgG»), титрах («ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-G») и NTU/ml (NovaLISA TBE/FSME IgG), что не позволяет сопоставить результаты определения. Поэтому для получения адекватных данных для проведения сравнительного анализа количественное определение IgG к вирусу КЭ в исследуемых пробах осуществляли методом сравнения с референсным образцом (РО). В качестве РО использовали экспериментальный образец иммуноглобулина человека с активностью антител к вирусу КЭ 1:80 в реакции торможения гемагглютинации, выделенный из плазмы крови доноров, иммунизированных вакциной КЭ (ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Россия). Для реализации метода на иммунологическом планшете готовили серии разведений РО и исследуемых проб. Данные регистрации оптической плотности для каждого образца обрабатывали в сравнении с результатами для РО. Такой подход позволил рассчитать эквивалент единиц измерения содержания антител IgG к вирусу КЭ, выраженный в коэффициентах активности (K_a), благодаря чему стало возможным сопоставить результаты ИФА, полученных с использованием наборов реагентов разных производителей. Значения K_a для образцов сыворотки варьировали от 0,4 до 1,2, для препаратов – от 1,2 до 1,7. Сравнение K_a для одного образца на разных тест-системах не выявило значимых различий ($p_{min} = 0, 641 > 0,05$).

Заключение. Результаты исследования позволяют сделать вывод, что для получения статистически достоверных статистически результатов количественного определения содержания антител IgG к вирусу КЭ методом ИФА с использованием диагностических наборов разных производителей необходимо обязательно использовать референсный образец.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ БОЛЬНЫХ АКАНТОЛИТИЧЕСКОЙ ПУЗЫРЧАТКОЙ

Кубанов А.А., Абрамова Т.В.

ФГБОУ ДПО ««Российская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Акантолитическая пузырчатка – тяжелый аутоиммунный буллезный дерматоз, характеризующийся поражением кожи и/или слизистых оболочек. Ведущая роль в патогенезе пузырчатки отводится аутоиммунным реакциям, приводящим к акантолизу. При первичном обращении за медицинской помощью больных диагноз пузырчатки устанавливается лишь в 9-30% случаев. Частота диагностических ошибок особенно высока при изолированном поражении слизистой оболочки рта или ограниченных высыпаниях на коже. К тому же, существующие методы диагностики пузырчатки имеют свои преимущества и недостатки, но ни один из них в отдельности не обладает 100% чувствительностью и специфичностью, а низкоспецифичные методы сопровождаются большим числом ложноположительных результатов

Цель. Изучить диагностическую значимость клинических и лабораторных методов исследования при обследовании больных акантолитической пузырчаткой.

Материалы и методы. В исследование включено 132 больных акантолитической пузырчаткой, у которых проведено клинико-лабораторное обследование: клиническое исследование с выявлением вялых пузырей и/или эрозий на коже и/или слизистых оболочках у 132 больных пузырчаткой; определение симптома Никольского у 132 больных пузырчаткой; выявление акантолитических клеток Тцанка в мазках-отпечатках со дна эрозий у 132 больных пузырчаткой при цитологическом исследовании; определение акантолиза в биоптатах кожи у 122 больных пузырчаткой при патоморфологическом исследовании; выявление фиксации иммуноглобулинов G в межклеточных промежутках эпидермиса у 111 больных пузырчаткой методом реакции иммунофрлюоресценции (РИФ) с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии; определение антител к десмоглеинам (Dsg) 1 и 3 типов в крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) 119 больных пузырчаткой. Контрольную группу составляли 100 здоровых лиц.

Сравнение результатов обследования больных пузырчаткой клиническими и лабораторными методами исследования проводили путем оценки диагностической эффективности лабораторных методов исследовании (ГОСТ Р 53022.3-2008).

Результаты. Высокая диагностическая значимость при обследовании больных акантолитической пузыр-

чаткой установлена для реакции иммунофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (диагностическая чувствительность = 97,3%; диагностическая чувствительность = 100,0%; диагностическая эффективность = 98,6%; предсказательная ценность положительных результатов = 100,0%; предсказательная ценность отрицательных результатов = 97,1%) Приемлемой эффективностью (диагностическая эффективность в диапазоне 80-90%) обладали: клинический метод – симптом Никольского и лабораторный – патоморфологический метод (81,9% и 86,9% соответственно). Низкая эффективность (показатель диагностической эффективности менее 79%) установлена у цитологического (76,9%), ИФА с определением антител к десмоглеинам 1 и 3 типов (75,7%) методов исследований. У метода визуального клинического обследования показатель был на уровне только 51,3%.

Заключение. Для дифференциальной диагностики акантолитической пузырчатки необходимо проведение клинических обследований, а также лабораторных методов исследований: цитологического, гистологического, иммуноферментного анализа. Рекомендуется исследование биоптатов кожи методом реакции иммунофлюоресценции с использованием *ex vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для установления фиксации специфических иммуноглобулинов в коже, что позволит повысить качество диагностики и назначать адекватную терапию больным пузырчаткой.

ИММУНОРЕГУЛЯЦИЯ ГАСТРИТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Матвеева Л.В., Мосина Л.М., Капкаева Р.Х.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

Введение. Воспалительный процесс в слизистой оболочке желудка (СОЖ) может становиться хроническим и приводить к атрофии, мета- и дисплазии желудочного эпителия в условиях иммунного дисбаланса.

Цель. Определить клеточно-цитокиновые изменения при обострении хронического гастрита.

Материалы и методы. Обследовали при информированном согласии 40 здоровых добровольцев – контрольная группа, 42 пациента с хроническим неатрофическим гастритом – 1-я группа, 40 больных очагово-атрофическим (I–II ст.) гастритом – 2-я, 40 больных распространенным атрофическим (III–IV ст.) гастритом – 3-я группа. Диагноз подтверждали при гистологическом исследовании гастробиоптатов. Забор крови для исследования проводили при первичном обращении до проведения лечения натощак из локтевой вены в объеме 3 мл в пробирку с ЭДТА, 3 мл – в сухую стерильную пробирку, сыворотку отделяли центрифугированием. Иммунофенотип лимфоцитов по CD-антигенам определяли иммунофлюоресцентным методом. Исследовали сывороточные уровни IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IFNγ иммуноферментным методом с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Результаты статистически обработали.

Результаты. Относительное количество $CD3^+$ лимфоцитов у больных 1-й группы при сравнении с данными здоровых лиц проявляло тенденцию к увеличению, 2-й и 3-й групп – повышалось. Абсолютные значения $CD3^+$ клеток у больных очагово-атрофическим гастритом были большими, чем при обострении неатрофического гастрита. Относительное количество $CD4^+$-лимфоцитов у больных превышало значения здоровых лиц, а при неатрофическом гастрите – и значения 3-й группы. У больных хроническим атрофическим гастритом количество $CD8^+$ лимфоцитов статистически значимо превышало значения контрольной и 1-й групп. Отношение $CD4^+/CD8^+$ в 1-й группе превышало значения контрольной и 3-й групп, соответствуя индивидуальным изменениям Т-лимфоцитов с хелперной и цитотоксической активностью. Численность $CD16^+$ клеток в крови больных превышала значения здоровых лиц и возрастала с увеличением стадии атрофии СОЖ. Относительное и абсолютное количество $CD19^+$ лимфоцитов во всех группах больных было меньше значений контрольной группы, что характерно для активного воспалительного процесса.

У больных сывороточный уровень IL-1β повышался относительно средних значений здоровых лиц: в 1-й группе – на 169,3%, во 2-й – на 136,5%. Уровень IL-2 превышал значения контрольной группы во всех группах больных, у пациентов с распространенным атрофическим гастритом был больше средних цифр больных неатрофическим гастритом на 169,9% и значений больных очагово-атрофическим гастритом на 117,2%. Количество IL-4 превышало средние значения контрольной группы в 1-й группе на 76,4%, во 2-й – на 119,2%, в 3-й – на 128,4%. Сывороточный уровень IL-6 у больных был выше средних значений здоровых лиц: в 1-й группе – на 64,5%, во 2-й – на 78,1%, в 3-й – на 35,7%. Количество IL-8 статистически значимо превышало средние значения контрольной группы в 1-й и 2-й группах. Сывороточный уровень IL-10 у больных достоверно не отличался от значений контрольной группы: в 1-й группе увеличивался на 17,3%, во 2-й – на 3,9%, в 3-й группе – на 25,1%. Количество IL-17 в сыворотке больных достоверно повышалось относительно средних значений контрольной группы во всех группах сравнения. Сывороточный уровень IL-18 у обследованных пациентов повышался относительно средних значений контрольной группы в 1-й группе на 23,2%, во 2-й и 3-й группах – на 40,5 и 58,9 % соответственно. Концентрация IFNγ в сыворотке крови больных превышала значения клинически здоровых лиц: в 1-й группе – на 256%, во 2-й – на 154,8%, в 3-й – на 222%.

Заключение. При обострении неатрофического гастрита повышение количества $CD4^+$ и $CD16^+$ клеток, уровня IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, IFNγ сочеталось с уменьшением численности $CD8^+$ и $CD19^+$ лимфоцитов. У больных хроническим очагово-атрофическим и распространенным атрофическим гастритом в стадии обострения определялись увеличение количества $CD3^+$ лимфоцитов, $CD4^+$, $CD8^+$, и $CD16^+$ клеток, IL-2, IL-4, снижение содержания $CD19^+$ лимфоцитов. Количество IL-10 в фазе обострения воспалительного процесса минимально, нарастало при прогрессировании атрофии СОЖ и уменьшении степени воспаления, ограничивая действие провоспалительных цитокинов и, возможно, усиливая репарацию слизистой.

СПОСОБЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДКА

Матвеева Л.В., Мосина Л.М., Капкаева Р.Х.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

Введение. Несоблюдение режима и качества питания, частые стрессы, прием ряда лекарственных средств, вредные привычки способствуют развитию и хронизации заболеваний желудка, создают условия для онкотрансформации желудочного эпителия.

Цель. Разработать способы иммунодиагностики заболеваний желудка.

Материалы и методы. При получении информированного согласия обследовали 70 больных с обострением хронического гастрита в возрасте 21–75 лет, из них 10 пациентов с катаральным гастритом, 60 пациентов с атрофическим гастритом. Среди 42 больных язвенной болезнью желудка (ЯБЖ) наибольшее количество (26,2%) приходилось на возраст 50–54 года, легкое течение заболевания отмечалось у 12 пациентов, течение средней тяжести – у 20, тяжелое течение – у 10. Обследовали 40 больных раком желудка в возрасте от 35 до 79 лет, II стадия опухолевого процесса была определена у 11 (27,5%) пациентов, III – у 15 (37,5%), IV – у 14 (35%). Диагноз выставляли на основании клинических данных, результатов ЭГДС и гистологического исследования гастробиоптатов. 40 здоровых добровольцев составили контрольную группу.

Забор крови для исследования проводили при первичном обращении до проведения лечения в утренние часы натощак из локтевой вены в объеме 5 мл в сухую стерильную пробирку, сыворотку отделяли центрифугированием. Определение сывороточных концентраций фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), секреторного иммуноглобулина А (sIgA), раково-эмбрионального антигена (CEA), ракового антигена 72-4 (CA 72-4), пепсиногена (PG)-1, -2 проводили иммуноферментным методом с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Результаты. Определение сывороточных концентраций VEGF, sIgA, CEA, CA 72-4, PG-1, PG-2 у здоровых добровольцев позволило установить интервал нормы.

При оценке уровня VEGF у пациентов с хроническим гастритом отмечалось повышение его количества. Степень тяжести атрофии слизистой оболочки желудка (СОЖ) определяла увеличение концентрации VEGF в 2,75 раза по сравнению с контролем ($p < 0,001$), превышая в 75% случаев верхние границы нормальных значений (226 пг/мл), и в 1,75 раза ($p < 0,001$) превышая показатель в группе пациентов с неатрофическим гастритом. При поверхностном гастрите уровень VEGF лишь в 20% случаев превышал верхнюю границу нормальных значений (Матвеева Л.В., Мосина Л.М. Патент РФ №2474824; 17.11.2011).

Оценка уровня sIgA и PG-2 у большинства больных ЯБЖ выявила повышение их количества, зависящее от течения заболевания, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$), превышая верхние границы нормальных значений в 90,5 и 61,9 % случаев соответственно. Уровень CA 72-4 был выше верхней границы нормальных значений у всех больных с тяжелым течением, частыми обострениями ЯБЖ. При значении sIgA большем или равном 5,0 мг/л, PG-II больше 16,0 мкг/л, уровне CA 72-4 меньшем или равном 2,0 Ед/мл прогнозировали легкое течение ЯБЖ. При значении sIgA большем или равном 6,9 мг/л, PG-II большем или равном 17,5 мкг/л, уровне CA 72-4 меньшем или равном 6,9 Ед/мл прогнозировали течение ЯБЖ средней тяжести. При значении sIgA большем или равном 7,2 мг/л, PG-II большем или равном 18,0 мкг/л, уровне CA 72-4 большем или равном 7,0 Ед/мл прогнозировали тяжелое течение ЯБЖ и высокий риск малигнизации (Матвеева Л.В., 2016).

При оценке уровня VEGF и CEA у большинства больных раком желудка, отмечалось по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$) повышение их количества, зависящее от стадии опухолевого процесса, превышая верхние границы нормальных значений в 75 и 60 % случаев. Уровень PG-1 у большинства больных снижался, что указывало на атрофию СОЖ, у части больных с локализацией опухолевого процесса в антральном отделе желудка – повышался. Анализ результатов позволяет при соблюдении одного из условий: значения VEGF больше или равны 226-360 пг/мл, CEA больше или равны 2,8 нг/мл, PG-1 меньше 30 мкг/л; значения VEGF больше 360 пг/мл, CEA больше или равны 5,2 нг/мл, PG-1 меньше 49 мкг/л; значения VEGF больше 1000 пг/мл, CEA больше или равны 5,0 нг/мл, PG-1 больше или равны 105 мкг/л, устанавливать наличие онкотрансформации желудочного эпителия (Матвеева Л.В. и соавт. Патент РФ №2580309; 15.12.2014).

Заключение. На основании полученных данных разработаны способы диагностики атрофического гастрита, прогнозирования течения ЯБЖ, иммунодиагностики рака желудка. Использование данных способов повышает эффективность диагностики заболеваний желудка.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОЧАСТИЦ НА ПРИМЕРЕ NK-КЛЕТОК

Михайлова В.А., Белякова К.Л., Шевелева А.Р., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В настоящее время описан феномен образования клетками микрочастиц, представляющих собой сформированные из плазматической мембраны микровезикулы с диаметром от 100 до 1000 нм. Клетки могут образовывать микрочастицы как в интактном состоянии, так и в результате активации. Микрочастицы присутствуют в периферической крови у здоровых доноров, количество и состав мембранных рецепторов микрочастиц может изменяется при патологиях. В литературе обсуждается возможность передачи сигнала от клетки к клетке с помощью микрочастиц и реализация таким образом бесконтактного межклеточного взаимодействия. Одним из способов детекции микрочастиц клеточного происхождения является проточная цитофлюориметрия. Предприняты попытки детекции микрочастиц лейкоцитарного происхождения с помощью прибора FacsCanto II (BD, США). Однако чувствительность прибора позволяет детектировать частицы размером от 300 нм, что приводит к неполному учету содержания микрочастиц в образцах. Проточный цитофлюориметр Cytoflex (Beckman Coulter),

оснащенный тремя лазерами 488 нм, 638 нм, 405 нм и позволяющий детектировать боковое рассеяние от лазера 405 нм, дает возможность определять частицы размером от 200 нм. В настоящее время все больше внимания уделяется детекции и оценке динамики содержания микрочастиц лейкоцитарного происхождения. Одной из популяций лейкоцитов являются NK-клетки. В настоящее время нет прямых свидетельств о способности NK-клеток продуцировать микрочастицы. Поэтому **целью** настоящей работы была оценка содержания и фенотипа микрочастиц, образуемых NK-клетками.

Материалы и методы. В качестве клеток-источников микрочастиц были выбраны NK-клетки линии NK-92 (ATTC, США). Клетки линии NK-92, являются суспензионной культурой, и воспроизводят основные фенотипические и функциональные характеристики активированных NK-клеток. В качестве индуктора использовали IL-1β (100 нг\мл) (Sigma, USA).

Для оценки фенотипа NK-клеток линии NK-92 и образуемых ими микрочастиц клетки культивировали в 24-луночных планшетах при 37 °C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в течение 24 часов в присутствии индуктора и без него. Через сутки планшеты центрифугировали при 200 g и собирали надосадочную жидкость. Для выделения микрочастиц использовали модифицированный метод дифференциального центрифугирования M.P. Gelderman, J. Simak (2008). К осадку клеток в 24-луночные планшеты добавляли раствор CellWash (BD, США), ресуспендировали клетки и переносили их в пробирки для анализа на проточном цитофлюориметре. Все исследуемые пробы обрабатывали моноклональными антителами к CD11b в соответствии с указаниями производителя (BD, США). Экспрессию рецептора оценивали при помощи проточного цитофлюориметра Cytoflex (Beckman Coulter). Перед измерением проб, содержащих микрочастицы, для настройки прибора использовали калибровочные частицы размером 0,1 мкм; 0,2 мкм; 0,5 мкм; 1,0 мкм. Для работы с микрочастицами фильтровали все растворы через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм. Статистический анализ проводили в компьютерной программе Statistica 10, используя параметрический критерий Стьюдента.

Результаты. Установлено, что 99% NK-клеток экспрессировали на своей поверхности CD11b. Инкубация клеток в присутствии IL-1β не приводила к изменению экспрессии CD11b NK-клетками. Относительное количество микрочастиц, образованных NK-клетками линии NK-92, экспрессирующих CD11b, было заметно ниже по сравнению с клетками-источниками. Активация NK-клеток IL-1β не влияла на относительное количество микрочастиц, однако приводила к снижению интенсивности экспрессии на микрочастицах CD11b.

Заключение. NK-клетки линии NK-92 способны к образованию микрочастиц. В присутствии IL-1β микрочастицы NK-клеток включают в свой состав меньшее количество рецепторов CD11b, чем без индуктора, что может отражать снижение активационного сигнала, передаваемого NK-клетками, за счет микрочастиц.

СЕРОТИП-СПЕЦИФИЧНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРДНЫХ АНТИГЕНОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Нуриев Р.И.[1,2], Гальвидис И.А.[1], Буркин М.А.[1]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Введение. В последние годы на территории России наблюдается изменение спектра циркулирующих серотипов *S. pneumonia*e, связанное с началом широкого применения противопневмококковых вакцин. В связи с ограниченностью числа серотипов, на профилактику которых направлены существующие вакцины, возникает необходимость в проведении постоянного мониторинга серотипового пейзажа *S. pneumonia*e для дальнейшей направленной разработки новых вакцинных препаратов. Одним из способов контроля эпидемиологической ситуации может служить иммунохимическое определение капсульных полисахаридных антигенов *S. pneumoniae* в биологических жидкостях, в частности, в моче, у лиц с активной пневмококковой инфекцией.

Цель и задачи. Разработать иммуноанализ, позволяющий проводить серотип-специфичное определение капсульных полисахаридных антигенов *S. pneumonia*e в биологических жидкостях.

Материалы и методы. В качестве модельных антигенов были взяты очищенные капсульные полисахариды *S. pneumoniae* серотипов 9N и 3 (Ястребова Н.Е.). Серотип 3 является одним из наиболее вирулентных, а 9N, несмотря на то, что циркулирует в популяции, не представлен в современных вакцинах. На основе данных полисахаридов приготовлены конъюгаты с овальбумином (OVA-Ps9N) и желатином (Gel-Ps3), которые использовались в качестве твердофазных антигенов в конкурентном ИФА. Поликлональные антитела к *S. pneumoniae* соответствующих серотипов были получены в результате многократной иммунизации кроликов.

Результаты. Полученные реагенты позволяли проводить определение Ps9N и Ps3 в буферном растворе до 2,5 и 6 нг/мл соответственно, а помехи со стороны мочи могли быть нивелированы при 5-кратном разведении образцов. Отсутствие перекрестной реактивности как с полисахаридными антигенами, так и с суспензиями микробных клеток *S. pneumoniae* серотипов 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18, 19F, 23F подтвердило абсолютную специфичность тестов. Методы также оказались пригодными для серотипирования штаммов *S. pneumoniae* (10^5-2×10^6 м.к./мл). Применение конъюгатов позволило в 30 раз, по сравнению с полисахаридами, снизить расход реагентов в анализе.

Заключение. Разработанный ИФА пригоден для серотип-специфичного определения полисахаридных антигенов в биологических жидкостях и выявления микробных клеток *S. pneumoniae*. Применение конъюгатов в качестве твердофазных антигенов позволило повысить чувствительность анализа, а также значительно снизить расход реагентов по сравнению с использованием препаратов очищенных полисахаридов. Данный метод, в отличие от микробиологических, может применяться и при антибиотикотерапии, что делает его удобным

инструментом для проведения эпидемиологических исследований. Аналогичный подход применим для идентификации большинства других циркулирующих серотипов *S. pneumoniae*.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА КОЛЬЦЕВОЙ КОВАЛЕНТНО-ЗАМКНУТОЙ ДНК ВГВ В ПУНКЦИОННЫХ БИОПТАТАХ ПЕЧЕНИ

Останкова Ю.В.[1], Семенов А.В.[1, 2], Тотолян Арег А.[1, 2]

[1] Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Гепатит В является одним из наиболее распространенных гепатотропных вирусов, передающихся при контакте с кровью или иными жидкостями организма инфицированного человека, поражающих печень и способных вызывать как острое, так и хроническое течение заболевания. Согласно ВОЗ количество инфицированных вирусом гепатита В в мире составляет почти 2 млрд человек, у более чем 240 миллионов из них развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ). Ранее была показана возможность существования ВГВ в виде кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккз ДНК) в гепатоцитах на различных клинических стадиях хронического вирусного гепатита В (ХВГВ) в течение длительного при отсутствии иных маркеров вирусного гепатита В (ВГВ) и сохранении возможности реактивации. По некоторым данным высокий уровень ккз ДНК в тканях печени являются фактором риска рецидива ВГВ, несмотря на профилактическую терапию. Современные противовирусные препараты способны подавлять репликацию ВГВ и способствовать снижению риска развития различных осложнений заболевания печени, ведутся активные поиски по разработке терапевтического курса, конечной целью которого будет полная элиминация ккз ДНК ВГВ для предотвращения возможной реактивации вируса. В связи с вышесказанным введение в практическую лабораторную диагностику метода выявления и количественной оценки ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени как способа идентификации заболевания и оценки репликации вируса имеет большое значение для обнаружения окультного гепатит В и для определения стратегии лечения пациентов с ХВГВ.

Цель. Разработать метод количественной оценки ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени.

Материалы и методы. Материалом служили остатки плазмы крови и биопсийного материала печени 128 пациентов, полученные в ходе выполнения плановых или рутинных исследований в медучреждениях.

Результаты. Для количественной оценки ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на базе методики, предложенной Pollicino T. с соавторами для выявления ккз ДНК ВГВ. Выделенную из образцов ДНК для удаления одноцепочечных НК и расщепления частично-кольцевой геномной ДНК ВГВ предварительно обрабатывали эндонуклеазой MungBean, после чего положительный сигнал регистрировался только от ккз ДНК ВГВ. В ходе работ использовали различные дополнительные компоненты для амплификации, введение в амплификационную смесь эмпирически подобранного количества DMSO и глицерина, способствующих увеличению эффективности ПЦР и препятствующих образованию вторичных структур за счет стабилизации Taq ДНК-полимеразы и влияния на температуру отжига праймеров, привело к стабильной регистрации сигнала. Для количественного анализа использовали зонды TaqMan. Уровень ккз ДНК ВГВ нормировали на количество ДНК референсного гена. В качестве референсных генов были опробованы β-глобин, β-актин и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH). Для количественной стандартизации амплификации с олигонуклеотидами для ВГВ использовали образцы ДНК ВГВ, предварительно охарактеризованные с помощью набора «АмплиСенс HBV – Монитор – FRT» для количественной амплификации. Для количественной стандартизации амплификации с праймерами генов β-глобина, β-актина и GAPDH использовали предварительно количественно охарактеризованные лейкоцитарные взвеси, полученные из образцов периферической крови. Для каждого образца реакцию проводили в трех повторностях, далее усредняли значение Ct для них. Анализ результатов проводился по методу относительного подсчета (метод дельта Ct) с нормализацией по эндогенному референс гену. Для оценки эффективности реакции для каждого гена делали серию разведений образца. Эффективность реакции автоматически рассчитывалась прибором. Специфичность и отсутствие побочных продуктов подтверждали прямым секвенированием фрагментов и анализом кривых плавления для данных ПЦР продуктов

Заключение. Разработанный метод обладает высокой специфичностью и позволяет проводить количественную оценку ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени.

НОВАЯ ПАНЕЛЬ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К IgA ЧЕЛОВЕКА

Порываева В.А., Агафонова О.А., Марченко А.К., Вторушина И.А., Кувшинова И.Н., Ткаченко Т.Н., Кротова В.А., Масяго Л.Н., Гладкова С.Е., Рукавишников М.Ю.

АО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Выявление специфических антител (АТ) класса IgA при некоторых инфекциях (хламидиоз, токсоплазмоз, кандидоз, уреаплазмоз, микоплазмоз и ряд других) играет важную роль в комплексной диагностике заболеваний, позволяя определять стадию болезни и эффективность лечения.

Целью нашей работы было получение новой панели моноклональных антител МоАТ к сывороточному IgA (IgAs) человека для выявления IgA-антител в непрямом иммуноферментном анализе (ИФА) в сыворотке крови людей.

Гибридомы получили слиянием спленоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных очищенным IgAs

(MP Biomedicals), с клетками мышиной миеломы NS1. Гибридомные антитела были исследованы на реактивность с IgM, с IgAs и IgA секреторным (IgAsecr), с изотипами IgG человека. Оказалось, что антитела 16-ти гибридом связывались с лёгкой k-цепью Ig (реакция с IgM, IgG1-k, IgG2-k, IgG3-k, с IgG4-k, с IgAs и IgAsecr), 7 гибридом – с лёгкой λ-цепью Ig (реакция с IgM, IgG1-λ, IgG2-λ, IgG3-λ, с IgG4-λ, с IgAs и IgAsecr). 29 гибридом синтезировали АТ, высокоспецифичные только к IgA. Все они давали высокие титры как с сывороточным, так и с секреторным IgA, т.е. связывались с тяжёлой α-цепью. Отношение обратных титров в реакции с IgAs и IgAsecr варьировало от 0,1 до 10.

С использованием конкурентного ИФА антитела к α-цепи были разбиты на 6 групп. Методом лимитирующих разведений мы отклонировали до однородности субклонов по свойствам синтезируемых АТ 11 гибридом, принадлежащих к разным группам конкуренции и имеющих высокие титры специфических антител. Для них получены асцитные препараты МоАТ, антитела очищены методом аффинной хроматографии на SpA-сефарозе и для них синтезированы пероксидазные конъюгаты.

8 МоАТ из нашей панели показали себя пригодными в диагностических наборах при выявлении IgA-антител при диагностике ряда заболеваний: хламидиоза, токсоплазмоза, уреаплазмоза, кандидоза, микоплазмоза, целиакии. Отобраны МоАТ для количественного определения сывороточного IgA.

ОСОБЕННОСТИ СПОНТАННОЙ И МИТОГЕН-СТИМУЛИРОВАННОЙ СЕКРЕЦИИ IgG4 У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Терехов И.В.

Медицинский институт Тульского государственного университета, Тула, Россия

Нарушение продукции отдельных подклассов иммуноглобулина IgG ассоциировано с различной патологией внутренних органов – т.н. IgG4-ассоциированные состояния. Патогенез данного состояния исследован недостаточно, как и недостаточно изучена регуляция продукции IgG4. С учетом целесообразности более глубокого изучения молекулярных механизмов регуляции секреции IgG4, целью настоящего исследования являлось изучение в условиях спонтанной активности, а также при воздействии комплексного митогена, взаимосвязи секреции IgG4 с продукцией мононуклеарными клетками (МНК) цельной крови практически здоровых лиц интерлейкинов (ИЛ) IL-1, IL-5, IL-10, IL-17A и содержанием в МНК факторов транскрипции AP-1, NF-κB, T-box, GATA-3, NF-IL6.

Материалы и методы. Материалом исследования служила венозная кровь практически здоровых лиц (n = 30) из числа доноров крови (средний возраст 22,5±2,5 года). В исследовании использованы наборы для культивирования и митогенной активации клеток цельной крови производства ЗАО «Вектор-Бест» (митоген в составе липополисахарида – ЛПС, конканавалина, фитогеммаглютинина). Выделение МНК и подготовка ядерно-цитоплазматических лизатов осуществляли в соответствии с рекомендациями производителей наборов реагентов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА), для чего использовали 1 мл клеточной суспензии, содержащей 5×10^6 МНК, жизнеспособность которых составляла более 90%. В соответствии с поставленной целью, в лизате МНК методом ИФА определяли содержание факторов транскрипции AP-1, NF-κB, T-box, GATA-3, NF-IL6, а также в супернатанте – концентрацию цитокинов: IL-1, IL-5, IL-10, IL-17A, а также IgG4. В процессе исследования рассчитывали среднее значение, 25 процентиль, медиану выборки и 75 процентиль. Статистическую значимость оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Содержание в клеточном супернатанте IgG4 составило 0,5 (0,16; 0,53; 0,82) мг/мл, концентрация IL-1 составила 15,4 (12,7; 16,1; 18,1) пг/мл, IL-5 – 2,5 (2,0; 2,5; 3,1) пг/мл, IL-10 – 14,3 (12,9; 13,4; 15,7) пг/мл, IL-17A – 2,6 (2,3; 2,6; 2,8) пг/мл. Уровень в МНК фактора транскрипции NF-IL6 составил 0,47 (0,15; 0,23; 0,79) нг/мл, GATA3 – 0,15 (0,08; 0,1; 0,23) нг/мл, T-box – 1,28 (1,2; 1,31; 1,37) нг/мл, AP-1 – 0,16 (0,14; 0,17; 0,17) нг/мл, NF-κB – 0,58 (0,48; 0,58; 0,68) нг/мл. Проведенный анализ показал, 24-ти часовая инкубация клеток крови с комплексным митогеном способствовала статистически значимому возрастанию продукции IgG4, в среднем, в 3,2 раза, IL-1 – в 3,6 раза, IL-5 – в 9,2 раза, IL-10 – в 4,8 раза, IL-17A – в 9,2 раза. При этом содержание фактора транскрипции NF-IL6 возросло в 12,0 раз, GATA3 – в 35,8 раза, T-box – в 7,2 раза, AP-1 – в 29,9 раза, NF-κB – в 10,6 раза. Таким образом, под влиянием комплексного митогена отмечается выраженная стимуляция продукции IL-17A и IL-5, что свидетельствует об активации Т-хелперов 2 типа и Т-хелперов-17. Проведенный анализ показал, что коэффициент линейной корреляции спонтанного уровня секреции IgG4 и IL-1 составил -0,69, IgG4 и IL-5 составил 0,73, IgG4 и IL-10 составил -0,74, IgG4 и IL-17A – 0,97, IgG4 и NF-IL-6 – 0,72, IgG4 и GATA3 – 0,74, IgG4 и T-box – -043, IgG4 и AP-1 – 0,53, IgG4 и NF-κB – -0,93. Результаты оценки корреляции соответствующих показателей в культурах, подвергнутых митогенной стимуляции, выявили снижение корреляции IgG4 и IL-1 до -0,59, IgG4 и IL-10 до -0,67, IgG4 и NF-κB до -0,2. Так же выявлено изменение знака и снижение силы корреляции IgG4 и IL-5 до -0,31, IgG4 и IL-17A до -0,85, IgG4 и NF-IL-6 до -0,51. На этом фоне отмечалось повышение силы взаимосвязи секреции IgG4 и уровня в МНК фактора GATA3 до 0,92, IgG4 и AP-1 до 0,58, IgG4 и T-box до -0,79.

Заключение. Спонтанная секреция IgG4 находится в тесной положительной зависимости от продукции IL-5 и сильной отрицательной – от IL-10. Результаты оценки стимулированной продукции IgG4 позволяют говорить о значительной роли в ее регуляции фактора транскрипции GATA3, способствующего усилению антителообразования, а так же фактора транскрипции T-box, способствующего угнетению секреции IgG4 совместно с NF-IL6. При этом дисрегуляция активности факторов транскрипции GATA3 и T-bet может являться одной из причин высокой продукции В-лимфоцитами и плазматическими клетками IgG4 и развития ассоциированных клинических состояний.

ДЕТЕКЦИЯ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ НОВЫМ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА

Ткаченко О.Ю.[1], Лапин С.В.[1], Шмонин А.А.[1], Соловьева Л.Н.[1], Бондарева Е.А.[1], Сельков С.А.[2], Чепанов С.В.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома (АФС) состоит в выявлении антифосфолипидных антител (АФА) методом иммуноферментного анализа (ИФА), а именно в детекции антикардиолипиновых (аКл) антител и антител к бета-2-гликопротеину (аβ2Гп). Использование классических ИФА тест-систем затруднено их недостаточной стандартизацией. Новым подходом к детекции антифосфолипидных антител является использование иммуноблоттинга, преимуществом которого является сорбция антигенов на гидрофобной PVDF-мембране и комплексный подход к диагностике АФС.

Материалы и методы. Нами была собрана коллекция образцов сывороток 45 пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 19 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и 44 пациентов с привычным невынашиванием беременности, а также 120 клинически здоровых доноров. В данных сыворотках были измерены аКл IgG, аКл IgM, аβ2ГП1 методом ИФА с помощью тест-систем фирм Euroimmun (ПР1) и Orgentec Diagnostica (ПР2) и аКл IgG, аКл IgM, аβ2ГП1, а также некритериальные АФА – методом иммуноблоттинга на тест-системе фирмы Medipan (ПР3).

Результаты. Классическим методом ИФА при использовании пограничного значения, заявленного производителями, АФА были выявлены у 57% пациентов, методом иммуноблоттинга – у 40%, при этом средние и высокие титры определялись у 14% пациентов при использовании ИФА тест-систем, и у 23% – при использовании нового метода иммуноблоттинга. В группе пациентов с привычным невынашиванием частота АФА значимо выше, чем в группах пациентов с некардиоэмболическими инсультами и рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей. Встречаемость критериальных АФА, измеренных методом иммуноблоттинга, для аβ2ГП составила 50%, для аКл – 20%. Среди минорных антител к наиболее значимыми оказались антитела к фосфатидилсерину, аннексину и фосфатидной кислоте (встречаемость составила 20%).

Выводы. Использование классического подхода к диагностике АФС сопряжено с рядом серьезных проблем (большое количество низкоположительных результатов). Новый метод иммуноблоттинга обладает более высокой чувствительностью при средних и высоких титрах АФА. Использование нового принципа определения АФА позволяет увеличить количество подтвержденного АФС.

ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ ЭНДОГЕННОЙ И ЭКЗОГЕННОЙ ПРИРОДЫ

«БИОБРАН» В КОРРЕКЦИИ ЭЛЕМЕНТОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННЫМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ В СОЧЕТАНИИ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИЕЙ

Балдуева И.А., Пипиа Н.П. Данилова А.Б., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Емельянова Н.В., Галлиулина О.А., Авдонкина Н.А.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н.Петрова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Препарат «Биобран», иммуномодулятор растительного происхождения, представляющий собой комплекс полисахаридов, основным из которых является арабиноксилан, был разработан в Японии в 1992 году. К основным фармакологическим эффектам «Биобрана» относят стимуляцию активности естественных киллеров (NK), Т- и В-клеток, макрофагов, подавление проникновения нейтрофилов в очаг воспаления. Экспериментальные исследования, проведенные на животных моделях различных опухолей, показали, что под воздействием этого препарата увеличивается противоопухолевая активность дендритных клеток (ДК), возрастает чувствительность клеток опухоли к химиотерапевтическим агентам. Первые пилотные клинические исследования, проведенные в группе больных раком печени, продемонстрировали увеличение продолжительности жизни пациентов, получавших «Биобран». Тем не менее, в настоящее время еще нет убедительных доказательств противоопухолевой активности данного препарата, нет четких данных о механизмах его действия, что ограничивает точки его приложения и требует проведения стандартных рандомизированных клинических исследований.

Цель. Оценить эффективность препарата «Биобран» как иммуностимулятора, дополняющего активную специфическую иммунотерапию больных диссеминированными злокачественными новообразованиями.

Материалы и методы. В исследование было включено 14 больных диссеминированными злокачественными новообразованиями (меланома кожи – 5, саркомы мягких тканей – 3, рак яичника – 2, рак поджелудочной железы – 2, рак почки – 1, рак предстательной железы – 1), получавших активную специфическую иммунотерапию на основе PTA^+ активированных ДК, которые имели низкие показатели абсолютного количества NK-клеток в периферической крови. Этой группе больных был назначен «Биобран». В качестве контрольной группы рассматривали пациентов со сходными показателями врожденного иммунитета, которые не принимали данный препарат. Всем пациентам были выполнены иммунологические исследования на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США): оценивали количественное содержание основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в периферической крови.

Результаты. Абсолютное содержание NK клеток в периферической крови больных злокачественными новообразованиями, получивших «Биобран», достоверно увеличивалось в процессе терапии в отличие от пациентов, не получивших этот препарат ($0,06\pm0,010$ и $0,1\pm0,015 \times 10^9$ клеток, до приема «Биобрана», соответственно, $0,11\pm0,005$ и $0,05\pm0,012 \times 10^9$ клеток, через 4 мес. от начала лечения, $p = 0,008$). Аналогичные закономерности были выявлены при определении абсолютного содержания NKT-клеток: $0,07\pm0,015$ и $0,015\pm0,077 \times 10^9$ клеток до применения препарата, $0,15\pm0,010$ и $0,05\pm0,012 \times 10^9$ клеток $p = 0,013$, через 4 мес. от начала лечения соответственно.

Выводы. Препарат «Биобран» способствует увеличению абсолютного содержания NK- и NKT-клеток в периферической крови больных с диссеминированным опухолевым процессом на фоне активной специфической иммунотерапии во 2-й и последующих линиях лекарственного лечения. Дальнейшие исследования позволят изучить влияние «Биобрана» на функциональную активность различных субпопуляций клеток иммунной системы у этой категории больных.

СПОСОБНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРОДУЦИРОВАТЬ ЦИТОКИНЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА НИХ КСИЛОМАНАННОМ *IN VITRO*

Бляхер М.С., Алешкин А.В., Федорова И.М., Рамазанова З.К., Краснопольская Л.М., Тульская Е.А., Кукушкина Е.А.

ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Ксиломаннан – это полисахарид, выделенный из щелочерастворимой фракции мицелия Ganoderma lucidum. Противоопухолевая активность ксиломаннана была показана в опытах *in vivo* сотрудниками лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ НИИНА им. Г.Ф. Гаузе. Так как относительно немного исследований содержат информацию о влиянии этого вещества на способность к продукции цитокинов лейкоцитами периферической крови, представлялось актуальным изучить цитокиновый профиль при стимуляции ксиломананном *in vitro*.

ТАБЛИЦА. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ КСИЛОМАННАНОМ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ (M±m) (К ТЕЗИСАМ БЛЯХЕР М.С. И ДР.)

Виды воздействия	TNFα	IL-10	IL-1β	IL-6	IL-8
ксиломаннан + $NaHCO_3$	300*±47	494*±106	1507*±361	17116±1461	40395*±2837
$NaHCO_3$	143±22	311±58	1125±233	14088±1333	31071±3129

Примечание. * – статистически значимое отличие от парной пробы $NaHCO_3$.

Цель. Изучить влияние ксиломаннана, выделенного из *G. lucidum*, на продукцию цитокинов мононуклеарами периферической крови человека.

Материалы и методы. Из крови 22 здоровых доноров были выделены мононуклеары. Взвесь мононуклеаров стимулировали ФГА, ЛПС, ксиломаннаном, растворителем ксиломаннана ($NaHCO_3$) или без индукторов (спонтанная продукция). После инкубации в планшете при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в течение 20 часов, были получены супернатанты в которых, методом ИФА была определена концентрация TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10. Отработана доза ксиломаннана, не токсичная для клеток и обладающая стимулирующим воздействием. Определение концентрации цитокинов проводилось на ИФА-тест-системах российского производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) и ООО «Цитокин» (Россия).

Статистическая обработка проведена с использованием программы Statistica 6.0 и MS Excel. Сравнение вариационных рядов осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. При сравнении уровня продукции TNFα под влиянием разных стимуляторов: ФГА, ЛПС или ксиломаннана, выявлено, что ксиломаннан стимулирует продукцию этого цитокина сопоставимо с ФГА и ЛПС и значимо выше, чем под влиянием среды культивирования (спонтанная продукция) и $NaHCO_3$ (значимо при $p = 0{,}002$).

Исследование влияния ксиломаннана на продукцию других цитокинов мононуклеарами периферической крови человека продемонстрировало, что данное вещество способствует повышению продукции мононуклеарами периферической крови таких цитокинов как IL-10, IL-1β, IL-6, IL-8. Поскольку ксиломаннан был растворен в $NaHCO_3$, проведено сравнение величины воздействия этого вещества и $NaHCO_3$, что видно в таблице.

Во всех случаях ксиломаннан в большей степени воздействовал на продукцию цитокинов, чем растворитель, а для большинства цитокинов (TNFα, IL-10, IL-1β, IL-8) – статистически достоверно (величина p колебалась от 0,03 до 0,005).

Заключение. Противоопухолевые свойства ксиломаннана связанны с его способностью активировать клеточный и гуморальный иммунитет. Ксиломаннан проявил себя в данном исследовании как индуктор активации мононуклеаров периферической крови. Он индуцировал продукцию TNFα, который играет важную роль в противоопухолевом иммунитете. Увеличение продукции TNFα в культурах, стимулированных ксиломаннаном, у большинства доноров сопровождалось увеличением продукции IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10.

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО И ГРУППОВОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Буркин М.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Иммунохимические методы активно используются для выявления разнообразных биологически активных низкомолекулярных агентов, в том числе лекарственных соединений. По своим аналитическим характеристикам практический интерес представляют варианты иммуноанализа с избирательным и групповым распознаванием анализируемых соединений. Первые предназначены для идентификации конкретного аналита, вторые позволяют в одной пробе выявлять максимально возможное число структурных аналогов. Так, для скринниговых целей эффективным решением являются методы, обладающие групповой специфичностью. Необходимость идентифицировать отдельное соединение среди близких структурных аналогов может диктоваться его особой активностью, токсичностью или особенностями использования. Подобные системы анализа конструируются на основе антител с разной эпитопной специфичности (к общим или индивидуальным субмолекулярным структурным элементам, эпитопам), а их создание требует дифференцированного подхода. Аффинная хроматография, гибридомная технология и технологии дисплея позволяют выделять и селекционировать поликлональные, моноклональные или рекомбинантные антитела определенной эпитопной направленности из целого репертуара специфичностей. Альтернативный подход заключается в селекции in situ – избирательном связывании антител специфичных к отдельным эпитопам, происходящем в ходе анализа. Избирательность такого взаимодействия обеспечивается благодаря презентации и/или экранированию на антигенах групповых или индивидуальных эпитопных структур.

Цель и задачи. Конструирование конъюгированных антигенов и создание на их основе систем для селективной и групповой иммунодетекции лекарственных соединений.

Результаты. На основе 7 тетрациклиновых антибиотиков, конъюгированных с белковыми носителями, создана панель антигенов. В конкурентном ИФА, при иммобилизации полученных конъюгатов на твердой фазе, исследованы профили перекрестного взаимодействия поликлональных антител к БСА-ТЦ с каждым из 7 антибиотиков и найдены условия для наилучшего группового распознавания тетрациклина, хлортетрациклина, окситетрациклина и доксициклина, регламентированных в продуктах питания (Food Agric. Immunol., 2009, 20, 245-252).

Антитела, полученные в результате иммунизации кроликов конъюгатом БСА с макролидным антибиотиком тилозином, могли быть разделены по эпитопной специфичности. В зависимости от дизайна иммобилизованного антигена разработаны три варианта ИФА для селективного определения тилозина, его совместного выявления с тилмикозином, а также для группового определения тилозина и спирамицина (Food Chemistry, 2012, 132 (2), 1080-1086).

Гликопептидные антибиотики эремомицин и ристомицин, конъюгированные с БСА использовались в качестве иммуногенов для получения специфических антисывороток, взаимодействие которых с конъюгатами гомологичных гаптенов обеспечивало избирательность распознавания этих соединений. Используя антигены на основе гетерологичных структурно родственных гаптенов, ванкомицина и тейкопланина, несущих общие структурные детерминанты, оказалось возможным выявлять группу гликопептидов (J. Immunol., Methods 2013, 388, 60-67).

Аналогичный принцип позволил на основе антител к конъюгату БСА-сарафлаксацин создать тест для совместного и селективного иммуноферментного определения фторхинолонов, а также дифференцировать основное лекарственное средство дифлоксацин и его активный метаболит сарафлоксацин (Analytical Methods, 2016, 8, 5843-5850).

Заключение. Системы селективного и групп-специфического иммуноанализа, пригодные как для идентификации отдельных лекарственных соединений, так и для одновременного выявления целой группы структурно родственных соединений, могут быть реализованы на основе одних и тех же поликлональных антител, взаимодействующих с разными эпитопными мишенями, представленными на иммобилизованных антигенах.

ПРИНЦИПЫ ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ

Ветлугина Т.П., Никитина В.Б., Лобачева О.А., Невидимова Т.И.

Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр, Томск, Россия

Введение. Результаты многолетних исследований лаборатории клинической психонейроиммунологии НИИ психического здоровья показали, что нарушения параметров иммунитета при психических расстройствах, отражающих модуляцию психонейроиммунного взаимодействия, оказывают негативное влияние на течение психического заболевания и снижают эффективность терапии. В связи с этим выбор тактики лечения пациентов с психическими расстройствами должен опираться не только на клинико-психопатологические, но и на иммунобиологические критерии.

Цель. Разработка алгоритма оптимизации терапии психических расстройств.

Результаты. При обследовании пациентов с невротическими, связанными со стрессом, расстройствами (расстройства адаптации – 90 человек; ПТСР – 100 человек); непсихотическими органическими психическими расстройствами (232 пациента) сопутствующая соматическая патология и клинические синдромы вторичной иммунной недостаточности (ВИН) выявлялись в 60-90% случаев. Разработаны программы с включением в комплекс психофармакотерапии широкого спектра иммуноактивных препаратов с учетом особенностей клинического течения психической дезадаптации, глубины иммунных нарушений, сопутствующей соматической патологии. Применение программ оказывает позитивный клинический эффект, сопровождающийся оптимизацией иммунной защиты, снижением в 3 раза количества пациентов с неспецифическими адаптационными реакциями хронического стресса и в 4 раза – с реакциями острого стресса.

Одной из причин, ухудшающих эффективность лечения больных шизофренией, является резистентность к психотропным препаратам. Проведены иммунологические исследования двух групп больных – резистентных (420 человек) и чувствительных (129 пациентов) к проводимой психофармакотерапии. Труднокурабельные больные по сравнению с группой чувствительных к терапии характеризовались статистически значимыми высокими значениями количества лимфоцитов $CD3^+$, $CD95^+$, факторов гуморального иммунитета (IgG, ЦИК), митогениндуцированной продукцией мононуклеарами TNFα; снижением количества лимфоцитов $CD4^+$, $CD8^+$, $HLADR^+$, митогениндуцированной продукцией IL-4. Для преодоления терапевтической резистентности разработаны различные программы с включением в комплекс лечения иммуноактивного препарата тимогена (синтетический дипептид L-глютамил- L-триптофан), которые были применены при лечении 175 труднокурабельных пациентов. Показано, что применение тимогена позволяет преодолеть резистентность и повысить эффективность лечения у 60,6-72,7% пациентов по сравнению с 32,1-33,3% пациентов в группе сравнения (40 пациентов – стандартная терапия) и с 40,0% в группе плацебо (90 пациентов). Повторное лабораторное исследование показало, что клинический эффект комплексной терапии сопровождался позитивной динамикой ряда параметров иммунитета ($CD4^+$, $CD8^+$, $HLADR^+$ лимфоцитов, ЦИК, IgG).

На основе полученных данных нами разработан алгоритм оптимизации терапии психических расстройств, который состоит из нескольких этапов. На первом этапе при психопатологическом обследовании пациентов (анамнез, нозологические критерии, синдромальная характеристика) особое внимание уделяется выяснению склонности заболевания к затяжному течению, резистентности к психофармакотерапии, в том числе во время предыдущих госпитализаций. На следующем этапе устанавливается наличие клинических синдромов ВИН (инфекционный, аллергический, аутоиммунный, смешанный синдромы), сопутствующей соматической патологии, определяется возможность применения немедикаментозного воздействия, опосредованно влияющего на иммунитет (психотерапия, адаптагены). Этап лабораторной диагностики дает возможность идентифицировать дефекты компонентов иммунной системы, определить уровень иммунных нарушений (изменения носят транзиторный характер, стойкие глубокие изменения с признаками иммунодефицита). На основе анализа всех трех этапов становится возможной разработка дифференцированных схем комплексной психофармакотерапии с определением круга иммуноактивных препаратов.

Заключение. Наиболее важными механизмами иммунотерапии при невротических расстройствах является превенция стресс-индуцированных иммунодефици-

тов, при шизофрении – повышение чувствительности к антипсихотикам. Разработанный алгоритм с применением иммуноактивных препаратов при психических расстройствах позволяет повысить эффективность базисного лечения через оптимизацию сигнальной связи между нервной и иммунной системами, предупреждение и коррекцию иммунной недостаточности, связанной с природой психического расстройства и с длительной фармакотерапией, воздействие на иммунологические механизмы невосприимчивости к психотропным средствам.

АНТИНУКЛЕАРНЫЕ АНТИТЕЛА И ДНКазная СЫВОРОТОЧНАЯ АКТИВНОСТЬ КАК МАРКЕРЫ ОТВЕТА НА ИНФЛИКСИМАБ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Волкова М.В.[1], Кундер Е.В.[1], Генералов И.И.[2]

[1] ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь
[2] УО «Витебский государственный медицинский университет», Витебск, Беларусь

Введение. Несмотря на успехи в лечении ревматоидного артрита до 40% пациентов не достигают ремиссии даже с использованием биологической терапии. Одним из способов повышения эффективности лечения является применения индивидуального подхода с оценкой набора специфических маркеров. Роль маркеров заключается в прогнозировании эффекта того или иного препарата у конкретного пациента. Целью данной работы является изучение динамики антинуклеарных антител (АНА) и ДНКазной активности сыворотки до и во время лечения РА инфликсимабом (ИНФ) и их потенциала в прогнозировании ответа на ИНФ.

Материалы и методы. 24 пациента с РА были включены в исследование. Все пациенты соответствовали критериям РА EULAR/ACR 2010. 22/24 пациентов получили 6 инфузий ИНФ в дозе 3 мг/кг в соответствии со стандартным протоколом. 2/24 пациент получил 4 инфузии ИНФ. Все пациенты получали метотрексат (10-17,5 мг в неделю), 18/24 пациенты – глюкокортикоиды (метилпреднизолон 4-8 мг в сутки). До начала лечения ИНФ пациентов не получали каких-либо биологических агентов. Все пациенты имели высокую активность заболевания до начала лечения ИНФ (DAS28 < 5,1).

Определение АНА проводили методом непрямой иммунофлуоресценции на клетках Hep-2 с использованием цифровой системы AKLIDES. АНА измеряли в образцах сыворотки до 1-го введения ИНФ, в 22-30 недель после 1-го введения ИНФ.

Для определения ДНКАзной активности использовали метод риванолового сгустка. ДНКазную активность измеряли в образцах сыворотки до 1-го введения ИНФ, через 6 недель после 1-го введения ИНФ и на 30 неделе лечения.

Результаты и обсуждение. На 30-й неделе, улучшение ACR70 достигло 5/22 из пациентов, ACR50 – 10/22 из пациентов, ACR20 – 4/24 пациентов. 13/24 пациентов были АНА-положительными до лечения ИНФ, 12/22 – после 24 недели лечения. Уровни сывороточной ДНКазной активности не отличались до и во время лечения ИНФ ($p>0,05$).

Для оценки прогностической ценности лабораторных признаков при прогнозировании ответа на ИНФ использовали метод логистической регрессии. Прогностическая модель, которая включала изменения в АНА (Δ АНА) и уровне ДНКазной сывороточной активности (Δ ДНКазной активность сыворотки), негативность по АЦЦП и РФ была лучше ($p = 0,02$) (площадь под ROC-кривой = 1,0; 95%ДИ0,84-1,00 $p = 0,0001$), чем модель, которая включала только негативность АЦЦП и РФ (площадь под ROC-кривой = 0,795; 95%ДИ 0,59-0,92, $p = 0,0141$).

Заключение. Результаты исследования подтвердили эффективность лечения РА инфликсимабом для АЦЦП и РФ негативных пациентов. ДНКазная сывороточная активность и АНА могут быть использованы в качестве дополнительных прогностических биомаркеров ответа на ИНФ. Требуется дальнейшее исследование этих показателей в качестве биомаркеров с большим количеством пациентов.

ИНТЕРФЕРОН-ИНДУЦИРУЮЩАЯ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ АНАЛОГА ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА И ИНДУКТОРА ИНТЕРФЕРОНА

Гамалей С.Г.[1], Батенева А.В.[1], Шишкина Л.Н.[2], Скарнович М.О.[2], Медикова Л.Д.[2], Богрянцева М.П.[2], Иванова О.С.[1], Левагина Г.М.[1], Даниленко Е.Д.[1]

[1] ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская обл., Россия
[2] ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Введение. Одним из современных направлений экстренной профилактики и лечения гриппа и ОРВИ является интерферонотерапия, включающая использование в лечебных целях препаратов интерферонов и их индукторов. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» разработан новый лекарственный препарат для интраназального применения, действующим началом которого является аналог интерферона гамма (IFNγ) Дельтаферон в составе наночастицы, ядро которой образовано индуктором интерферона дрожжевой двуспиральной РНК (вирусоподобная частица, ВПЧ).

Цель. Изучение интерфероноиндуцирующих свойств препарата ВПЧ-Дельтаферон и его противовирусной активности в отношении вируса гриппа (ВГ) A/Aichi/2/68 (H3N2).

Материалы и методы. Исследование проведено на белых беспородных мышах и мышах линии Balb/c. Препарат ВПЧ–Дельтаферон вводили трехкратно интраназально в дозах 10^3 МЕ и 10^5 МЕ на мышь. Уровень интерферона в образцах крови и тканей дыхательных путей оценивали в противовирусном тесте на культуре мышиных фибробластов L-929. Для изучения противогриппозного действия препарат вводили за 3 ч до заражения ВГ A/Aichi/2/68, через 1 и 2 сут после заражения. Противовирусную активность препарата оценивали по динамике гибели мышей, продолжительности жизни, количеству выживших особей.

Результаты. Показано, что интраназальная лекарственная форма препарата ВПЧ-Дельтаферон обладает способностью повышать титры интерферона как в области введения (в носоглотке – в 20 раз, в легких – в 10-30 раз), так и в сыворотке крови (в 20-30 раз). Интраназальный ВПЧ-Дельтаферон проявлял противовирусную активность в отношении ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2), повышая выживаемость (на 30%) и среднюю продолжительность жизни инфицированных мышей.

Заключение. На основании полученных данных можно заключить, что новая лекарственная форма интерферона гамма для интраназального применения обладает способностью индуцировать как местный, так и системный иммунный ответ, что обуславливает ее способность ингибировать развитие гриппозной инфекции.

ВЛИЯНИЕ НАСТОЙКИ ЦИМИЦИФУГИ ДАУРСКОЙ НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

Гармаев Д.Э.[1], Хобракова В.Б.[1, 2], Разуваева Я.Г.[1, 2]

[1] Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия
[2] Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

Создание фармакологических средств для профилактики и лечения ряда заболеваний и патологических состояний человека, связанных с нарушением работы иммунной системы, является актуальной проблемой современной медицины. В изучении вопросов иммунокоррекции главенствующей задачей является выбор наиболее оптимальных лекарственных средств, отвечающих требованиям современных стандартов. Перспективным направлением представляется поиск иммуномодуляторов среди средств растительного происхождения, которые имеют ряд преимуществ благодаря наличию в них комплекса биологически активных веществ, которые обеспечивают мягкое действие, низкую токсичность, способность к активации не только иммунной, но и нервной и эндокринной систем, возможность применения у лиц с сочетанными патологиями. Объектом настоящего исследования явилась настойка из корневищ с корнями цимицифуги даурской (*Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim). В народной медицине Приморья *C. dahurica* используется в виде порошка, настойки и жидкого экстракта при головных болях, начальных стадиях гипертонической болезни, при повышенной нервной возбудимости, истерии, бессоннице и др. Известно, что настойка *C. dahurica* оказывает седативное действие, ограничивая двигательную, ориентировочно-исследовательскую активность и рефлекторную возбудимость животных, а также увеличивая продолжительность наркотического сна.

Целью настоящего исследования явилось определение влияния настойки из корневищ с корнями цимицифуги даурской на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов при азатиоприновой иммуносупрессии.

Эксперименты проведены на мышах-самцах линии F_1 (СВАхС57Bl/6) массой 18-20 г. Действие исследуемого средства было изучено на интактных животных, а также животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной цитостатиком азатиоприном, который вводили контрольной группе животных в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней. Настойку цимицифуги даурской вводили интактным животным и мышам, подвергнутым иммуносупрессии, в дозе 1 мл/кг перорально 1 раз в день в течение 14 дней.

Состояние макрофагального звена иммунного ответа оценивали в реакции фагоцитоза перитонеальных макрофагов в отношении частиц коллоидной туши. Оптическую плотность лизата клеток перитонеального экссудата, отражающую количество туши, поглощенной перитонеальными макрофагами, определяли при длине волны 620 нм.

При исследовании влияния настойки цимицифуги даурской на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов интактных мышей в отношении частиц коллоидной туши установлено, что данное средство не вызывает значимого изменения фагоцитарного индекса по сравнению с данными в интактной группе. При введении данного средства животным с иммунодефицитом наблюдали увеличение фагоцитарного индекса в 1,4 раза по сравнению с данными в контрольной группе.

Эффективность исследуемого средства обусловлена совокупным действием комплекса биологически активных веществ, преимущественно, тритерпеноидами, феноlкарбоновыми кислотами, обладающими выраженными иммуномодулирующими свойствами.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что настойка из корневищ с корнями цимицифуги даурской способна ослаблять супрессивное действие азатиоприна на макрофагальное звено иммунитета, что позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения с целью создания новых растительных иммуномодулирующих препаратов.

СКРИНИНГ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ МЕХАНИЧЕСКИМ ИЗМЕЛЬЧЕНИЕМ И СОРБЦИЕЙ НА ПОЛИМЕРНОМ НОСИТЕЛЕ

Гольдина И.А., Сафронова И.В., Душкин А.В., Гайдуль К.В.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Введение. Создание антибиотиков в форме наночастиц, сорбированных на полимерных носителях, с целью повышения их эффективности, является перспективным направлением современной фармакологии. Ряд антибиотиков группы цефалоспоринов обладает иммуномодулирующими свойствами различной степени выраженности, осуществляющимися как прямыми, так и опосредованными механизмами воздействия на иммунокомпетентные клетки. Установлено прямое влияние цефалоспоринов на нейтрофилы и макрофаги, а также опосредованное, через выделение продуктов распада бактериальной клетки, усиление фагоцитарных реакций, стимуляция хемотаксиса фагоцитов к очагу инфекции, повышение продукции ГМ – КСФ, подавление продукции провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками.

Цель. Выявление иммуномодулирующих свойств и антибактериальной активности модифицированных форм цефуроксима, цефотаксима и цефоперазона *in vitro*.

Материалы и методы. Механическая модификация официнальных форм антибиотиков (ОАО «Биосинтез, Россия) осуществлялась в высокоинтенсивных шаровых мельницах с одновременной иммобилизацией их на полимерном носителе – декстране 40кД (Sigma). Рентгенофазовый анализ композиции проводили на дифрактометре ДРОН – 3 (Россия), с использованием СиКα-излучения при скорости вращения счетчика 2 град/мин. Гранулометрический состав водных суспензий исходного и модифицированного порошка исследовали на лазерном гранулометре Micro-Sizer 201 (Россия) [2].

Пролиферативную активность мононуклеарных клеток крови (МНК) здоровых лиц оценивали *in vitro*, стандартным методом, по включению радиоактивной метки. Определение антимикробной активности антибиотиков – минимальной ингибирующей дозы (МИК), проводилось методом двукратных серийных разведений в мясопептонном бульоне, содержащем изучаемые препараты

в концентрациях от 128 до 0,03 мкг/мл. За МИК принимали наименьшую концентрацию антибиотика, подавляющую видимый рост микроорганизма. Использовали следующие контрольные штаммы бактерий: *Pseudomonas aeruginosa* АТСС № 27853 F-51, *Staphylococcus aureus* АТСС № 25923 F-49, *Escherichia coli* АТСС № 25922 F-50. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft, USA).

Результаты и обсуждение. В результате механохимической обработки смеси антибиотиков и декстрана ее частицы уменьшались до размеров наночастиц (40-100 нм) и формировали рыхлые агрегаты размером 5-50 мкм. Доля частиц антибиотиков наноразмерного диапазона после механохимической модификации составляла 25%.

Нативный и механически модифицированный декстран 40 кД не обладал ни антибактериальной, ни иммуномодулирующей активностью. Оценка пролиферации МНК выявила увеличение спонтанной пролиферации МНК под действием модифицированного цефоперазона с 291(244; 337) до 1302(1192; 1401) имп/мин, $p < 0,05$, (Me (25%; 75%), тогда как цефуроксим и цефотаксим не изменяли данного параметра. Механическая модификация цефоперазона и цефотаксима приводила также к повышению их антибактериальной активности, о чем свидетельствовало уменьшение МИК с 32,0 мкг/мл до 8,0 мкг/мл у цефотаксима и с 64,0 до 4,0 мкг/мл у цефоперазона в отношении изученных штаммов микроорганизмов *in vitro*. Предполагаемым механизмом повышения эффективности модифицированных антибиотиков является увеличение их биодоступности за счет большей растворимости, стабильности во внешней среде и более равномерного распределения внутри клетки.

Заключение. Механохимическая модификация цефоперазона с сорбцией на декстране 40кД приводит к увеличению его иммуномодулирующих свойств и антибактериальной активности *in vitro*, на основании изменения параметров спонтанной пролиферации иммунокомпетентных клеток и минимальной ингибирующей концентрации антибиотика, подавляющей рост контрольных штаммов микроорганизмов.

ВЛИЯНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ИЗ СЫРЬЯ *COLURIA GEOIDES (ROSACEAE)* НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ИММУННЫХ КЛЕТОК

Дутова С.В., Карпова М.Р.

Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, Абакан, Россия
Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

В качестве одного из основных направлений иммуностимуляции и иммуномодуляции рассматривается влияние на экспансию иммунокомпетентных клеток (Караулов А.В., Калюжин О.В., 2013). Описана корреляция между их пролиферацией и эффективностью иммунного ответа (Добродеева Л.К. и соавт., 2014).

В процессе доклинического изучения иммунотропных свойств эфирномасличных растений сибирской флоры была разработана фармацевтическая субстанция (субстанция Cg) из сырья *C. geoides*, обладающая иммуностимулирующим и иммунокорригирующим эффектом.

Исследуемую субстанцию (Cg) получали методом перколяции 40% этанолом, стандартизовали по выходу экстрактивных веществ (2,83±0,052%) и содержанию m-кумаровой кислоты (не менее 8,5%). В качестве препарата сравнения использовали настойку эхинацеи пурпурной (Е). Экспериментальную модель иммунодепрессии у мышей создавали однократным введением (вн/бр.) циклофосфана в максимально переносимой дозе (250 мг/кг).

Курсовое введение (5 дней) мышам-самкам линии СВА/CaLac субстанции Cg в дозе 50 мг/кг приводило к достоверному увеличению абсолютного числа лейкоцитов в образцах периферической крови в 1,2 раза (7,20 (6,80÷7,95) × 10^9/л) в сравнении с контролем (6,10 (4,25÷6,70) × 10^9/л). В группе животных, получавших препарат сравнения, – в 1,8 раза (10,83 (8,73÷13,65) × 10^9/л). Число спленоцитов селезенки не изменялось.

В условиях экспериментального иммунодефицита под влиянием субстанции Cg отмечали достоверное увеличение массы селезенки в 1,3 раза (до 0,097 (0,091÷0,120) г) в сравнении с контролем (0,074 (0,066÷0,097) г); а также числа спленоцитов селезенки в 1,7 раза (до 117,63 (100,56÷119,50) × 10^6 /орган) в сравнении с контролем (69,25 (66,50÷85,00) × 10^6 /орган). Причем число спленоцитов селезенки под влиянием субстанции Cg достоверно не отличалось от показателя животных контрольной группы без иммунодефицита (126,15 (101,30÷180,15) × 10^6/орган). То есть, субстанция Cg оказывала иммунокорригирующее действие при иммунодефиците, направленное на пролиферацию иммунных клеток. Введение животным настойки эхинацеи не оказало достоверного влияния на оцениваемые показатели.

Подобный эффект описан для водно-спиртового экстракта Эхиносол, который в гораздо большей дозе (300 мг/кг) способствует достоверному увеличению в перитонеальном экссудате животных количества моноцитов (на 32%) и лимфоцитов (на 83%) (Исайкина Н.В. и др., 2008). Выявленные эффекты исследуемой субстанции Cg проявляются в гораздо меньшей дозе.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНОГО ДЛЯ ПОДКОЖНОГО ВВЕДЕНИЯ

Иванов В.Б., Кудашева Э.Ю., Мосягин В.Д., Олефир Ю.В., Бондарев В.П., Борисевич И.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Потребность в препаратах иммуноглобулинов человека нормального (ИГЧН) в нашей стране и за рубежом остается высокой и постоянно возрастает. Препараты ИГЧН входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, применяются в различных областях практической медицины при первичных и вторичных иммунодефицитах, аутоиммунных и инфекционных заболеваниях.

В Российской Федерации зарегистрированы 14 препаратов ИГЧН для внутривенного введения (из них 9 зарубежного производства), в том числе 1 зарубежный препарат ИГЧН (Гамунекс®-С) в лекарственной форме «раствор для инфузий», предназначенный для внутривенного и подкожного введения. Подкожный путь введения лекарственного

препарата используется только при лечении первичного гуморального иммунодефицита у взрослых и детей (до 2 лет) на основании проведенных доклинических и клинических исследований. Подкожные инфузии обычно выполняются еженедельно, тогда как внутривенные – каждые 3-4 недели. Переход к подкожным инфузиям осуществляется после предшествующих внутривенных инфузий, исходя из которых рассчитывается стартовая доза. Препараты ИГЧН для подкожного введения имеют ряд преимуществ по сравнению с препаратами ИГЧН для внутривенного введения: возможность самостоятельного введения на дому, при затрудненном венозном доступе, при развитии системных нежелательных явлений (головная боль, повышение температуры, озноб, миалгии), большая независимость, лучший контроль и улучшение качества жизни за счет терапии на дому, методика подкожного введения легко осваивается пациентами.

Имеющиеся в настоящее время в России документы, содержащие требования к проведению доклинических и клинических исследований препаратов ИГЧН, в значительной степени устарели и не соответствуют современным руководствам Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА), которые берутся за основу при разработке нормативных правовых актов в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Разработка программ доклинических и клинических исследований ИГЧН для подкожного введения входит в компетенцию заявителей, которые могут использовать требования руководств ЕМА, в части, не противоречащей требованиям Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»: необходимо представлять отчеты о собственных доклинических и клинических исследованиях, проведению клинических исследований на детях должно предшествовать законченное поэтапное исследование I и III фаз на взрослых пациентах. Качество препарата должно соответствовать требованиям ФС.3.3.2.0008.15 «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения».

В доклинические исследования рекомендуется включить изучение острой и субхронической токсичности, местно-раздражающего действия и аллергенности. В качестве препарата сравнения может быть использован препарат ИГЧН, зарегистрированный в Российской Федерации.

При регистрации новых отечественных препаратов ИГЧН для подкожного введения рекомендуется проведение клинического исследования I фазы на здоровых добровольцах в целях установления безопасности и переносимости. В программу предрегистрационного клинического изучения препарата рекомендуется также включить открытое клиническое исследование III фазы у взрослых пациентов с первичным иммунодефицитом в течение 12 месяцев с оценкой эффективности, безопасности, фармакокинетических параметров и открытое клиническое исследование III фазы у детей с первичным иммунодефицитом. При разработке дизайна исследования, выборе первичных и вторичных конечных точек эффективности рекомендуется использовать подходы, изложенные в руководстве ЕМА «Guideline on the clinical investigation of human normal immunoglobulin for subcutaneous and/or intramuscular administration (SCIg/IMIg):EMA/CHMP/BPWP/410415/2011 rev 1».

При государственной регистрации препаратов ИГЧН заявитель обязан также представить план управления рисками, содержащий подробное описание мероприятий по фармаконадзору, направленных на выявление, оценку и предотвращение или минимизацию рисков, связанных с лекарственными препаратами, включая оценку эффективности данных мероприятий.

ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1

Ищенко А.М.[1], Шевцов М.А.[2], Щекина Е.Г.[3]

[1] ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
[2] Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
[3] Национальный фармацевтический факультет, Харьков, Украина

Введение. Нерегулируемое развитие воспаления является причиной возникновения большого числа серьезных патологий. Решающую роль в регуляции процессов воспаления играют цитокины, в частности интерлейкины-1, которые, как установлено экспериментально, являются ключевыми медиаторами воспаления, приводящего к тяжелым заболеваниям иммунной и центральной нервной систем организма. Положительные терапевтические эффекты при лечении воспалительных заболеваний могут быть достигнуты блокированием интерлейкина-1 с использованием рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL-1ra).

Цель и задачи. Цель работы заключалась в изучении терапевтического действия IL-1ra на моделях ряда заболеваний, индуцированных у грызунов.

Материалы и методы. 1. Модель гиперурикемии вызывали внутрибрюшинным введением оксоната калия в дозе 250 мг/кг. IL-1ra вводили в дозе 3 мг/кг и через 2 ч отбирали пробы крови из сосудов кончика хвоста. Гипоурикемическую активность оценивали по уровню мочевой кислоты (МК) в крови и моче.

2. Модель гиперлипидемии вызывали внутрибрюшинным введением холестерина в дозе 0,3 мг/кг и 5000 МЕ витамина D с кормом в течение 3 недель. Уровень гиперлипидемии оценивали по показателям: масса тела, массовые коэффициенты сердца (МКС) и печени (МКП), уровень общих липидов (ОЛ), холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), ЛПНП и ЛНВП, уровень АсАТ и АлАТ в крови; антиоксидантную активность – по содержанию ТБК-Р и ВГ в гомогенате печени.

3. Анксиолитическую активность IL-1ra изучали в тестах приподнятого крестообразного лабиринта и открытого поля, а также на модели резерпиновой депрессии. IL-RA вводили подкожно в дозах 5 мг/кг и 15 мг/кг. В качестве препаратов сравнения использовали анксиолитик диазепам и имипрамим соответственно. Регистрировали уровень тревожности, локомоторную и исследовательскую активности, гипотермию и блефароптоз.

4. Влияние IL-1ra на память изучали в сопоставлении с таковым пирацетама в тесте условной реакции пасивного избегания (УРПИ) на модели амнезии, вызванной внутрибрюшинным введением скополамина в дозе 1,5 мг/кг.

5. Модель церебральной эдемы выполнена на крысах Вистар (200-300 г), которым стереотактически под наркозом вводили клетки глиомы С6. IL-1ra вводили в/в в дозе 50 мг/кг.

6. Противосудорожную активность IL-1ra изучали на модели каразоловых судорог.

Результаты и заключение. 1. Показано, что противоподагрическое действие IL-1ra складывается из гипоурикемического, урикозурического, противовоспалитель-

ного и антиоксидантного эффектов, вследствие чего он может быть рекомендован в качестве эффективного препарата для лечения гиперурикемии и подагры.

2. Сочетание противовоспалительных, антиоксидантных и выраженных гиполипидемических свойств делает целесообразным применение IL-1ra при атеросклерозе и дислипидемиях как препарата, влияющего одновременно на все основные звенья патогенеза.

3. IL-1ra в тестах приподнятого крестообразного лабиринта и открытого поля проявляет анксиолитическое действие без угнетения ЦНС. На модели резерпиновой депрессии IL-1ra проявляет антидепрессивную активность на уровне имипрамина. Таким образом, IL-1ra может быть использован в терапии депрессий и неврозов.

4. Показано наличие у IL-1ra ноотропных свойств. Сочетание антиамнестической и противовоспалительной активности IL-1ra делает возможным использование препарата при болезни Альцгеймера и других заболеваниях ЦНС.

5. IL-1ra обладает противоотечным действием, задерживает рост опухоли, удлиняет время жизни экспериментальных животных.

6. Показано, что IL-1ra проявляет выраженный противосудорожный эффект и может быть использован в качестве противосудорожного препарата для лечения эпилепсии и др.

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Кажарова С.В., Коровкина Е.С., Костинов М.П.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. Внебольничная пневмония (ВП) – широко распространенное заболевание у взрослых, занимающее ведущее место в структуре заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний в развитых странах. Рост числа антибиотикополирезистентных штаммов микроорганизмов диктует необходимость поиска новых подходов к терапии и реабилитации больных с различными воспалительными заболеваниями системы органов дыхания.

Цель. Изучение иммунологической эффективности иммуномодулирующих препаратов у пациентов с тяжелой и среднетяжелой формами ВП.

Материалы и методы. В исследование вошло 60 пациентов в возрасте от 18 до 70 лет (средний возраст 53,15±3,18) с диагнозом «внебольничная пневмония среднетяжелого и тяжелого течения», находившиеся на госпитальном лечении с 2016-2017 гг. Пациенты были распределены на три группы, методом случайной выборки: 1 группа (n = 20) получали терапию препаратом Бронхо-ваксом в сочетании с базисной антибактериальной и симптоматической терапией; 2 группа (n = 20) получали препарат Азоксимера бромид в сочетании с базисной антибактериальной и симптоматической терапией; контрольная группа (n = 20) проводилась только базисная антибактериальная и симптоматическая терапия.

Проведенное обследование: клинический анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы и СОЭ на 1 и 13 дни заболевания. Для верификации диагноза пневмонии всем больным было проведено рентгенологическое исследование в 1 и 13 дни. Для оценки качества жизни все пациенты заполняли дневники самоконтроля. Также производился забор сыворотки для дальнейшего определения цитокинового профиля и острофазовых белков воспаления.

Результаты. При анализе данных клинического анализа крови выявлено: достоверное снижение количества лейкоцитов периферической крови во всех группах пациентов на 13 день заболевания, более выраженная динамика снижения уровней лейкоцитов наблюдалась в группе № 1. При анализе содержания палочкоядерных нейтрофилов более выраженная динамика снижения уровне наблюдалась в группе № 2. При анализе данных СОЭ более выраженная динамика снижения уровня наблюдалась в группе № 1.

Заключение. Применение азоксимера бромида и бронхо-ваксома является эффективным и безопасным средством коррекции иммунных нарушений при назначении по соответствующей схеме в комплексе с антибактериальными препаратами. При применении азоксимера бромида наблюдается более ранняя положительная динамика клинических симптомов, что позволяет сделать вывод о повышении эффективности лечения тяжелой пневмонии при включении азоксимера бромида в состав комплексной терапии. Использование препаратов азоксимера бромида и бронхо-ваксом повышает эффективность антибактериальной терапии, сопровождается положительной клинической динамикой. Таким образом, включение иммуномодуляторов в состав комплексной терапии ВП клинически обосновано.

ИЗУЧЕНИЕ ТРОМБОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ИНФУЗИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА КАК ОБЯЗАТЕЛЬНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОТЕРАПИИ

Корнилова О.Г., Борисевич И.В., Олефир Ю.В., Мовсесянц А.А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Вероятность возникновения тромбоэмболических осложнений, включая инсульт, инфаркт миокарда, тромбоэмболию легочной артерии и тромбоз глубоких вен/артерий, является нежелательным эффектом внутривенной иммуноглобулинотерапии. Ранее эти осложнения связывали исключительно с повышением вязкости крови при введении препарата, а возможным способом их исключения являлось соблюдение режима дозирования и скорости инфузии. В настоящее время установлено, что переносимость препаратов иммуноглобулинов человека, в числе прочего, зависит от содержания в них остаточных количеств факторов свертывания крови и от их влияния на кинетику образования тромбина. В связи с этим, международные и российские фармакопейные требования предусматривают необходимость доказательства отсутствия тромбогенного потенциала готовой формы препаратов иммуноглобулинов человека.

Цель. Обосновать параметры и критерии оценки тромбогенного потенциала и изучить соответствие препаратов иммуноглобулинов человека отечественного производства их значениям.

Материалы и методы. Образцы препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения отечественного производства, методы системного анализа и документальной экспертизы, клоттинговые и хромогенные методы.

Результаты. Для оценки тромбогенного потенциала препаратов обоснованы следующие параметры: изменение кинетики образования тромбина стандартной

(нормальной) плазмы крови человека в тесте генерации тромбина; активность прокоагулянтных факторов свертывания крови (II, VII, IX, X, XI); а так же изменение неактивированного частичного тромбопластинового времени стандартной плазмы крови человека. Критериями оценки являются максимальное количество тромбина в тесте генерации тромбина, не превышающее 350 нМоль, латентный период (лаг-фаза) генерации не менее 11 мин., период образования максимального количества тромбина – не менее 19 мин., активность фактора XIa, не превышающая 10 мМЕ/мл, факторов II, VII, IX, X и калликреина – менее 50 мМЕ/мл, а также отсутствие уменьшения времени образования сгустка в стандартной плазме крови человека. Выявлено, что в исследованных образцах препаратов иммуноглобулинов человека четырех отечественных производителей остаточное содержание факторов свертывания крови IX, IXa, VII не превышает установленный предел, активность факторов II и X не проявляется, установлено наличие в образцах антитромбина III в количестве более 1 МЕ/мл, латентный период генерации тромбина и период образования максимального количества тромбина не превышает 3 мин. Полученные результаты свидетельствуют о низком тромбогенном потенциале этих образцов.

Заключение. Обоснованные параметры и критерии могут быть использованы для подтверждения безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения в части оценки их возможного негативного влияния на свертывающую систему крови пациента. Тромбогенный потенциал изученных образцов препаратов иммуноглобулинов человека отечественного производства соответствует международным стандартам качества.

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПСОРИАЗА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 (IL-36ra) ЧЕЛОВЕКА

Колобов А.А.[1, 2], Кондратьева Е.В.[1], Кудлинг Т.В.[1], Карасев М.М.[1], Калинин Р.С.[1], Протасов Е.А.[1], Нимирицкий П.П.[1, 2], Стефанов В.Е.[1, 2], Александров Г.В.[1], Петров А.В.[1], Симбирцев А.С.[1]

[1] ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Генерализованный пустулезный псориаз (ГПП) – это редкая, в некоторых случаях смертельно опасная форма псориаза, которая вызывается рядом мутаций в гене рецепторного антагониста интерлейкина-36 (IL-36ra), сопровождающихся его сниженной экспрессией или активностью. Введение экзогенного IL-36ra могло бы применяться для лечения ГПП и других форм псориаза.

Цель и задачи. Цель данной работы – проведение доклинических исследований лекарственного средства для лечения псориаза на основе рекомбинантного IL-36ra человека. Задачи данной работы включали в себя создание плазмидных векторов для экспрессии гена IL-36ra, создание штамма-продуцента IL-36ra на основе *E. coli*, разработку методов очистки и хранения IL-36ra и доклинические исследования активности и токсичности IL-36ra.

Материалы и методы. Поскольку для полной биологической активности IL-36ra необходимо отщепление инициаторного остатка метионина, нами был получен штамм-продуцент IL-36ra на основе *E. coli*, трансформированный плазмидами, несущими гены IL-36ra и метионинаминопептидазы (МАП) *E. coli*. Была разработана методика культивирования штамма-продуцента IL-36ra в ферментерах. Была разработана схема хроматографической очистки IL-36ra на анионообменном сорбенте GE Q и гидрофобном сорбенте Tosoh Butyl-650. Была разработана композиция его готовой лекарственной формы. Была подобрана эффективная доза препарата. Были исследованы фармакокинетика и острая токсичность препарата на мышах, крысах и кроликах.

Результаты. Разработанная методика культивирования штамма-продуцента IL-36ra и его дальнейшей очистки позволяет получать с 1 литра бактериальной культуры до 40 мг очищенного IL-36ra с примесью < 5% его формы, содержащей неотщеплённый N-концевой остаток метионина. Показана способность полученного препарата IL-36ra купировать индуцированный псориазоподобный фенотип у мышей в дозе 0,5 мг/кг при подкожном введении. Дозы препарата до 200 мг/кг не токсичны для грызунов и зайцеобразных. Препарат апирогенен и не оказывает местно-раздражающего действия.

Заключение. Полученный препарат рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-36 (IL-36ra) человека эффективно купирует псориазоподобный фенотип у мышей и не демонстрирует острой токсичности в дозах до 200 мг/кг, что в тысячи раз превосходит расчетную терапевтическую дозу для человека. Методика получения IL-36ra пригодна для промышленного масштабирования. После окончания доклинических испытаний препарат может быть испытан на людях.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ АКТИВАТОРА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА В ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА

Кривых М.А., Корнилова О.Г., Жук И.Е.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Количественное определение содержания активатора прекалликреина является одним из ключевых показателей качества, определяющих специфическую безопасность таких инфузионных препаратов крови, как альбумин человека. С присутствием в указанных препаратах активатора прекалликреина связывают возможные нежелательные реакции в виде гипотензии. До настоящего времени лекарственные препараты альбумина человека отечественного производства не подвергались контролю качества на содержание активатора прекалликреина ни в процессе производства, ни при выпуске готового лекарственного препарата. Всемирная организация здравоохранения рекомендует проводить определение содержания активатора прекалликреина в препаратах крови человека, включая альбумин. Фармакопейной статьей «Альбумин человека» ФС.3.3.2.0006.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания впервые в отечественной фармацевтической практике установлены требования по содержанию активатора прекалликреина на уровне не более 35 МЕ/мл.

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ АКТИВАТОРА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА (К ТЕЗИСАМ КРИВЫХ М.А. И ДР.)

Группировочное наименование лекарственного препарата (концентрация)	№ образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл	
		хромогенный кинетический метод	хромогенный метод по конечной точке
Альбумин человека (10%)	1	5,3±0,3	5,8±0,4
Альбумин человека (10%)	2	1,1±0,1	1,9±0,2
Альбумин человека (10%)	3	4,7±0,2	4,7±0,3
Альбумин человека (10%)	4	Менее 1	Менее 1
Альбумин человека (10%)	5	Менее 1	Менее 1
Альбумин человека (10%)	6	9,1±0,6	14,7±0,7
Альбумин человека (20%)	7	5,4±0,4	5,9±0,5
Альбумин человека (10%)	8	9,1±0,6	9,5±0,5

Цель. Изучить количественное содержание активатора прекалликреина в лекарственных препаратах альбумина человека отечественного производства.

Материалы и методы. Использовали образцы лекарственных препаратов альбумина человека, раствор для инфузий, 100 мг/мл (10%) и 200 мг/мл (20%) отечественного производства; стандартный образец активатора прекалликреина в альбумине BRP EP CRS, серия № 3 (кат. № Y0000263). Использовали исследуемые образцы без предварительного разведения, раствор прекалликреина (American Diagnostica Gmbh, Кат. № ADG472) в разведении 1:100. Определение проводили хромогенным кинетическим методом и с оценкой по конечной точке. Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистическими методами с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($\overline{X}\pm S_x$).

Результаты. Проведено исследование количественного содержания активатора прекалликреина в образцах 8 серий лекарственных препаратов альбумина человека отечественного производства. Полученные значения содержания активатора прекалликреина составили менее 15,4 МЕ/мл (табл.), что соответствует фармакопейным требованиям, предъявляемым к данной группе лекарственных препаратов.

Заключение. Содержание активатора прекалликреина в изученных сериях лекарственных препаратов альбумина человека отечественного производства находится на уровне, позволяющем обеспечить их специфическую безопасность, и соответствует современным международным стандартам качества.

ИММУНОКОРРИГИРУЮЩАЯ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДА ИЗ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOALTEROMONAS NIGRIFACIENS* ПО ОТНОШЕНИЮ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Крылова Н.В., Смолина Т.П., Леонова Г.Н.

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия

Клещевой энцефалит (КЭ) относится к числу опасных нейровирусных инфекций, регистрируемых на Евразийском континенте. Для лечения пациентов с диагнозом КЭ лицензированных антивирусных препаратов до сих пор не существует. Установлена способность вируса КЭ (ВКЭ) модулировать иммунный ответ хозяина, что может оказывать решающее влияние на течение и исход заболевания (Robertson, 2009; Ye, 2013). В этой связи, актуальным является поиск противовирусных препаратов, которые могли бы не только ингибировать репликацию вируса, но и корригировать иммуносупрессию, индуцированную вирусом.

Цель. Комплексное изучение иммунокорригирующей и противовирусной активности капсульного полисахарида из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* в отношении вируса КЭ.

Материалы и методы. Капсульный полисахарид (КПС) получен в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Оценку уровня экспрессии мембранных молекул (CD69, HLA-DR, CD107a) на моноцитах, NK-клетках и $CD8^-$Т-лимфоцитах осуществляли стандартным методом двух- или трехцветного иммунофлюоресцентного окрашивания цельной крови здоровых доноров на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Противовирусную активность соединения оценивали по цитопатическому действию (ЦПД) вируса на монослой культуры клеток СПЭВ, инфицированных ВКЭ и обработанных КПС (в диапазоне от 10 до 12000 мкг/мл).

Результаты. Установлено, что через 24 ч после инфицирования лейкоцитов крови здоровых доноров вирусом КЭ (moi 0.01) в инфицированных пробах, необработанных КПС, процент вирус-положительных клеток составил 57±8%; в пробах, обработанных 100 мкг/мл КПС, обнаружено 11±4% вирус-инфицированных клеток. Добавление 100 мкг/мл КПС к образцам цельной крови, инфицированным ВКЭ, приводило к увеличению (в 1,3-2,6 раза) уровня экспрессии активационных маркеров CD69 и HLA-DR на моноцитах, NK- и CD8-клетках, по сравнению с необработанными инфицированными образцами ($p \le 0,05$). Кроме того, подобная обработка КПС инфицированных образцов крови повышала процент NK- и $CD8^+$ клеток, экспрессирующих маркер дегрануляции CD107a (до 8,3-10,2%), по сравнению с необработанными инфицированными образцами (1,1-2,3%).

Исследование противовирусной активности КПС в отношении ВКЭ показало, что на 6 сут после инфицирования культуры клеток СПЭВ тестируемый полисахарид (в концентрации 1000 мкг/мл) снижает титр вируса на

4,75 $\log_{10}TCID_{50}$/мл. IC_{50} данного полисахарида (концентрация, снижающая ЦПД вируса на 50% по сравнению с контролем) составила 814,5мкг/мл, SI (селективный индекс) – 13,4.

Заключение. Продемонстрирована *ex vivo* способность капсульного полисахарида из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* повышать активационный и цитотоксический потенциал клеток крови человека, сниженный под воздействием ВКЭ. Показана *in vitro* противовирусная активность этого полисахарида в отношении ВКЭ. Полученные данные об иммунокорригирующей и противовирусной активности КПС свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения этого гликополимера как перспективного противовирусного препарата в комплексной терапии КЭ.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ И АДЪЮВАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГЕРМАНИЯ И РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ОПЫТЕ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНАХ

Лаврентьева И.Н.[1, 2], Семенов А.В. [1, 3], Сухобаевская Л.П.[1, 2], Зарубаев В.В.[1, 2], Арсентьева Н.В.[1, 2], Амбросов И.В. [1, 2]

[1] ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[2] ООО «ВДС Фарма», Москва, Россия
[3] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Цель. Сравнение иммуномодулирующей и адъювантной активности препарата германия WDS-9 (АД1) и препарата растительного происхождения IMOD (АД2) при экспериментальной гриппозной инфекции у мышей.

В задачи исследования входило определение уровня протективной активности соединений АД1 и АД2 при экспериментальной летальной гриппозной инфекции; их прямого вирусингибирующего действия при экспериментальной нелетальной гриппозной инфекции и содержания в плазме крови животных опытных и контрольных групп некоторых иммунологических маркеров.

Использованы: вирус гриппа (ВГ), штамм A/Aichi/2/68 (H3N2); перевиваемая культура клеток MDCK; фармацевтические препараты сравнения – осельтамивир (тамифлю) или циклоферон. Исследование проведено на взрослых белых беспородных нелинейных мышах весом 14-16 г. В двух экспериментов мыши были распределены на 4 группы (n = 10 каждая), зараженные интраназально вирусом гриппа. За 1 день до заражения и один раз в сутки в течение 3 дней после инфицирования животным группы 1 вводили плацебо (контроль действия вируса); животным групп 2 и 3 – препараты АД1 или АД2; 4-й группы – препараты сравнения тамифлю или циклоферон. Препараты АД1, АД2 и препараты сравнения вводили внутрибрюшинно.

Результаты. Под действием IMOD отмечали снижение смертности мышей с индексом защиты, равным 20%, а также достоверное снижение репродукции вируса гриппа в легких мышей на 3-и сутки после инфицирования, когда титр вируса составил 3,9±1,9 $lgEID_{50}$/0,2 мл в опытной группе против 5,1±2,1 $lgEID_{50}$/0,2 мл в контрольной группе. Протективное и вирусингибирующее действие препарата WDS-9 не выявлено.

В группе мышей, инфицированных вирусом гриппа, через 7 суток после заражения отмечено нарастание количества NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов (CTL), а также B-клеток (CD19) при практически не измененных показателях активности Т-лимфоцитов (Т-клетки, Th-клетки). На 25 сутки после инфицирования на фоне снижения активности NK-клеток и CTL, регистрировали увеличение общего числа Т-клеток и Т-хелперов, а также дальнейший прирост количества В-клеток.

Под воздействием циклоферона напротив, отмечено снижение количества CTL на 7 сутки после заражения вирусом гриппа и более чем двукратный прирост их количества через последующие 18 суток (25 день после заражения мышей). Содержание NK-клеток через 7 суток незначительно повышалось, снижаясь через 25 суток наблюдения. Концентрация маркеров Т- и В-клеточного звена иммунитета повышалась к 25 суткам. Схожая динамика иммунного ответа наблюдалась у животных, получавших препарат IMOD.

В группе животных, получивших препарат WDS-9, наблюдали снижение содержания общего количества Т-клеток к 25 дню, при существенном нарастании количества В-клеток на этом же сроке наблюдения, что свидетельствует о стимулировании преимущественно гуморального компонента адаптивной иммунной системы. В пользу предположения о переключении иммунного ответа Th1 на Th2 говорит снижение содержания маркеров провоспалительного врожденного иммунного ответа (NK-клетки), а также отсутствие выраженной динамики изменения CTL в данной группе.

Заключение. Полученные результаты могут свидетельствовать о преимущественно протективном и прямом вирусингибирующем действии препарата IMOD и преимущественно адъювантом действии препарата WDS-9.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИСПЫТАНИЯ ПРИ ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Лысикова С.Л., Головинская О.В., Зубков Д.А., Мовсесянц А.А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

В настоящее время в клинической практике широко применяются биотехнологические препараты, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК, к качеству которых предъявляются серьезные требования. Физико-химические характеристики биотехнологических препаратов (подлинность, количественное и качественное содержание родственных соединений и примесей, молекулярно-массовое распределение и др.) не являются достаточными для прогнозирования проявлений их биологической активности, определяющих эффективность препаратов при клиническом применении. Оценка специфической биологической активности в тестах *in vitro* и *in vivo*, в свою очередь, позволяет количественно охарактеризовать фармакологическое действие лекарственного средства и направленно изучить механизмы его терапевтических эффектов, что свидетельствует о высокой важности этого показателя при оценке качества биотехнологических лекарственных препаратов.

Пригодность и надежность аналитической методики, используемой при оценке качества лекарственных средств, подтверждается ее специфичностью, чувствительностью, диапазоном аналитической области, устойчивостью, линейностью, достоверностью и прецизионностью. Устойчивость аналитической методики определяется как способность сохранять найденные для нее в оптимальных условиях характеристики при вероятных небольших отклонениях от этих условий проведения анализа. Согласно положениям ГФ XIII, устойчивость должна изучаться в тех случаях, когда методика основана на использовании особо чувствительных к внешним условиям методов анализа, однако не является обязательной характеристикой для всех методик количественного определения. Методики определения биологической (специфической) активности характеризуются особой чувствительностью к изменению внешних условий, что обусловлено участием в испытаниях различных биологических объектов, таких как культуры клеток, экспериментальные животные и др. Анализ факторов, влияющих на устойчивость аналитических методик определения биологической (специфической) активности биотехнологических лекарственных препаратов, показал, что результаты количественного определения при проведении испытаний на культурах клеток зависят от условий восстановления клеточной культуры, жизнеспособности клеток, концентрации клеточной суспензии, числа пассажей культуры клеток, условий и продолжительности хранения клеточной суспензии до момента использования в испытании, условий и продолжительности хранения питательных сред и растворов, продолжительности и условий инкубации на разных этапах проведения испытания, диапазона и шага разведения образцов, критериев пригодности, качества реактивов и материалов. Для указанных факторов должны быть определены диапазоны значений, в пределах которых их влияние на результаты анализа исключено, а также установлены критические условия и параметры, отклонение от которых недопустимо. При проведении испытаний *in vivo* важен выбор вида и линии животных, возраста, пола, массы тела, условий содержания, поставщика лабораторных животных и др. Особое внимание следует уделять установлению четких критериев приемлемости результатов испытания, а также использованию аттестованных стандартных образцов, положительного и отрицательного контроля. Все условия выполнения методики должны быть четко отражены в документах, регламентирующих проведение испытаний по оценке качества лекарственных препаратов по показателю «Специфическая (биологическая) активность».

Учитывая особую чувствительность биологических объектов, изучение устойчивости должно быть обязательным при подтверждении пригодности методов оценки специфической активности биотехнологических лекарственных средств. Это особенно важно на этапе разработки препаратов, оценки их качества, выбора метода для обоснования включения в спецификацию, что в конечном итоге должно обеспечить высокий уровень качества указанной группы препаратов при их внедрении и дальнейшем использовании в практической медицине.

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ АКТИВИРУЮЩЕГО РЕЦЕПТОРА NK-КЛЕТОК NKG2D РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ MICA

Лысюк Е.Ю.[1, 2], Шуленина Е.А.[3], Посвятенко А.В.[1, 2, 4], Кибардин А.В.[1, 2], Абакушина Е.В.[5]

[1] Институт биологии гена РАН, Москва, Россия
[2] Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия
[3] Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
[4] ФГБОУ «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[5] Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Обнинск, Россия

Одним из важных активирующих рецепторов NK-клеток является рецептор NKG2D, необходимый для обнаружения и уничтожения трансформированных и инфицированных клеток. Лигандами для NKG2D являются, в том числе, стресс-индуцируемые неканонические молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса MICA/B. Эти белки отсутствуют или слабо экспрессируются в большинстве нормальных клеток, в то время как в опухолевых и инфицированных вирусами клетках их количество существенно повышено. Взаимодействие NKG2D с молекулами MIC играет важную роль в регуляции противоопухолевых иммунных реакций и может способствовать ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора.

Цель. Оценка блокирующего эффекта растворимого рекомбинантного человеческого белка MICA (rhsMICA) на активирующий рецептор цитотоксических лимфоцитов человека NKG2D. Для этого оценивали фенотипические изменения лимфоцитов крови человека при кратковременном воздействии на них различных концентраций rhsMICA.

Материалы и методы. Исследование проводили на лимфоцитах периферической крови 12 здоровых доноров. Периферическую кровь выделяли в градиенте плотности фиколла (r = 1,077, GE Healthcare) фракцию мононуклеарных клеток (ПМК) обрабатывали различными концентрациями рекомбинантного MICA человека (rhsMICA, ЗАО «Протеинсинтез», Россия) в течение 30 минут, в качестве контроля использовали ПМК, инкубировавшиеся в тех же условиях, но без добавления rhsMICA. В обработанных и контрольных ПМК оценивали субпопуляционный состав Т- и NK-лимфоцитов, для чего проводили цитофлуориметрический анализ клеток, окрашенных антителами к CD3, CD56, CD16, CD314 (NKG2D), CD25, CD69, анализ проводили на проточном цитофлуориметре FC 500 MPL (Beckman Coulter).

Результаты. Обработка ПМК различными концентрациями MICA (5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 нг/мл и 100 пг/мл) не влияла на количество $CD3^-CD56^+$ NK-клеток (8,2±7,2%, 9,0±4,7%, 11,2±6,9 и 14,2±6,4% соответственно против 11,2±5,6% в контроле). В то же время инкубация с MICA 5 мкг/мл существенно снижала долю $NKG2D^+$NK-клеток (33,7±20,7% по сравнению с 51,9±19,5% в контроле, $p < 0,05$). Количество $NKG2D^+$ NK-клеток при инкубации

с меньшими концентрациями MICA не отличалось от таковых в контроле (48,1±10,5%, 60,3±19,3% и 58,7±19,2% для MICA 1 мкг/мл, 10 нг/мл и 100 пг/мл соответственно), хотя во всех случаях достоверно ($p < 0,05$) отличалось от лимфоцитов, инкубировавшихся с MICA 5 мкг/мл. Кроме донорских ПМК, оценивали экспрессию этих маркеров в ПМК, активированных *in vitro* коктейлем цитокинов (IL-2, IL-15) в течение 3 дней. В этом случае доля $NKG2D^+$ NK-клеток составляла 84% и не наблюдалось снижения их количества при кратковременной обработке различными концентрациями MICA. При оценке активационного статуса ПМК доноров было обнаружено, что обработка MICA 5 мкг/мл вдвое увеличивала количество NK-клеток, несущих одновременно маркеры ранней и поздней активации ($CD16^+CD69^+CD25^+$): 35,7±22,2% по сравнению с 17,1±16,4% в контроле. Обработка более низкими концентрациями MICA также увеличивала количество активированных NK-клеток, хотя и в меньшей степени.

Заключение. Показано, что кратковременная обработка лимфоцитов rhsMICA приводит к активации цитотоксических лимфоцитов и одновременно значительно снижает экспрессию на них рецептора NKG2D, при этом изменения носят дозозависимый характер. В то же время после активации цитокинами лимфоциты становятся, по всей видимости, более устойчивыми к ингибирующему воздействию rhsMICA, в результате чего значимого снижения экспрессии NKG2D на активированных NK-клетках не происходит. Данный факт дает предпосылки к использованию активированных NK- клеток для адоптивной иммунотерапии онкологических больных с MICA-позитивными опухолями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации №НШ-9069.2016.4.

КОРРЕКЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВАКЦИНАЦИИ

Медуницын Н.В., Олефир Ю.В., Меркулов В.А.

Научный центр экспертизы средств медицинского применения Министерства здравоохранения РФ. Москва, Россия

Предполагается, что со временем иммунная система людей стала слабее реагировать на разные патогенны. Причинами такой слабости иммунной системы являются неблагоприятные условия жизни населения, урбанизация, широкое применение антибиотиков, ослабление естественной иммунизации людей циркулирующими в среде микроорганизмами, частые случаи врожденной и приобретенной иммунологической недостаточности. Иммунная система ребенка недостаточно развита, хотя в течение первого года жизни ему вводят до двух десятков доз разных вакцин. Это мера вынужденная, учитывая высокую инфекционную заболеваемость в раннем детском возрасте.

Существующий порядок вакцинации с усредненными дозами вакцин и жесткими схемами их введения уравнивают условия иммунизации граждан и рассчитаны на среднего по иммунологической активности человека. Иммунологические особенности отдельных лиц и наличие у людей многочисленных вариантов иммунного ответа на одну и ту же вакцину свидетельствуют о необходимости разработки принципов и методов персонализации вакцинации.

Среди вакцинированных всегда имеются группа лиц, не отвечающих на вакцину или слабо реагирующих на нее. Эта группа требует особого внимания, во многих случаях она является источником формирования бактерионосительства (вирусоносительства) и поддержания инфекционной заболеваемости. В первую очередь индивидуальную вакцинацию следует распространить на группы лиц повышенного риска, иммунитет которых после вакцинации в большом проценте случаев не достигает защитного уровня.

Коррекцию вакцинации можно проводить с помощью подбора вакцин (живые, убитые, расщепленные, субъединичные), выбора доз и схем введения вакцин или дополнительной стимуляции иммунного ответа. Для повышения иммуногенности вакцин применяют адъюванты, средства доставки вакцин и носители, конъюгированные с антигеном.

Вторую группу составляют лица с очень высокой иммунологической реакцией на конкретную вакцину, такие лица не нуждаются в повторном введении того же антигена, так как гипериммунизация имеет свои отрицательные стороны.

В идеале иммунологическая коррекция вакцинации может обеспечить формирование достаточного иммунитета у каждого прививаемого человека. Благодаря внедрению методов иммунологической коррекции лица, не отвечающие на вакцины, и слабо реагирующие лица, будут защищены от инфекций, а другая часть населения будет избавлена от излишней иммунизации.

Персонализация вакцинации ускорит развитие коллективного иммунитета, повысит эффективность проводимых мероприятий по вакцинопрофилактике и решит многие вопросы медицинской этики, связанные с вакцинацией. Все изменения порядка вакцинации в связи с ее индивидуализацией должны быть обоснованы и утверждены в установленном порядке.

ОТНОСИТЕЛЬНОСТЬ УСПЕХА ПРИ ИММУНОТЕРАПИИ IL-2 В СПОНТАННОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *IN VIVO*

Моисеева Е.В., Семушина С.Г., Аронов Д.А.

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

Введение. Результаты иммунотерапии интерлейкином-2 (ИТ-IL-2) являются противоречивыми как в клинике рака молочной железы (РМЖ), так и в эксперименте. Ранее мы показали, что после однократного локально применения IL-2 ($2,5 \times 10^6$ МЕ, высокая доза, ВД) улучшалось выживание мышей в различных перевиваемых мышиных моделях РМЖ с коротким латентным периодом (видимое проявление в течение 2-х нед. после перевивки). Далее мы разработали критерии оценки эффективности ИТ-IL-2 в спонтанной модели РМЖ BLRB, выделяя субклиническую (пальпируемые опухоли до 4 мм в диаметре) и клиническую (более 4 мм) стадии прогрессии индивидуальной спонтанной опухоли. Момент перехода считали точкой клинического проявления опухоли (КПО), после КПО различали быстрый и медленный рост. Опухоли, которые в течение 2-х нед. и дольше находились на субклинической стадии роста,

относили к суб$^+$ (высокодифференцированная аденокарцинома), тогда как опухоли с коротким субклиническим периодом – к суб$^-$ (~⅔ всех обнаруженных случаев РМЖ, низкодифференцированные карциномы).

Цель. Выявить когда, как и к кому следует применять ИТ-IL-2 в модели BLRB с целью получения максимального терапевтического эффекта.

Материалы и методы. Применяли перитуморально (пт) однократно высокую (ВД × 1) или низкую дозу (2,5 × 10^5 МЕ, НД × 1) или трехкратно еженедельно интратуморально (ит) низкую дозу (НД × 3) IL-2. Результаты оценивали индивидуально (мышь = пациент) и в среднем по группе. Эксп. 1. ВД IL-2 ввели пт однократно одновременно всем рожавшим и девственным самкам разного возраста с разной стадией прогрессии суб$^+$ (n = 7) и суб$^-$ (n = 16) РМЖ, исторический контроль – 65 самок (7 суб$^+$ и 58 суб$^-$). Динамику роста опухоли и выживания оценивали в целом по группе от КПО, а также среди суб$^+$ и суб$^-$ РМЖ отдельно от первичного обнаружения РМЖ. Эксп. 2. НД × 3 IL-2 вводили всем суб$^+$ и суб$^-$ самкам после первичного обнаружения РМЖ (n = 33). Сравнили продолжительность субклинического периода, долю опухолей с быстрым после КПО ростом и выживание с соответствующими параметрами самок исторического контроля (n = 114). Эксп. 3. НД × 1 пт IL-2 (n = 6) и НД × 3 ит (n = 8) вводили стандартизованным по возрасту (~65 нед.) и начальному размеру РМЖ (5-7 мм в течение 2-х нед. после первичного обнаружения РМЖ) самкам-опухоленосителям. Текущему контролю со сходными параметрами (n = 7) одновременно вводили растворитель.

Результаты. Эксп. 1. ВД ИТ-IL-2 вызвала в среднем 2-нед. задержку роста РМЖ на разных стадиях прогрессии и улучшение выживания по сравнению с историческим контролем, считая от КПО. Однако динамика общей продолжительности жизни (считая от первичного обнаружения РМЖ) не была улучшена для суб$^+$ опухоленосителей. Применение ВД к суб$^-$ быстрорастущим после КПО РМЖ после 4-х нед. и позднее было неэффективным. Эксп. 2. Применение НД × 3 пт IL-2 после первичного обнаружения опухоли привела к уменьшению доли быстрорастущих РМЖ в среднем в 2 раза и улучшению динамики выживания всей пролеченной группы при одновременном укорочении индивидуального субклинического периода. Эксп. 3. Применение НД × 3 ИТ IL-2 вызвало замедление роста опухоли в среднем по группе и полное отторжение опухоли у 2 из 8 пролеченных самок, при этом выживание остальных было хуже, чем в контроле. Введение НД × 1 пт IL-2 привело к замедлению роста опухоли и улучшению выживания в среднем по группе, но ни одна самка не была вылечена.

Заключение. В каждом эксперименте был обнаружен позитивный эффект IL-2, однако, с определенными ограничениями, связанными со стадией прогрессии и скоростью проявления и роста спонтанного РМЖ. Было выяснено, когда, как и к кому следует применять ИТ-IL-2 с целью полного отторжения РМЖ. Остается риторическим вопрос, к чему следует стремиться: улучшить показатели в среднем по группе или полностью излечить отдельных пациентов при ухудшении выживания у всех остальных пролеченных по сравнению с контролем?

О ПРИМЕНЕНИИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМЕННЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Никитюк Н.Ф., Гаврилова Н.А., Обухов Ю.И., Саяпина Л.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Препараты факторов свертывания крови (ФСК) используются в качестве заместительной терапии при дефиците эндогенных факторов свертывания крови в организме человека. Концентраты ФСК, полученные из плазмы крови человека характеризуются высокой степенью клинической эффективности и представляют наименьшую опасность для применения у пациентов. Наиболее распространенные виды гемофилии связаны с дефицитом плазменного антигемофильного глобулина А (фактор VIII) или плазменного тромбопластинового компонента (фактор Кристмаса, фактор IX).

В Российской Федерации зарегистрированы 24 препарата плазменных ФСК, из них 3 препарата отечественного производства: Агемфил А, Агемфил В и Криопреципитат, остальные препараты из числа плазменных ФСК производятся зарубежными компаниями (Коэйт-ДВИ, ЛонгЭйт, Октанат, Фанди, Бериате, Гемоктин, Эмоклот Д.И., Гемофил М, Иммунат, Октанайн, Мононайн, Анимафикс, Репленин-ВФ, Иммунин, Вилфактин, Гемате П, Вилате, Протромплекс, Уман Комплекс Д.И., Фактор VII). Большинство из указанных препаратов ФСК человека внесены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для оказания медицинской помощи и включены в Федеральную программу «Семь нозологий». Наиболее часто в практическом здравоохранении для остановки кровотечения при гемофилии А используются плазменные концентраты фактора VIII высокой степени очистки: Иммунат, Коэйт-ДВИ, Эмоклот, Гемоктин, Октанат, Бериате, Гемофил М. При гемофилии В чаще применяют плазменные концентраты фактора IX – Аймафикс-ДИ, Уман-комплекс-ДИ, Иммунин, Октанайн, Агемфил-В, Мононайн [4].

Преимуществом и отличительной особенностью плазменных факторов по сравнению с их рекомбинантными аналогами является гомологичность активных компонентов, входящих в состав препарата, что снижает риск развития аллергических реакций при их применении.

Наиболее часто в практическом здравоохранении для остановки кровотечения при гемофилии А используются плазменные концентраты фактора VIII высокой степени очистки: Иммунат, Коэйт-ДВИ, Эмоклот, Гемоктин, Октанат, Бериате, Гемофил М. При гемофилии В чаще применяют плазменные концентраты фактора IX – Аймафикс-ДИ, Уман-комплекс-ДИ, Иммунин, Октанайн, Агемфил-В, Мононайн.

На российском рынке представлены все основные группы плазменных факторов свертывания крови, зарегистрированные в мире. Оценка их качества и основных показателей (активность, подлинность и чистота) проводится в соответствии с частными фармакопейными статьями, а безопасность гарантируется наличием государственной системы обращения препаратов крови, обеспечивающей соблюдение надлежащих условий при разделении, хранении и транспортировке плазмы; скрининг доноров крови, в том числе оценка риска заражения при-

онами, выполнением современных требований по обеспечению вирусной безопасности препаратов крови.

Для обеспечения возможности обоснованного выбора препарата с целью лечения пациентов разных возрастных групп с учетом тяжести заболевания необходимо разработать единые требования к оценке эффективности и безопасности плазменных ФСК.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ДЕФОРМИРУЮЩЕГО ОСТЕОАРТРОЗА: РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОМЕЖУТОЧНОГО АНАЛИЗА

Ница Н.А., Старостина Н.М., Попова Н.Д., Баранов С.И., Кожевников Ю.А., Чумасова О.А., Шевела Е.Я., Останин А.А.

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

Введение. Одно из новых направлений в лечении деформирующего остеоартроза (ДОА) связано с использованием различных клеточных технологий, в том числе с использованием стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани. Клетки СВФ оказывают противовоспалительный и иммуномодулирующий эффекты и способны дифференцироваться в клетки соединительной ткани, включая хрящи, сухожилия и связки

Цель. Оценить безопасность и клиническую эффективность аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции (СВФ) у пациентов с деформирующим остеоартрозом (ДОА) коленных суставов.

Материалы и методы. В исследование были рекрутированы 16 пациентов (6 мужчин и 10 женщин в возрасте от 50 до 82 лет; медиана 64,8) с первичным ДОА коленных суставов, Rg стадия II (n = 6), II-III (n = 8) и III (n = 2), НФС I ст. (n = 2) и II ст. (n = 14). Основную группу составили 10 пациентов (4 мужчин и 6 женщин); в группу контроля вошли 6 пациентов (2 мужчин и 4 женщины), сопоставимые по возрасту, давности и тяжести основного заболевания, характеру сопутствующей патологии. Оценку болевого синдрома проводили по визуально-аналоговой шкале (ВАШ), функциональную активность суставов оценивали по специализированной шкале KOOS. Пациентам основной группы однократно, интраартикулярно, под УЗИ-навигацией, вводили аутологичные клетки СВФ (в среднем $17{,}2 \pm 1{,}8 \times 10^6$ клеток на сустав), пациентам контрольной группы – препарат гиалуроновой кислоты Синокром-форте One (4 мл).

Результаты. У пациентов основной группы внутрисуставное введение клеток СВФ не вызывало развития аллергических, токсических или воспалительных реакций. У 9/10 пациентов (90%) случаев было выявлено статистически достоверное снижение болевого синдрома, оцениваемого по ВАШ. Более того, клеточная терапия сопровождалась положительной динамикой функциональной активности суставов, которая регистрировалась уже через 1 мес после введения клеток и сохранялась до 6 мес наблюдения. Оценка функционального статуса суставов и качества жизни по шкале KOOS продемонстрировала снижение выраженности основных симптомов заболевания, включая болевой синдром (на 53%, $p < 0{,}05$) и функциональные возможности пораженных суставов (на 76%, $p < 0{,}05$). Наряду с этим, отмечалось статистически значимое уменьшение затруднений в выполнении повседневной деятельности, связанное с пораженным суставом (на 35%), повышение возможности занятий спортом (в 2 раза) и улучшение качества жизни в целом (в 2,6 раза). При этом клиническое улучшение сопровождалось положительной динамикой по данным УЗИ суставов, которая регистрировалась у 7 из 10 пациентов и проявлялась увеличением толщины гиалинового хряща (с 1,03 мм до 1, 46 мм). У пациентов контрольной группы внутрисуставные инъекции препарата гиалуроновой кислоты также приводили к снижению болевого синдрома и выраженности основных симптомов ДОА в первые 3 мес наблюдения. Однако позитивные изменения в этой группе носили нестойкий характер и не выявлялись при наблюдении через 6 мес.

Заключение. Результаты проведенного клинического исследования свидетельствуют о безопасности и хорошей переносимости внутрисуставного введения аутологичных клеток СВФ у пациентов с выраженными проявлениями ДОА.

ФРАГМЕНТИРОВАНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПАПАИНА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ КОМБИНИРОВАННОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА

Новикова Л.И.[1], Волков А.В.[1], Пескарёв В.Е.[2], Алёшкин В.А.[1], Зуева М.М.[1], Панурина Р.Л.[1], Матвеевская Н.С.[1], Синчугова Т.В.[1]

[1] ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия
[2] Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

Введение. При разработке назальной формы комплексного иммуноглобулинового препарата (КИП), содержащего IgG, IgA и IgM человека, возникла необходимость включения в его состав фрагментов иммуноглобулинов для повышения эффективности КИП при респираторных инфекциях за счет усиления иммуномодулирующей активности.

Цель и задачи. Цель работы – подбор оптимального метода ферментативного расщепления иммуноглобулинов. Задачи исследования – расщепление IgG, IgA и IgM, входящих в состав КИП, на фрагменты с помощью синтезированного сорбента (иммобилизованный папаин), а также сравнение расщепляющей способности сорбентов с разным содержанием фермента.

Материалы и методы. Для получения иммобилизованных папаина в качестве исходного носителя использовали полимерный гидрофильный макропористый сорбент, содержащий гидроксильные группы – Toyopearl HW-65 (фирма «Tosoh», Япония). Toyopearl HW-65 активировали с помощью бифункционального реагента – эпихлоргидрина, затем обрабатывали аммиаком и модифицировали глютаровым альдегидом. Это давало возможность проводить пришивку фермента по аминогруппе в мягких условиях. Количество пришитого папаина составляло 1 или 10 мг на 1 мл геля. Ферментативное расщепление иммуноглобулинов проводили batch методом при инкубировании и встряхивании в термостате (+37 °C) в течение 5 ч.

Результаты. Иммуноэлектрофореграммы и хроматограммы показывают, что в растворах, полученных после взаимодействия КИП с иммобилизованным папаином, содержатся как полноценные молекулы иммуноглобулинов, так и их низкомолекулярные фрагменты. При использовании сорбента с 10 мг папаина в 1 мл геля сте-

пень расщепления иммуноглобулинов примерно в 10 раз выше, чем при использовании сорбента с 1 мг фермента на 1 мл (2-5% оставшихся нерасщепленными молекул иммуноглобулинов всех исследованных изотипов против 20-30% соответственно).

Заключение. Таким образом, на первом этапе исследований по разработке комбинированных форм иммунобиологических препаратов на основе КИП, был синтезирован сорбент с иммобилизованным папаином, проведены эксперименты по расщеплению иммуноглобулинов с помощью этого сорбента и анализ полученных образцов. Уровень расщепления иммуноглобулинов напрямую зависит от количества папаина, иммобилизованного на сорбенте.

НОВАЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ КОМПОЗИЦИЯ С БЕТАЛЕЙКИНОМ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА

Саркисян Н.Г., Ронь Г.И., Тузанкина И.А.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», Екатеринбург, Россия
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия
ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» , Екатеринбург, Россия

По данным ВОЗ, распространенность заболеваний пародонта встречается более чем у 90% взрослого населения. Для лечения и реабилитации пациентов с пародонтитом предложено множество методов и средств, однако проблема достижения стойкой ремиссии до настоящего времени остается нерешенной.

Нами было проведено клинико-рентгенологическое исследование на базе кафедры терапевтической стоматологии УГМУ г. Екатеринбурга в период с 2011 по 2016 г., целью которого явилось определение клинической эффективности лечения хронического генерализованного пародонтита с применением медикаментозной композиции глицерогидрогеля кремния с иммуномодулятором беталейкином. В исследовании приняли участие 75 пациентов с диагнозом «Хронический генерализованный пародонтит» в стадии ремиссии.

Пациентам основной группы (45 человек) на этапе медикаментозного лечения на десну и в пародонтальные карманы наносили композицию с глицерогидрогелем кремния и беталейкином – 1 в день, 10 процедур, предварительно инстиллируя теплой водой, а пациентам группы сравнения (30 человек) – препарат «Аекол».

Анализ клинической симптоматики позволил сделать заключение, что в группе пациентов, получавших композицию с беталейкином в стадии ремиссии, через 6 и 12 месяцев после лечения гигиеническое состояние полости рта оставалось на хорошем уровне, наблюдались динамические признаки улучшения состояния тканей пародонта, отсутствовала кровоточивость, незначительно уменьшилась глубина пародонтальных краманов.

В группе, пролеченной по традиционной схеме с препаратом «Аекол», наблюдалось ухудшение гигиенических показателей, увеличение значений индекса воспалительного процесса, кровоточивость, отек десны, незначительное увеличение глубины пародонтальных карманов.

По данным рентгенологического исследования в основной группе, в отличие от группы сравнения, через 6 и 12 месяцев отмечалось уменьшение и местами исчезновение очагов остеопороза.

Продолжительность ремиссии при лечении по традиционной схеме, без включения топических композиций составила 5 месяцев, при использовании композиции с беталейкином – 10 месяцев.

Таким образом, применение препарата глицерогидрогеля кремния в композиции с беталейкином в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита в стадии ремиссии позволило получить более высокий терапевтический эффект, чем тот, который был достигнут в случае применения только лекарственных препаратов, без предложенной композиции.

По данному исследованию получен патент РФ № 2470640, 2012 г. «Средство для лечения воспалительных заболеваний полости рта и способ лечения воспалительных заболеваний полости рта».

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ИЗБЫТОЧНОГО АДГЕЗИОГЕНЕЗА

Снимщикова И.А., Медведев А.И., Шохина М.Д., Честнихина А.Д., Афонина И.А.

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», Медицинский институт, Орёл, Россия

Введение. Одной из актуальных проблем абдоминальной хирургии остается профилактика образования спаек после воспалительных заболеваний органов малого таза и оперативных вмешательств, поскольку спаечный процесс может стать причиной кишечной непроходимости, тазовых болей, бесплодия и внематочной беременности у женщин. Данные исследований патогенеза спаечного процесса, критериев ранней диагностики и прогноза, несмотря на многочисленность, достаточно противоречивы, что не позволяет разработать стройную лечебно-диагностическую концепцию. Известно, что на развитие и исход репаративного процесса после операционной травмы в первую очередь влияет локальная реакция клеток воспаления и состояние местного звена иммунитета, контролирующего дифференцировку клеток-предшественников в фибробласты и регулирующих их активность. Исследованиями последних лет показано, что одним из перспективных способов предупреждения патологического адгезиогенеза после оперативных вмешательств может быть ускорение процессов репаративной регенерации раны путем воздействия на первичный локально-воспалительный процесс, ведущую роль в обеспечении которого играют перитонеальные макрофаги и продуцируемые ими медиаторы.

Цель и задачи. Целью работы явилось экспериментальное обоснование применения глюкозаминилмурамилдипептида, являющегося действующим веществом препарата ликопид, в профилактике и лечении спаечных процессов брюшной полости. Задачи исследования: исследовать метаболическую активность перитонеальных макрофагов больных со спаечным процессом (спонтанную и стимулированную продукцию оксида азота; антимикробных пептидов: кателицидина LL-37, лактоферрина, миелопероксидазы; воспалительных и противовоспалительных цитокинов: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, TGF-β); изучить *in vitro* влияние глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) на функциональную активность пе-

ритонеальных макрофагов больных с различной степенью выраженности спаечного процесса.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением находились 105 пациентов со спаечным процессом органов брюшной полости различной степени выраженности (средний возраст 39,7±3,5 лет). Перитонеальную жидкость получали на диагностическом этапе лапароскопии путем активной аспирации, а затем центрифугировали в течение 10 минут при 1500 об./мин. Осадок, представляющий собой клеточную суспензию, использовали для цитологического исследования и выделения перитонеальных макрофагов, которые получали путем культивирования в пластиковых планшетах в среде RPMI-1640 при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в течение 2 часов. Неприлипшие клетки удаляли 3-х кратным промыванием средой 199. Прилипающие клетки, около 90-95% которых составляли перитонеальные макрофаги, ресуспендировали в полной среде RPMI-1640 в концентрации 2 млн/мл и использовали в соответствии с целью эксперимента. Концентрацию стабильного метаболита оксида азота (нитрита) в пробах определяли спектрофотометрически с помощью реактива Грисса. Продукцию миелопероксидазы оценивали по методике Азнабаевой Л.Ф. с расчетом показателя пероксидазной активности исследуемой биологической жидкости. Определение концентрации кателицидина LL-37 и лактоферрина проводилось методом твердофазного ИФА с помощью набора реагентов Hbt (Нидерланды), ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Концентрацию цитокинов в перитонеальной жидкости и культуральной среде оценивали методом твердофазного ИФА с помощью набора реагентов ООО «Протеиновый контур», ООО «Цитокин» и DRG (Germany).

Результаты. Проведенные исследования показали, что у большинства пациентов с избыточным адгезиогенезом отмечалось снижение уровня метаболитов NO, повышение продукции TGF-β, IL-10, кателицидина LL-37, лактоферрина и миелопероксидазы в перитонеальной жидкости и супернатантах культивируемых перитонеальных макрофагов. При этом ГМДП в оптимальных концентрациях оказывал иммуномодулирующее действие на функциональную активность макрофагов больных со спаечным процессом различной степени выраженности.

Заключение. Глюкозаминилмурамилдипептид обладает иммуномодулирующим действием на функциональную активность перитонеальных макрофагов, что обосновывает возможность применения препарата ликопид при патологии органов брюшной полости с целью предупреждения избыточного адгезиогенеза.

ПРОБЛЕМЫ БЕЗОПАСНОСТИ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИНТЕРФЕРОНОВ

Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Медуницын Н.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Среди биотерапевтических препаратов наиболее широко применяемой в клинике группой препаратов являются препараты интерферонов (IFN), применяемые для лечения гепатитов В и С, некоторых опухолей (лейкоз, саркома Капоши), рассеянного склероза. Для повышения эффективности препаратов используются модификации молекул IFN полиэтиленгликолем. Применение препаратов IFN часто сопровождается развитием таких побочных реакций (ПР) как вирусные, грибковые, бактериальные инфекции, анемия, нейтропения, лейкопения, тромбоцитопения, гипотериоз, гипертиреоз, дерматит, псориаз, крапивница, экзема, миалгия и др., а у детей еще и новообразования, гиперкинезии, нарушение функции печени, энурез, задержки роста и др. Нечасто лечение препаратами IFN может вызвать развитие таких тяжелых ПР, как гломерулосклероз, липоидный нефроз, гломерулонефрит и гломерулопатия, эритроцитарная аплазия, тромбоцитопеническая пурпура, саркидоз, ревматоидный артрит, васкулит, мононейропатия, пептическая язва, панкреатит, некролиз, синдром Стивена-Джонсона, гемолитический уремический синдром (даже с летальным исходом) и др. Появление антител (Ат) к препарату сопровождается снижением его эффективности. Механизмы развития многих ПР до конца не изучены. С одной стороны, развитие данных осложнений связано с иммуномодулирующими свойствами IFN, т.к. он является очень активным цитокином системы иммунитета. С другой стороны, в развитии ПР основную роль могут играть Ат к препарату.

Развитие иммунного ответа на введение препаратов IFN связано со многими особенностями биологических свойств самого IFN и особенностями препарата IFN, которые обусловлены системой экспрессии рекомбинантного белка, производственного процесса, состава препарата, условий хранения и транспортирования. IFN, как цитокин, обладает способностью стимулировать выработку Ат. Экспериментально показано, что препараты на основе IFN человека, вводимые с другими белками, вызывали усиление иммунного ответа (IFN выступал в роли адъюванта). Кроме того, Yeung V.P. с соавт. показали, что в молекуле IFNβ-1β содержатся высокоантигенные эпитопы, распознаваемые Т-клетками, которые при введении мышам линии Balb/C вызывали развитие иммунного ответа. Удаление с помощью генно-инженерных методов данных эпитопов в молекуле IFN предотвращало развитие иммунного ответа мышей на препарат. Наличие в аминокислотной цепочки белка IFNα и -β участков, которые являются Т-клеточными эпитопами, было подтверждено методами *in silico*. Большое значение в развитии «нежелательной» иммуногенности препаратов IFN играют факторы, связанные с производством и хранением препаратов IFNα. Препараты, получаемые различными производителями, обладают разными биологическими свойствами. Например, IFNβ-1b (Betaseron), полученный в системе клеток *E.coli*, не содержит гликанов, в отличие от гликозилированных препаратов IFNβ-1α (Avonex и Rebif), получаемых в системе клеток CHO. Клинические исследования показали, что эффективность IFNβ-1β ниже, чем IFNβ-1α, в связи с этим IFNβ-1β вводится в более высоких дозах, чем IFNβ-1α. При лечении IFNβ-1β значительно быстрее образуются Ат к препарату, чем при применении IFNβ-1α. Частота выработки Ат к препаратам IFNβ при в/м введении препарата Avonex составила 2%-6%, тогда как при п/к введении – Rebif в 12%-28% и Betaseron в 28%-47%. С другой стороны, Betaseron обладает плохой растворимостью и имеет склонность к агрегации, которая, как было установлено в исследованиях с удалением стабилизатора (альбумина) из препаратов IFNβ, активно влияет на их иммуногенную активность. Сложно установить, что является основным фактором «нежелательной» иммуногенности препаратов IFNβ: профиль гликозилирования, состав препарата, путь и частота введения или др. Следует отметить, что лечение пегилированным препаратом IFNβ сопровождается выработкой Ат не только к белку препарата, но и к

полиэтиленгликолевой его части. При анализе факторов, влияющих на развитие иммунного ответа, установлена четкая зависимость иммуногенности препарата от уровня агрегации белка. При исследовании различных видов агрегатов IFNβ установлено, что только агрегаты, полученные при окислении, катализируемом металлом, вызывали нарушение толерантности у трансгенных мышей. По-видимому, в процессе окисления белка происходит формирование агрегатов с образованием повторяющихся эпитопов, вызывающих нарушение толерантности. Биотерапевтические препараты являются наиболее эффективными и часто единственными препаратами для лечения тяжелых заболеваний, однако ПР, например, связанные с «нежелательной» иммуногенностью, ограничивают применение данного класса препаратов.

Изучение особенностей иммунного ответа и механизмов развития ПР, разработка методов их предотвращения позволит повысить эффективность и безопасность применения биотерапевтических препаратов.

ВОПРОСЫ ГАРМОНИЗАЦИИ ФАРМАКОПЕЙНЫХ ТРЕБОВАНИЙ К КАЧЕСТВУ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Устинникова О.Б.[1], Новикова Е.В.[1], Рунова О.Б.[1], Бондарев В.П.[1], Жиляева М.В.[2], Вишневский А.Ю.[2]

[1] ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[2] ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум», п. Вольгинский, Владимирская обл., Россия

В соответствии с Соглашением о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС), гармонизация требований к лекарственным средствам является необходимым процессом в условиях функционирования общего рынка лекарственных средств. Наличие опыта гармонизации фармакопей государств-членов ЕАЭС с требованиями Европейской Фармакопеи с одной стороны и недостаточный охват лекарственных препаратов фармакопейными статьями с другой стороны, формируют необходимость разработки национальных и гармонизированных фармакопейных требований к ряду препаратов, в том числе препаратов на основе рекомбинантных факторов свертывания крови (РФСК).

Цель. Формирование общей фармакопейной статьи (ОФС) на РФСК, основанной на принципах гармонизации и учитывающей современные тенденции развития рынка данного типа лекарственных препаратов, а также отработка методологии составления гармонизированной фармакопейной статьи (ФС) на конкретный РФСК заявленной модификации на примере rFVIIa (эптаког альфа).

Результаты. Анализ актуальных направлений разработки лекарственных препаратов на основе РФСК выявил устойчивую тенденцию к созданию новых препаратов, основой которых является модифицированный рекомбинантный белок, обладающий профильной активностью заявленного ФСК. При этом варианты модификаций достаточно разнообразны: делеционные варианты с удалением ряда доменов, характерных для эндогенных белков; пролонгированные производные (пэгилирование); расщепление до субъединиц; гибридные факторы, ковалентно сшитые с доменом Fc-фрагмента иммуноглобулина человека G1; гетерологичные РФСК (свиной РФСК VIII) и т.д. Единственной международной фармакопеей, содержащей требования к rFVIIa, rFVII и rFIXa в форме монографий 01/2015:2534 , 01/2008:1643, 01/2016:2522 соответственно, является Европейская Фармакопея. Однако вышеуказанные монографии, отражающие особенности конкретной модификации определенного РФСК не могут быть применены к другой модификации того же типа РФСК, а также не могут быть использованы для установления методического обеспечения подтверждения качества вновь разрабатываемых препаратов. Разработанный проект ОФС на РФСК, в соответствии с требованиями к препаратам, в основе которых лежит продукт, полученный с применением технологии рекомбинантной ДНК, а также с учетом вышеизложенных особенностей РФСК, устанавливает необходимость максимально полной характеристики конкретной модификации белка на уровне субстанции. Отражена необходимость подтверждения соответствия производимого продукта заявленной существующей модификации или полная характеристика особенностей вновь полученных модификаций, с присвоением международного непатентованного наименования и подтверждением стабильности структурных особенностей последующих серий субстанции. При формировании ФС на rFVIIa, было выявлено расхождение монографии 01/2015:2534 и частных нормативных документаций производителей, как в части методических решений оценки показателей качества так и их количественных характеристик. В целях гармонизации требований был разработан порядок выбора оптимальной методики, основанный на воспроизведении существующих методик (Европейская Фармакопея и нормативная документация производителей) в разных лабораториях, статистической обработке результатов на основе однофакторного дисперсионного анализа на предмет наличия статистически достоверных различий, а также сравнительный анализ коммерческой доступности и предпочтений экономического характера. В результате проведенной работы были установлены методики для определения показателей «Подлинность», «Количественное определение», «Чистота. Димеры, полимеры, олигомеры» методами коагулометрии, спектрофотометрическим методом и методом ВЭЖХ. В рамках концепции гармонизации спектрофотометрический метод дополнен стандартным образцом CRS Human coagulation factor VIIa Y0001663, дополнительно охарактеризован профиль и установлены максимум и минимум поглощения. Оптимизирован метод коагулометрической активности: при выявленном отсутствии статистически достоверных различий, обоснован выбор методики с точки зрения экономической целесообразности. Статистически обоснованы процедурные особенности воспроизведения методики гель-фильтрационной ВЭЖХ. Намечены перспективные решения по выбору оптимальных методических подходов оценки подлинности методами пептидного картирования и установлением профиля гликозилирования, оценки родственных примесей – окисленных и деградированных форм, а также структурных особенностей данной модификации белка – количественное содержание Gla-домена.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СУХОГО ЛЕВЗЕИ ОДНОЦВЕТКОВОЙ НА ГУМОРАЛЬНОЕ ЗВЕНО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИММУНОДЕФИЦИТЕ

Хобракова В.Б.[1, 2], **Татаринова Н.К.**[1]

[1] *Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия*
[2] *Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия*

Проблема лечения и профилактики иммунодефицитных состояний является одной из актуальных проблем современной медицины. Это связано с распространением вторичной иммунной недостаточности при острой и хронической вирусной и бактериальной инфекции, связанным с ней атипичным клиническим течением инфекционно-воспалительного процесса. В связи с этим перспективным направлением является разработка новых эффективных иммунокорригирующих лекарственных средств. Иммунокорригирующими могут быть как вещества белковой природы, так и средства синтетического и природного происхождения. Преимуществом обладают иммуномодуляторы, оказывающие направленное действие на разные звенья иммунной системы и малотоксичные препараты, обладающие поликомпонентным действием. Таковыми являются адаптогенные лекарственные растения, они действуют на организм всем комплексом содержащихся в них биологически активных веществ (БАВ). Примером таких БАВ, обладающих выраженной иммуномодулирующей активностью, являются фитоэкдистероиды.

Объектом настоящего исследования явился экстракт сухой левзеи одноцветковой – *Rhaponticum uniflorum* (L.), как перспективного экдистероидсодержащего растения.

Целью настоящего исследования явилось определение иммунокорригирующих свойств экстракта сухого левзеи одноцветковой в отношении гуморального звена иммунного ответа при экспериментальном иммунодефиците.

Эксперименты проведены на мышах самцах линии СВА массой 18-20 г. Действие исследуемых средств было изучено на животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной цитостатиком азатиоприном, который вводили контрольной группе животных в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней. Экстракт сухой левзеи одноцветковой вводили опытной группе животных на фоне азатиоприна в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг, препарат сравнения – «Иммунал» – в дозе 5 мл/кг перорально ежедневно в течение 14 дней. Интактная группа животных получала воду очищенную по аналогичной схеме.

Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по A.J. Cunningham (1965).

На основании полученных данных выявлена эффективность экстракта сухого левзеи одноцветковой по отношению к реакции гуморального звена иммунного ответа при иммунодепрессии, вызванной введением азатиоприна. Исследуемое средство способно ослаблять супрессивное действие цитостатика на антителогенез, что выражается в увеличении абсолютного и относительного числа АОК в 2,1 и 2,2 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе животных. При введении препарата сравнения «Иммунал» достоверно возросло как абсолютное число АОК, так и количество АОК на 10^6 спленоцитов в 1,4 и 1,2 раза соответственно по сравнению с введением азатиоприна.

Эффективность исследуемого экстракта, по-видимому, обусловлена содержанием в нем фитоэкдистероидов, обладающих выраженными иммуномодулирующими свойствами.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что экстракт сухой левзеи одноцветковой является эффективным иммунокорригирующим средством, что аргументирует перспективность данного вида растительного сырья для получения новых иммуномодуляторов.

ЭКОЛОГИЯ, СТРЕСС И ИММУНИТЕТ

ИММУННЫЙ СТАТУС У ОБЛУЧЕННЫХ ЛИЦ, ИМЕЮЩИХ ПОВЫШЕННУЮ ЧАСТОТУ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА

Аклеев А.А.[1, 2], Долгушин И.И.[1]

[1] Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия
[2] Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России, Челябинск, Россия

Иммунная система является одной из наиболее радиочувствительных в организме человека. В ряде исследований показано, что у лиц, подвергшихся радиационному воздействию, даже в отдалённые сроки после облучения регистрируется повышенный уровень мутаций в генах Т-клеточного рецептора (TCR). Аналогичные результаты отмечались в отдалённые сроки и у жителей прибрежных сёл реки Теча. Известно, что комплекс TCR/CD3 вовлечён на начальном этапе в ряд иммунных ответов, зависимых от Т-клеток, поэтому потеря или альтерация экспрессии TCR-генов в выживших клетках может способствовать радиационно-индуцированному нарушению Т-клеточного ответа и иммунного статуса облучённого организма в целом. Целью настоящей работы было исследование особенностей иммунитета в отдалённые сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию и имеющих повышенный уровень TCR-мутаций. В исследование было включено 66 облучённых жителей прибрежных сёл реки Теча. Из них 29 лиц (18 женщин – 62,1% и 11 мужчин – 37,9%, средний возраст – 71,2±1,1 года), имеющих повышенную частоту TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови, составили основную группу. В группу сравнения было включено 37 жителей прибрежных сёл реки Теча (27 женщин – 73% и 10 мужчин – 27%, средний возраст – 69,7±1,1 лет), имеющих уровень TCR-мутаций, не превышавший M+2δ, оцененный для необлучённых жителей Уральского региона. Оценка уровня TCR-мутантных лимфоцитов проводилась методом проточной цитометрии. Мутантными считались клетки с фенотипом $CD3^-CD4^+$. Оценка иммунного статуса включала в себя определение в крови численности основных популяций и субпопуляций лейкоцитов, исследование фагоцитарной, лизосомальной активности и интенсивности внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов крови, а также оценку уровней сывороточных цитокинов (IL-1β, IL-1α, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, GM-CSF, G-CSF, TNFα, IFNα, IFNγ). У лиц с повышенным числом мутантных по генам TCR Т-лимфоцитов отмечено повышение содержания в периферической крови $CD3^+CD16^+56^+$ клеток, активация лизосомальной активности нейтрофилов, а также повышение количества IL-1α при снижении уровней IL-2 и GM-CSF в сыворотке крови. Поскольку эти изменения не зависели от дозы облучения ККМ и тимуса, то их, скорее всего, необходимо рассматривать как иммунный ответ на повышение частоты мутаций (в т. ч. TCR-мутаций) в облучённых клетках.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У СПОРТСМЕНОВ

Зайцева И.П., Романов В.А., Зайцев О.Н.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет» им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия
ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ярославль, Россия
ФГБОУ ВО «Ярославский государственный технический университет», Ярославль, Россия

Введение. Роль иммунной системы в обеспечении гомеостаза организма при воздействии различных факторов внешней среды не вызывает сомнений. Представляет интерес выявление взаимосвязей функционирования различных звеньев иммунитета с уровнем тренированности спортсменов, в частности, при действии физических нагрузок различной интенсивности.

Цель и задачи. Изучение влияния различного уровня тренированности на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета у спортсменов-самбистов.

Материалы и методы. Обследовано 23 мастера спорта по самбо, 22 – самбистов новичков; контрольную группу составляли 32 нетренированных лица мужского пола. Исследовали фенотип лимфоцитов крови методом иммунофлюоресценции, уровни сывороточных иммуноглобулинов в реакции Манчини, фагоцитарные активность и число (ФА,ФЧ), продукцию нейтрофилами (Нф) активных форм кислорода в тестах спонтанной и индуцированной хемилюминесценции (сХЛ, иХЛ).

Результаты. Установлено (табл.), что только у самбистов мастеров спорта содержание Т-и В-лимфоцитов (соответственно CD3 и CD19) было достоверно увеличено по сравнению со значениями контрольной группы; существенных различий в количестве Т-хелперов (CD4) и Т-цитотоксических клеток (CD8) во всех обследованных группах не было обнаружено.

Концентрация иммуноглобулина G в сыворотке крови мастеров спорта достоверно превышала соответствующие значения новичков и лиц контрольной группы. Наибольшая концентрация иммуноглобулина M отмечалась у студентов, занимающихся самбо, как у мастеров спорта, так и у новичков, достоверно превышая соответствующие показатели контрольной группы. Существенных измене-

ТАБЛИЦА. ИММУННЫЙ СТАТУС СПОРТСМЕНОВ-САМБИСТОВ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ (К ТЕЗИСАМ ЗАЙЦЕВОЙ И.П. И ДР.)

Параметр	Самбо – мастера	Самбо – новички	Контроль
Количество (n)	**23**	**22**	**32**
CD3, %	70±4,7	68±3	65±3[1]
CD4, %	42±3,3	40±3	39±4
CD8, %	32±3,7	33±4	33±4
CD19, %	19±2,9	18±3	16±2[1]
IgG, г/л	16,18±2,8	12,05±1,8[1]	10,3±1,19[1]
IgM, г/л	1,53±0,16	1,51±0,18	1,31±0,17[1, 2]
IgA, г/л	2,8±0,25	2,62±0,35	2,50±0,32
ФА, %	67±1,52	63±1,82[1]	58±2,07[1, 2]
ФЧ, ед.	8±0,48	7±0,38[1]	4,3±0,42[1, 2]
сХл, 10^4 имп/мин	2,11±0,7	1,09±0,12[1]	0,83±0,16[1]
иХл, 10^4 имп/мин	4,3±1,26	2,8±0,86[1]	2,0±0,19[1]

Примечание. [1] – достоверность отличий от показателей группы мастеров спорта ($p < 0,05$); [2] – достоверность отличий от показателей группы новичков ($p < 0,05$).

ний в уровне иммуноглобулина А среди спортсменов мастеров спорта и новичков выявлено не было. Наиболее выраженные изменения у спортсменов наблюдались в фагоцитарном звене иммунитета – показатели ФА, ФЧ, сХЛ, иХЛ у мастеров спорта достоверно превышали таковые самбистов-новичков и данные группы контроля.

Заключение. Выполненные исследования свидетельствуют об активации у спортсменов клеточного и гуморального звеньев иммунной системы под влиянием регулярных физических тренировок, наиболее выраженных у мастеров спорта, испытывающих систематические нагрузки высокой интенсивности.

ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ – УЧАСТНИКОВ СПЕЦОПЕРАЦИЙ

Зайцева Н.С., Сизякина Л.П.

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

Стресс представляет собой совокупность неспецифических реакций организма на воздействие различных неблагоприятных факторов. И если кратковременные стрессорные реакции можно рассматривать как физиологические, то стресс в условиях боевых действий связан со множеством отрицательных влияний и прежде всего с длительностью воздействия. При этом изменения в нервной системе человека успевают не только сформироваться, но и закрепиться, что приводит к формированию посттравматического стрессового расстройства (Крыжановский Г. Н. и соавт., 2010).

Цель. Изучение особенностей иммунного статуса у военнослужащих, вернувшихся из командировки в районы со сложной оперативной обстановкой.

Материалы и методы. Обследовано 15 военнослужащих (средний возраст 32,5±4,2 лет) до и сразу после участия в спецоперациях (продолжительность – 3 мес.). Состояние иммунного статуса оценивали по экспрессии $CD3^+$, $CD4^+$, $CD16^+$, $CD19^+$ методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием соответствующих моноклональных антител в иммунофлюоресцентном тесте на лазерном проточном цитофлюориметре Cytomics FC 500 (Becman Coulter, USA), уровни сывороточных иммуноглобулинов методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини. Уровень циркулирующих иммунных комплексов определяли методом их преципитации в растворе полиэтиленгликоля. Интегральную кислородзависимую микробицидность нейтрофилов оценивали в спонтанном и стимулированном НСТ-тесте с расчетом коэффициента стимуляции. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием набора прикладных программ MS Office 2010, Statistica 6,0 for Windows. Достоверные отличия между показателями определялись при $p < 0,05$.

Результаты. Анализ полученных данных показал, что участие в спецоперациях у военнослужащих приводит к угнетению процессов созревания лейкоцитов и лимфоцитов. При рутинном исследовании периферической крови в динамике отмечено значительное достоверное уменьшение количества лейкоцитов (с 6,3±0,4 до 4,8±0,3 × 10^9/л) и лимфоцитов (2,5±0,1 до 1,24±0,1 × 10^9/л). На фоне изменений, указанных выше, отмечались следующие нарушения в иммунном статусе: в Т-клеточном звене иммунной системы на фоне неизмененного содержания общего количества лимфоцитов регистрируется значительное нарастание количества $CD4^+$ лимфоцитов (41±2,2 до и 53±2,1% сразу после участия в спецоперациях) и снижение $CD8^+$ клеток (32±2,4% против 21±1,6%,), что привело к сохранению адаптационного потенциала у обследуемых и нарастанию иммунорегуляторного индекса (1,4±0,19 против 2,52±0,18, < 0,05). Указанные сдвиги сопровождались значительным достоверным уменьшением количества клеток-натуральных киллеров ($CD16^+$ – 15,1±1,5% против 7,9±1,9%). В гуморальном звене иммунной системы на фоне неизмененного количества В-лимфоцитов выявлено значительное уменьшение иммуноглобулинов класса А (IgA – 2,19±0,11 против 1,6±0,4 г/л). В фагоцитарном звене спонтанная активность нейтрофилов в НСТ тесте была значительно угнетена (99±3,6 против 79±4,1 у.е.) на фоне сохраненной стимулированной активности, что позволило поддерживать коэффициент стимуляции на исходном уровне.

Вывод. Даже краткосрочное (до 3 месяцев) участие в спецоперациях приводит к ощутимым нарушениям иммунного статуса в виде изменений процессов дифферен-

цировки Т-лимфоцитов, угнетения с процессов созревания клеток-натуральных киллеров, а также спонтанной микробицидной активности нейтрофилов. Выявленные изменения относят военнослужащих, проходящих службу в районах со сложной оперативной обстановкой, в группу риска развития иммунной дисфункции. Интересны механизмы возникновения и возможного прогрессирования выявленных изменений, что требует дальнейшего наблюдения за обследуемыми.

ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ПЕРИНАТАЛЬНОГО СТРЕССА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ИММУННОЙ И НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ

Захарова Л.А.

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия

Неблагоприятные факторы окружающей среды оказывают негативное влияние на становление и функционирование различных систем организма плода, включая иммунную и нейроэндокринную. Здоровье потомства определяется взаимодействием этих систем в раннем онтогенезе, когда реализуются эпигенетические механизмы, обеспечивающие их адаптационную пластичность. Нарушения механизмов регуляции развития могут приводить к длительно текущим или необратимым изменениям в структуре и функциях иммунной и нейроэндокринной систем.

Цель. Анализ собственных и литературных данных о взаимном регуляторном влиянии нейроэндокринной и иммунной систем в раннем онтогенезе в норме и при патологических состояниях. Ведущую роль во взаимодействии этих систем играют нейромедиаторы и гормоны гипоталамо-гипофизарно-адреналовой (ГГАС) и репродуктивной систем. В ранний пренатальный период, когда системы еще не сформированы, нейрогормоны оказывают регуляторное влияние (возможно морфогенетическое) на структуру развивающихся иммунокомпетентных органов плода. Согласно нашим данным, пренатальный дефицит моноаминов или гонадотропин-рилизинг гормона (ГРГ) приводит к необратимым нарушениям в развитии тимуса, а у половозрелого потомства – гуморального и клеточного иммунного ответа. В перинатальном онтогенезе, начальном периоде функционирования ГГАС, нейрогормоны репрограммируют становление и функционирование иммунной системы. Наряду с иммунной системой нейромедиаторы и гормоны в раннем развитии организуют структуры мозга, а половые гормоны также половое поведение и репродуктивную способность у самцов и самок. В постнатальном периоде их функция заключается в поддержании гомеостаза иммунной системы в ответ на изменения окружающей среды или на вызванную стресс-реакцией иммуносупрессию. Воздействия стрессогенных факторов в критические периоды развития служат основой возникновения у потомства аутоиммунных, метаболических и психических расстройств. Значимый фактор риска, программирующий развитие систем – перинатальный «иммунологический стресс», индуцированный вирусной или бактериальной инфекцией, а в экспериментальных моделях эндотоксином ЛПС. Пренатальное воздействие ЛПС изменяет ответ ГГАС на стресс, подавляет функционирование моноаминергической и репродуктивной систем, усиливает синтез провоспалительных цитокинов у матери и плодов. Повышенное содержание цитокинов приводит к преждевременным родам, различным костным аномалиям, атрофии тимуса и нарушению развития мозга. В наибольшей степени провоспалительные цитокины поражают белое вещество мозга плода, вызывая развитие церебрального паралича у новорожденных и характерных признаков шизофрении у потомства. Гипертензию, ожирение, гиперандрогению у самок, тревожность и депрессию у молодого потомства связывают с увеличенным содержанием IL-6 и TNFα. Согласно нашим данным, ЛПС, введенный самкам мышей на ранних сроках беременности, индуцирует повышенное содержание IL-6, ЛИФ и MCP-1 у матери и плодов. У половозрелого потомства самцов и самок наблюдается снижение концентрации ГРГ в гипоталамусе, гонадотропинов и половых стероидов в периферической крови, нарушения структуры гонад и репродуктивной способности.

Заключение. Воздействия стрессогенных стимулов на организм в раннем развитии отражаются на формировании структур тимуса и мозга, а также взаимодействиях нейроэндокринной и иммунной систем. Пластичность систем позволяет адаптироваться развивающемуся организму к изменениям окружающей среды. Однако в дальнейшем это может привести к нарушениям функций иммунной и нейроэндокринной систем и к развитию различных патологий у потомства.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СЛЮНЫ КАК МАРКЕР ЗДОРОВЬЯ СТУДЕНТОВ В ПЕРИОД ИНТЕНСИВНОЙ ИНТЕЛЕКТУАЛЬНОЙ НАГРУЗКИ

Коленчукова О.А.[1, 2], Медведева Н.Н.[2]

[1] Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», Красноярск, Россия

В настоящее время является актуальным внедрение инновационных неинвазивных методов контроля состояния организма человека при стрессовых ситуациях. Длительные интеллектуальные нагрузки вызывают хронический стресс и могут привести к истощению антиоксидантной системы.

Целью исследования является изучение особенностей антиоксидантного статуса в слюне в условиях интенсивной интеллектуальной нагрузки.

Для проведения эксперимента была отобрана группа студентов второго и третьего курса КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, в количестве 123 человек в возрасте 20-22 года. Исследуемый материал – слюна, собирался путем прямого сплевывания в пробирку. Забор слюны производили два раза: фоновая проба отбиралась в состоянии эмоционального покоя; тестовая проба отбиралась в период интеллектуальной нагрузкой. Проведено тестирование студентов по методу Спилбергера–Ханина и Немчина–Тейлора. Определяли ситуативную и личностную тревожность, а также склонность к развитию стресса. Антиоксидантный статус оценивали по методу H_2O_2-люминол зависимой хемилюминесценции. Хемилюминесцентное исследование проводили с использованием планшетного люменометра TriStar LB 941.

Было доказано существование взаимосвязи антиоксидантного статуса слюны от состояния интеллектуального напряжения. Предположительно, в период сессии происходит увеличение общего уровня тревожности при снижении антиоксидантной активности. При интеллектуальном стрессе антиоксидантная система менее интенсивно перехватывает радикалы, так как уменьшена ско-

рость нейтрализации активных форм кислорода (АФК). Таким образом, в условиях интенсивной интеллектуальной нагрузки наблюдается деградация антиоксидантной защиты вследствие, предположительно, уменьшения активности ферментов пероксидазной защиты. Прооксидантная система тоже работает менее эффективно, о чем говорит спад таких индикаторов ХЛ-свечения как: максимальная интенсивность, амплитуда и светосумма, которые показывают количество АФК.

Исследование проведено при поддержке РФФИ номер проекта 16-06-00439.

СОСТОЯНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНОГРАММЫ У СПОРТСМЕНОВ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭНТРОПИИ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ КРОВИ

Колупаев В.А., Сашенков С.Л., Мельников И.Ю.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия

Цель исследования состояла в сравнении показателей иммунограммы у спортсменов с разным уровнем относительной энтропии лейкоцитарной формулы крови при адаптации к условиям среды и физическим нагрузкам.

Проведен ретроспективный анализ результатов наблюдений показателей фагоцитарной, лизосомальной и НСТ-активности нейтрофилов (Нф) и моноцитов (Мц) периферической крови, содержания CD3, CD4, CD8, CD10, CD11b, CD16, CD20, CD25, CD34, CD56, CD95, CDHLA-DR -клеток, уровня сывороточных иммуноглобулинов A, G, M, содержания c1-c5 компонентов комплемента и уровня циркулирующих иммунных комплексов по сезонам у спортсменов с преимущественно аэробным энергообеспечением мышечной деятельности (лыжники-гонщики n = 110) с разным уровнем относительного показателя энтропии лейкоцитарной формулы крови (ЭЛФК). Распределение обследованных на подгруппы осуществляли исходя из наличия или отсутствия отклонений показателей лейкограммы от нормативных значений и по величине относительного показателя ЭЛФК (Егорова М.С., Фомин Г.В., 1985), оцениваемого по (Тихончук В.С. и соавт., 1992). Все лабораторные исследования проведены на базе НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (директор НИИ иммунологии, президент ФГБОУ ВО ЮУГМУ – заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, д.м.н., профессор И.И. Долгушин).

В выборочной совокупности обследованных спортсменов лишь в 30% случаев отмечались нормальные значения всех показателей лейкограммы. В 37,3% случаев различные отклонения показателей лейкограммы сочетались с нормальным уровнем ЭЛФК, а в 32,7% случаев отклонения показателей лейкограммы от нормативов сопровождались различными отклонениями ЭЛФК от уровня нормальных значений. При этом у спортсменов с нормальными показателями лейкограммы уровень лизосомальной активности Нф, активности комплемента и содержания IgA в сыворотке крови был значительно выше, а спонтанной НСТ-активности Нф и количества фагоцитирующих Мц – существенно ниже, чем у атлетов с нормальным уровнем относительной ЭЛФК, но с отклонениями отдельных показателей лейкограммы от нормы. Абсолютное содержание $CD4^+$, $CD8^+$, $CD10^+$, $CD16^+$, $CD34^+$ и $CD56^+$ у вторых было значительно меньше, чем у первых за счет более низкого содержания Лф в периферической крови ($P < 0,002$). В тоже время уровень абсолютного содержания $CD20^+$ у спортсменов этих групп существенно не отличался ввиду значимого повышения у вторых относительного содержания этих клеток.

Средние значения показателей иммунограммы у спортсменов с отклонениями лейкограммы от нормы и повышенным уровнем ЭЛФК существенно не отличались от таковых у спортсменов с нормальными значениями лейкограммы и ЭЛФК за исключением более высокого ($P < 0,05$) относительного содержания $CD3^+$ лимфоцитов. Последнее обусловило отсутствие значимых различий абсолютного содержания $CD3^+$ клеток в условиях более низкого содержания лимфоцитов в периферической крови ($P < 0,05$). В сравнении с показателями атлетов с отклонениями лейкограммы при нормальном уровне ЭЛФК у спортсменов повышенным уровнем ЭЛФК наблюдалось значительно более низкое содержание фагоцитирующих Нф и c3 компонента комплемента на фоне более высокого абсолютного содержания $CD10^+$, $CD16^+$ и $CD95^+$ клеток. Помимо того, у спортсменов с отклонениями лейкограммы от нормы и повышенным уровнем ЭЛФК количество фагоцитирующих Нф, уровень фагоцитарной и лизосомальной активности этих клеток, активности комплемента и содержания c2 и c3 компонентов комплемента было значительно меньше, а относительного содержания $CD10^+$ и $CD95^+$ лимфоцитов – существенно больше, чем у спортсменов с нормальной лейкограммой и низким уровнем относительной ЭЛФК.

У спортсменов с отклонением показателей лейкограммы от нормы и низким уровнем относительной ЭЛФК наблюдалось статистически значимое увеличение количества фагоцитирующих и НСТ-позитивных Нф в спонтанном и индуцированном тесте, фагоцитарной и лизосомальной активности этих клеток на фоне значительно более низкого абсолютного содержания всех исследуемых CD-субпопуляций лимфоцитов по сравнению с таковыми в группе спортсменов без отклонений лейкограммы и ЭЛФК от нормы. Отмеченные различия показателей иммунограммы связаны с различиями в содержании этих популяций лейкоцитов в периферической крови.

ИММУННАЯ РЕАКТИВНОСТЬ И ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ У РАБОТНИКОВ УГОЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Коротенко О.Ю., Панев Н.И., Филимонов С.Н., Панев Р.Н., Евсеева Н.А., Румпель О.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний», Новокузнецк, Россия

Введение. По современным представлениям участие иммунологических механизмов имеет большое значение в развитии атеросклероза. В то же время имеются данные, что вредные производственные факторы могут модулировать факторы риска атеросклероза и ускорять его развитие. Это указывает на актуальность исследований иммунного и цитокинового статусов у работников, страдающих атеросклерозом и подвергающихся влиянию различных вредных производственных факторов.

Цель и задачи. Изучить особенности иммунного и цитокинового статусов у шахтеров, работающих в условиях воздействия комплекса вредных производственных факторов.

Материалы и методы. Нами обследованы 290 мужчин в возрасте от 40 до 54 лет: 211 шахтеров (горнорабочих

очистного забоя, проходчиков), длительно работающих при воздействии комплекса вредных производственных факторов (запыленность угольно-породной пылью, вибрация, шум, физические перегрузки) и 79 практически здоровых служащих, никогда не работавших во вредных условиях труда (контроль). Основная и контрольная группы статистически не различались между собой по возрасту. Всем проведено клинико-инструментальное обследование для выявления атеросклероза (ЭКГ, эхокардиография, велоэргометрия, холтеровское мониторирование ЭКГ, дуплексное и триплексное сканирование экстракраниальных и периферических артерий). Проведено иммунологическое обследование: относительное и абсолютное количество CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, методом моноклональных антител; определена концентрация сывороточных иммуноглобулинов (Ig) A, M, G; фагоцитарная активность нейтрофилов (ФАН) с частицами латекса; уровень циркулирующих иммунных комплексов. Определен уровень цитокинов (интерлейкинов – 1, 2, 4, 6 и фактора некроза опухолей) методом твердофазного иммуноферментного анализа по общепринятым методикам и белков острой фазы воспаления (С-реактивного белка и гаптоглобина).

Результаты. Среди шахтеров были выделены 2 группы: первая – больные атеросклерозом (93 человека), вторая – без атеросклероза (118 человека). Анализ иммунологических исследований показал, что у шахтеров с атеросклерозом отмечается снижение количества клеток Т-лимфоцитов – Т-хелперов ($CD4^+$) по сравнению с шахтерами без атеросклероза и контролем. Это указывает на нарушение клеточного звена иммунитета у шахтеров с атеросклерозом, что имеет значение в формировании хронического воспалительного процесса и может способствовать раннему развитию заболевания. Анализ показателей гуморального звена иммунитета и фагоцитоза показал, что при большой вариабельности показателей нет статистически достоверных различий у шахтеров с атеросклерозом, без атеросклероза и контролем. Отмечено, что у шахтеров с атеросклерозом повышен уровень TNF и интерлейкина-2. Значительное увеличение синтеза цитокинов отражает наличие выраженной активности иммуновоспалительного процесса у шахтеров с атеросклерозом. У шахтеров с атеросклерозом отмечается также повышение уровня белков острой фазы воспаления по сравнению с контролем: С-реактивного белка и гаптоглобина.

Заключение. Таким образом, при изучении иммунного и цитокинового статусов у шахтеров с атеросклерозом отмечено снижение показателей клеточного иммунитета ($CD4^+$), повышение уровня цитокинов (фактора некроза опухоли и интерлейкина-2) и белков острой фазы воспаления (гаптоглобина и С-реактивного белка). Это указывает на большую роль системных иммуновопалительных механизмов в атерогенезе, которые способствуют раннему развитию атеросклероза у работников угольной промышленности.

СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА У РАБОТНИКОВ ВНУТРЕННЕГО ВОДНОГО ТРАНСПОРТА

Кремено С.В., Барабаш Л.В., Мирютова Н.Ф., Абдулкина Н.Г.

ФГБУ «Сибирский федеральный научно-клинический центр» ФМБА, Северск, Россия

Неблагоприятные условия труда у работников объектов водного транспорта (шум, вибрация, качка, эпизоды ускорения, электромагнитные поля, неблагоприятные климатические условия и др.) приводят к нарушению функционального состояния основных регуляторных систем организма вследствие значительного напряжения адаптационных систем, что в итоге ведет к ухудшению состояния здоровья и снижению трудоспособности.

Цель. Оценить состояние иммунной системы организма у работников внутреннего водного транспорта.

Всего обследовано 65 работников внутреннего водного транспорта (ОАО «Томская судоходная компания»), принимающих непосредственное участие в плавании (мужчины, средний возраст 46,67±1,24 лет). Для оценки состояния гуморального и клеточного звеньев иммунитета проводили определение следующих показателей. Содержание субпопуляций лимфоцитов, несущих антигены $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, определяли методом люминесцентной микроскопии с использованием наборов ООО «Сорбент» (Россия). Концентрации основных классов иммуноглобулинов (IgA, G, M) оценивали по методу G. Mancini et al. с использованием моноспецифических диагностических сывороток фирмы НПО «Микроген» (Россия). Содержание цитокинов (IL-1β, IL-4, IL-6, TNFα) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов «Вектор-Бест» (Россия). Состояние неспецифической защиты организма определяли по фагоцитарной активности нейтрофилов, спонтанной (ФАсп) и стимулированной пирогеналом (ФАст) с использованием латексных частиц («Диа-м», Россия). Полученные результаты обрабатывали с помощью непараметрических методов статистики. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициента Спирмена. Критический уровень значимости принимался равным 0,05. Данные представлены как среднее±среднее квадратичное отклонение ($M \pm \sigma$).

В результате исследования было обнаружен дисбаланс в соотношении относительного содержания субклеточных популяций лимфоцитов. Так, отмечалось повышение $CD3^+$ лимфоцитов – у 40% обследованных лиц, $CD4^+$ лимфоцитов – у 39%, $CD8^+$ лимфоцитов – у 39%. Повышенные значения $CD16^+$ лимфоцитов были отмечены у 34% работников. У 45% человек наблюдалось снижение $CD19^+$ лимфоцитов. При этом отмечалась отрицательная корреляционная связь между абсолютным числом $CD19^+$ лимфоцитов и стажем работы ($r = -0,200$, $p = 0,038$). Кроме этого наблюдались нарушения и в содержании иммуноглобулинов. Так, у 37% и 9% обследованных лиц отмечены повышенные значения JgA и JgG соответственно. В то же время, концентрация JgM была снижена у 28% человек. При этом концентрация JgM имела обратную корреляционную связь со стажем работы ($Rs = -0,296$, $p = 0,004$). Концентрация цитокинов у работников плавсостава находится в пределах референсных значений, однако корреляционный анализ показал наличие обратной связи между продолжительностью трудового стажа и содержанием цитокинов IL-1β ($Rs = -0,325$, $p = 0,002$), TNFα ($Rs = -0,193$, $p = 0,046$), IL-10 ($Rs = -0,294$, $p = 0,005$), что говорит о снижении активности иммунокомпетентных клеток в отношении продукции гуморальных факторов иммунной регуляции с увеличением стажа. Со стороны неспецифических факторов иммунной защиты организма у 50% человек было отмечено снижение ФА сп и у 27% – ФА стим.

Таким образом, у работников внутреннего водного транспорта имеются признаки дисбаланса в системе клеточного и гуморального звеньев иммунной системы. Выяв-

ленные негативные корреляции концентраций гуморальных показателей и $CD19^+$ лимфоцитов с продолжительностью трудового стажа указывают на снижение иммунной реактивности организма у стажированных работников.

СТРУКТУРА ЮВЕНИЛЬНОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Криволапова И.М.[1, 3], Козлова Е.С.[2], Скоробогатова О.В.[2], Пашнина И.А.[1, 3]

[1] Клинико-диагностическая лаборатория, Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург, Россия
[2] Консультативно-диагностическая поликлиника, Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург, Россия
[3] Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

В последние десятилетия во всем мире отмечают рост числа детей и подростков с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА). Одной из причин этого могут являться современные экологические и социально-экономические условия жизни (Гадзанова А.А., 2013; Малиевский В.А., 2006). Однако некоторыми авторами не было обнаружено влияния экологических факторов на распространенность ЮИА, но было показано, что экологически неблагоприятные условия влияли на тяжесть течения заболевания (Соболева Н.Г., 2009).

Целью работы явился анализ структуры ЮИА у детей, проживающих на территориях Свердловской области (СО) с различным уровнем загрязнения окружающей среды.

Проанализировано 264 амбулаторных карты детей, состоявших на диспансерном учете в клинико-диагностической поликлинике ОДКБ №1 с различными вариантами ЮИА: системный, олигоартикулярный, полиартикулярный, псориатический артрит, артрит, ассоциированный с энтезитом. 126 детей проживали в экологически неблагоприятных городах (загрязнение атмосферного воздуха): Екатеринбург, Нижний Тагил, Каменск-Уральский, Алапаевск, Верхняя Пышма, Краснотурьинск, Красноуральск, Первоуральск, Серов, Верхняя Салда (Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Свердловской области в 2015 г.»), 84 ребенка – в городах СО, не входящих в зону экологического неблагополучия и 54 ребенка – в селах СО. Средний возраст, как мальчиков, так и девочек в каждой группе составил 9 лет.

Доля девочек, проживающих на экологически неблагоприятных территориях, составила 56%, в городах СО – 60%, и в селах СО – 70%. То есть, во всех исследованных группах превалировали девочки. Доля больных в активной стадии заболевания между группами не различалась и в среднем равнялась 74%. Также не было выявлено различий по длительности заболевания детей, проживающих на территориях с различными экологическими условиями, средний стаж заболевания составил 3,6 года. При анализе структуры ЮИА было выявлено, что среди детей, проживающих на экологически неблагоприятных территориях, преобладал олигоартикулярный вариант ЮИА тогда как у больных из городов СО и сельской местности, данный вариант ЮИА встречался реже: 63%, 44% ($p < 0,01$) и 52%, соответственно. Системный вариант ЮИА чаще отмечался у пациентов из городов и сел СО по сравнению с детьми, проживающими на экологически неблагоприятных территориях: 15%, 9% ($p < 0,001$) и 6% ($p < 0,001$) соответственно. Среди детей из сельских территорий чаще, чем в других группах встречался полиартикулярный вариант ЮИА, его доля составила 30%, тогда как в городах СО и на территориях с неблагоприятными экологическими условиями: 13% ($p < 0,05$) и 17% соответственно. Псориатический артрит чаще выявлялся у детей из городской местности по сравнению с детьми из сельских и экологически неблагоприятных территорий: 11%, 2% ($p < 0,001$) и 5% ($p < 0,001$) соответственно. Среди детей, проживающих в городах СО, артрит, ассоциированный с энтезитом наблюдался чаще (в 12% случаев), чем у пациентов из сельской местности 9% ($p < 0,001$) и у детей, проживающих на экологически неблагоприятных территориях, 4% ($p < 0,001$).

Таким образом, структура ЮИА у детей, проживающих на территориях СО с различным уровнем загрязнения окружающей среды, различалась. Необходимы дальнейшие исследования, которые позволят оценить влияние средовых факторов на особенности эпидемиологии ювенильного идиопатического артрита у детей в Свердловской области.

ОЦЕНКА ПОВЫШЕННОГО РИСКА ЧАСТЫХ ЕЖЕГОДНЫХ СЛУЧАЕВ ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У РАБОТНИЦ ХИМИЧЕСКОГО ОБЪЕКТА

Мартынов А.И., Феофанова Т.В., Федоскова Т.Г., Зеленова З.В.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Предложена методика, позволяющая использовать таблицы сопряженности 2×2 для анализа количественных данных в задаче оценки повышенных рисков возникновения острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) по результатам однократного иммунологического обследования. В основу методики положено предположение о том, что группа лиц, у которых значения отдельных показателей иммунного статуса (ПИС) находятся вне границ референтного интервала нормы, (т.е. являются сниженными или повышенными значениями), может представлять собой в определенных условиях группу повышенного риска развития какого-либо заболевания. Для проверки этого предположения необходимо сравнить вероятности развития данного заболевания (абсолютные риски или просто риски, AR) в группах с разными значениями ПИС (сниженными, нормальными, повышенными). Инструментом для решения именно таких задач является таблица сопряженности 2×2.

Цель и задачи. Цель исследования состояла в апробации данной методики на примере расчета повышенных рисков развития ОРВИ в группе однократно обследованных работниц химического предприятия. Апробация включала два этапа (задачи): 1) категоризацию количественных данных и формирование таблиц сопряженности 2×2; 2) расчет рисков с последующей оценкой различий между группами по этим показателям с помощью статистических критериев.

Материалы и методы. В исследование были включены 19 работниц химического предприятия (медиана возраста 54 года, размах 33-72 года). Среди обследованных в тече-

ние 5 последних лет не болели ОРВИ (ОРВИ = 0) 12 человек, болели часто (ОРВИ ≥ 2 раз в год) 7 человек. Обследование проводилось в рамках планового профосмотра. Все обследованные работали в условиях контакта с производственным фактором (ПФ) и на момент осмотра были практически здоровы. Было изучено 20 показателей стандартной иммунограммы и 3 показателя мукозального иммунитета (IgG-sal, IgA-sal, s-IgA-sal). Сравнение рисков проводили для групп с нормальными и повышенными значениями ПИС (ПИС$_N$ и ПИС↑ соответственно) с помощью точного критерия Фишера (ТКФ, p_F). При формировании таблиц сопряженности 2×2 для каждого ПИС всех обследованных разделяли на 4 группы. Для лиц с ПИС↑ выделяли группу с ОРВИ ≥ 2 (a человек) и группу с ОРВИ = 0 (b человек). Для лиц с ПИС$_N$ выделяли группу с ОРВИ ≥ 2 (c человек) и группу с ОРВИ = 0 (d человек). Вычисляли риски частых случаев ОРВИ в группах лиц с ПИС↑(a+b человек) и ПИС$_N$(c+d человек):

AR (ПИС↑, ОРВИ ≥ 2) = a/(a+b); AR (ПИС$_N$, ОРВИ ≥ 2) = c/(c+d).

Риск AR (ПИС↑, ОРВИ ≥ 2) считали повышенным относительно AR (ПИС$_N$, ОРВИ ≥ 2) при выполнении следующих неравенств:

a/(a+b) > c/(c+d) и p_F < 0,20 (1).

Результаты. При анализе данных с помощью таблиц сопряженности 2×2 были определены два ПИС, для которых значения величин a, b, c, d и значение p_F удовлетворяли условию (1). Так, для показателя CD16% a = 3, b = 1, c = 4, d = 11, значение AR(CD16%↑, ОРВИ ≥ 2) = 0,750, значение AR(CD16%$_N$, ОРВИ ≥ 2) = 0,267, их отношение – RR = 2,81. Риски различались по критерию ТКФ с уровнем значимости p_F = 0, 0,117 (или с достоверностью ≈ в 88%).

Для показателя s-IgA-sal a = 4, b = 2, c = 3, d = 10, значение AR(s-IgA-sal↑, ОРВИ ≥ 2) = 0,667, AR(s-IgA-sal$_N$, ОРВИ ≥ 2) = 0,231 их отношение – RR = 2,89. Риски различались по критерию ТКФ с уровнем значимости p_F = 0,129 (или с достоверностью ≈ в 87%).

Таким образом, установлено, что в условиях действия производственного фактора работницы химического предприятия, имеющие повышенные значения показателей CD16% и s-IgA-sal, одновременно имеют повышенный (≈ в 3 раза) риск развития частых (2 и более раз в год) заболеваний ОРВИ. Статистическая достоверность одновременности этих событий 87-88%. Повышенные значения показателей CD16% и s-IgA-sal были обнаружены у 71,4% (5 из 7) всех часто болеющих женщин.

Заключение. Предложенная методика позволила (с достоверностью в 87-88%) из 23 показателей иммунитета выделить 2, которые являются маркерами повышенного риска частых ежегодных заболеваний острой респираторной вирусной инфекцией для работниц химического предприятия, находящихся в контакте с производственным фактором. Рассмотренный подход может быть рекомендован для дополнительного анализа результатов иммуноэпидемиологического скрининга работников промышленного объекта.

ИЗМЕНЕНИЕ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДИОКСИДА ТИТАНА

Мацко Е.Ф., Аляхнович Н.С.

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Введение. Диоксид титана (TiO_2) – краситель белого цвета, известен как пищевая добавка Е171. Мировое производство TiO_2 достигает нескольких миллионов тон в год. В последнее время увеличивается доля использования наноразмерных форм TiO_2. Учитывая постоянное пероральное поступление красителя с пищей и лекарственными средствами, вероятно его влияние на систему иммунитета. На клеточных линиях установлено взаимодействие наночастиц TiO_2 с Toll-подобными рецепторами 3 и 4 типа, обуславливающее активацию NF-κB и белков теплового шока (HSP70B). В экспериментах на мышах кратковременное (10 дней) внутрижелудочное поступление частиц TiO_2 (66 и 260 нм) в количестве 100 мг/кг массы тела стимулировало секрецию цитокинов в стенке кишечника.

Цель и задачи. Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови под влиянием TiO_2. Количественное определение фагоцитоза стафилококка и метаболической активности лейкоцитов в присутствии TiO_2 и без него.

Материалы и методы. В ходе эксперимента обследовано 17 человек. Все обследуемые разделены на две группы: первая группа – 10 человек с верифицированной по международным критериям атопической бронхиальной астмой (ж/м – 5/5, средний возраст – 38 [28;48] лет), вторая группа (контрольная) 7 человек – здоровые добровольцы (ж/м – 3/4, средний возраст – 23 [21; 26] лет).

У всех обследованных подсчитывался фагоцитарный индекс (ФИ) (процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа) и метаболическая активность нейтрофилов в присутствии нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Для индуцирования реакций использовался *Staphylococcus aureus* (Stf) штамма 209. В исследуемые пробы добавляли 0,008% раствор TiO_2 (из расчета на 1 мг/кг массы тела), контрольные пробы ставились с добавлением 0,9% раствора NaCl (физ. р-р). Пробы инкубировались в течение 30 минут при 37 °С. При микроскопии мазков подсчитывалось количество формазанположительных гранулоцитов в НСТ-тесте и клеток, поглотивших 1 и более частиц Stf, с подсчетом не менее 100 гранулоцитов.

ТАБЛИЦА. СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ ФИ И НСТ-ТЕСТА ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С TiO_2 И В КОНТРОЛЬНЫХ ПРОБАХ (К ТЕЗИСАМ МАЦКО Е.Ф. И ДР.)

Группа	Лица с атопической бронхиальной астмой						Контрольная (здоровые)					
Показатель	ФИ (%)		НСТ (%)				ФИ (%)		НСТ (%)			
Вид пробы	Stf	Stf+ TiO_2	физ. р-р	TiO_2	Stf	Stf+ TiO_2	Stf	Stf+ TiO_2	физ. р-р	TiO_2	Stf	Stf+ TiO_2
Ср. знач.,%	65,2	75,7*	12,2	31,2**	34,3	41,8	62,7	66,0	13,4	24,0***	39,7	40,3

Примечание. В парном Т-тесте Стьюдента: * – t_1 = -2,86, p_1 = 0,02; ** – t_2 = -4,48, p_2 = 0,002; *** – t_3 = -3,3, p_3 = 0,02.

Результаты. По результатам анкетирования все участники первой группы имели жалобы на гиперчувствительность к бытовым и/или пыльцевым аллергенам, 30% отмечали непереносимость некоторых пищевых продуктов, 10% подозревали пищевые красители в качестве виновника аллергических реакций, 50% указывали на наследственную отягощенность по аллергии. Лица контрольной группы были несколько моложе ($p = 0,01$) и имели наследственность по аллергии в 29%.

В таблице представлены результаты оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови.

У всех обследуемых с аллергией фагоцитоз стафилококка и генерация активных форм кислорода достоверно увеличивались после инкубации проб с р-ром TiO_2 (табл.), у 70% под влиянием TiO_2 увеличивались показатели индуцированного НСТ-теста, по сравнению с парными контрольными пробами.

Среди здоровых добровольцев имелась корреляция между женским полом и величиной ФИ в пробах со Stf и физ. р-ром (0,84), а также между отягощенной наследственностью по аллергии и величиной метаболической активности нейтрофилов в НСТ-тесте с TiO_2 (0,78). В среднем и у 86% обследуемых значение НСТ-теста с TiO_2 было достоверно выше, чем в пробе с физ. р-ром (табл.). В группе здоровых лиц под влиянием TiO_2 в 43% случаев повышалась метаболическая активность фагоцитов, индуцированная Stf; в 86% – усиливался фагоцитоз Stf, но различия с контрольными пробами не достигли статистической достоверности. Не обнаружено различий по показателями фагоцитоза в группе атопиков и здоровых лиц.

Заключение. Установлено, что под влиянием 0,008 % раствора пищевого красителя TiO_2 увеличивается фагоцитарная активность нейтрофилов крови как больных атопической бронхиальной астмой, так и здоровых добровольцев. Обнаружена связь между отягощенной наследственностью по аллергии и усилением метаболической активности фагоцитов крови в НСТ-тесте с TiO_2 у здоровых лиц.

РОЛЬ НАРУШЕНИЯ ПИЩЕВОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ В РАЗВИТИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Новиков П.С.[1], Черевко Н.А.[1], Скирневская А.В.[1], Стоянов А.С.[1], Муравейник О.А.[3], Кондаков С.Э.[2], Розенштейин М.Ю.[4], Розенштейн А.З.[4], Резапов Б.Р.[4]

[1] Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Томск, Россия
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[3] МО Центр семейной медицины, Томск, Россия
[4] ImmunoHealth- РУС, Москва, Россия

Введение. В работе исследован вклад пищевых антигенов (пАГ) в патогенез начальных проявлений метаболического синдрома (МС), являющегося одной из актуальных проблем современной медицины. Пищевые продукты и их компоненты обладают всеми свойствами присущими любому антигену: антигенностью (чужеродностью), иммуногенностью и критической массой. Иммунологическая толерантность к пАГ формируется в ранний постнатальный период, и поддерживается в активном состоянии всю жизнь. Нарушение пищевого поведения современного человека, употребление новых по составу и качеству пАГ, красителей, вкусовых добавок, возрастные ферментопатии, сопутствующие воспалительные процессы кишечника – способны индуцировать адаптивный иммунный ответ (ИО) к пищевым детерминантам и привести к временному или манифестному нарушению толерантности. В результате ИО формируются эффекторные механизмы, направленные на элиминации пАГ и сохранение «постоянства своего» с участием цитокинов воспаления, клеточно- опосредованных цитотоксических и иммунокомплесных реакций, которые с большей вероятностью могут запускать системные метаболические нарушения.

Цель. Исследовать роль отмены иммунологической толерантности к пищевым антигенам в развитие метаболического синдрома.

Материалы и методы. Клиническим материалом служила венозная кровь и сыворотка обследованных волонтеров с разным индексом массы тела (ИМТ). Волонтеры с повышенным ИМТ > 27: женщины 20-55 лет, n = 31; мужчины 20-60 лет, n = 25. Окружность талии составляла > 94 см у мужчин, и > 80 см у женщин. Группа сравнения: волонтеры с нормальным ИМТ: 18,5 < ИМТ < 25, аналогичного возраста: женщины, n = 17 и мужчины, n = 12. Основными критериями в группе сравнения являлись соматическое здоровье, отсутствие заболеваний желудочно-кишечного тракта, отягощенность аллергического и аутоиммунного анамнеза. При представлении результатов пищевой интолерантности деление обследованных на группы происходило только по ИМТ. Определение холестерина, триглицеридов, ЛПВП, глюкозы, АлАТ, АсАТ осуществляли с помощью биохимического анализатора Accent 200. Методом ИФА определяли концентрации IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, ТТГ, свободный Т3, инсулин, рассчитывали индексы инсулинорезистентности (ИР) и атерогенности (ИА). Диагностику нарушений иммунологической толерантности к 111 тестируемым пАГ проводили на основе многокомпонентного ИФА. Маркером являлась концентрация специфических иммуноглобулинов G (sIgG) к конкретному пАГ. Для определения индивидуальных кластеров пАГ с признаками сформированной гиперчувствительности в адаптивном иммунном ответе у обследованного использовали методологию, разработанную компанией «Иммунохелс». Статистическую обработку данных проводили в программах SPSS 19.0 с использованием U критерия Манна-Уитни, коэффициента ранговой корреляции Спирмена, критерия Фишера и отношения шансов (OR).

Результаты. При сравнении показателей волонтеров с разным ИМТ было выявлено, что в исследуемой группе (ИМТ > 27) концентрация холестерина, триглицеридов, ЛПНП, IL-6, IL-17, глюкозы, АлАТ, инсулина, общее количество лейкоцитов (ОКЛ), индексы ИР и ИА были статистически значимо повышены по сравнению с группой сравнения ($p < 0,05$). Были выявлены статистически значимые связи между ИА (индексом атерогенности, $Rs = 0,45$, $p < 0,05$), ИР (индексом инсулинорезистентности, $Rs = 0,39$, $p < 0,05$) и IL-6 в сыворотке крови. При оценке частоты встречаемости нарушенной пищевой толерантности к 111 пищевым продуктам, наибольшие отличия были выявлены для продуктов, содержащих белки коровьего молока – 43 и 0%, белки зерновых продуктов – 13 и 6% и антигены продуктов семейства пасленовых 23 и 14%. Максимальная частота встречаемости нарушенной пищевой толерантности у волонтеров с ИМТ > 27 по сравнению с группой сравнения была связана с пАГ: казеина – 49 и 0%, сои – 51 и 29%, глютена – 16 и 0% соответственно. При этом взаимосвязь между установленной

гиперчувствительностью к пАГ казеина, риском развития атерогенных изменений (ИА > 3) OR = 10,5 (2,8;39,9) и повышением концентрации цитокина IL-6, IL-17 была статистически значима ($p < 0,05$). При анализе данных диагностированной гиперчувствительности к пекарским дрожжам в группе с ИМТ > 27 была выявлена статистически достоверная корреляция с одновременным развитием инсулинорезистентности ($F = 0,02056$, $p < 0,05$) и развитием лейкоцитоза OR = 10,0 (1,2; 85,6).

Таким образом, нами предлагается схема патогенетической связи между нарушениями иммунологической толерантности к перечисленным пАГ, провоспалительными цитокинами и традиционными маркерами метаболического синдрома. Данный подход позволяет предложить персонифицированные подходы в коррекции лечения и профилактике метаболического синдрома.

АЛГОРИТМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА (ИС) У ПЕРСОНАЛА ГОРНО-ХИМИЧЕСКОГО КОМБИНАТА (ГХК) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЛИЯНИЯ СЕЗОННЫХ ФАКТОРОВ (ПЕРВЫЙ ЭТАП)

Орадовская И.В., Васильев А.А., Феоктистов В.В., Никонова М.Ф., Викулов Г.Х.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия,

Для выявления особенностей показателей ИС персонала основного производства (ОП) ГХК и формирования алгоритма его изменения в зависимости от влияния сезонных факторов проанализированы показатели иммунного статуса персонала и населения за многолетний период наблюдения. Климат г. Железногорск резко континентальный, с коротким и жарким летом, во второй половине – дождливым. Наиболее теплый месяц – июль, наиболее холодный – январь. Зима суровая с устойчивым снежным покровом в среднем до 163 дней. Влажность воздуха зависит от количества атмосферных осадков и температуры. Весна короткая с неустойчивой ветреной погодой и ночными заморозками; осень – холодная, дождливая, ветряная. Обследование проводили 2 раза в году: весной – в апреле и осенью – в октябре. Выбор этих периодов обусловлен тем, что в иммунной системе преобладают сезонные перестройки в связи с разнонаправленными изменениями температуры и атмосферного давления, что позволило изучить их влияние на ИС. Первичное обследование персонала ГХК, проведенное в весенний сезон, в ИС выявило достоверное снижение лейкоцитов и В-лимфоцитов, повышение лимфоцитов (%), индекса иммунорегуляции, экспрессии $CD95^+$, фагоцитоза, уровня сывороточных IgM, IgG и общего IgE. Последующий мониторинг осеннего сезона показал стабильно сниженный уровень лейкоцитов, схожие значения $CD4^+$Т-лимфоцитов, индекса иммунорегуляции, ФАН с тенденцией к повышению и снижение В-лимфоцитов. Достоверно ниже, по сравнению с весенним сезоном, были показатели лимфоцитов, абс. значений $CD3^+$, $CD4^+$Т, $CD8^+$Т-лимфоцитов, экспрессии $CD25^+$, ФАН и уровня сывороточного IgG; достоверно выше – активированных Т-лимфоцитов и IgM. В осенний сезон по отношению к контролю достоверно были снижены показатели лейкоцитов, абс. значений лимфоцитов, $CD3^+$Т-лимфоцитов, естественных киллеров, относительных и абс. значений В-лимфоцитов; достоверно выше – $CD4^+$Т-лимфоцитов (%), индекса иммунорегуляции, экспрессии $CD95^+$, фагоцитоза, уровня IgM и общего IgE. При сходстве по ряду средних значений параметров ИС по результатам двукратного обследования, выявлен достаточно значимый дисбаланс в показателях клеточного звена, маркеров клеточной активации и уровня иммуноглобулинов. ИС персонала следующего года весеннего мониторинга характеризовался достоверным снижением количества лейкоцитов, абс. значений Т-лимфоцитов, NK-клеток, относительных и абс. значений В-лимфоцитов, повышением $CD4^+$Т-лимфоцитов, ФАН, уровня IgM и экспрессии $CD95^+$. В сопоставлении с показателями ИС предыдущего осеннего обследования выявлены схожие или идентичные средние значения по многим параметрам: $CD3^+$ (абс.), $CD4^+$, $CD8^+$ (%, абс.), $HLADR^+$, акт. Т-лимфоциты, ФАН, IgM, IgG и меньше – IgA. Определялось значительно меньше достоверных отличий: по показателям В-лимфоцитов (%, ↓), $CD25^+$ (↑), общему IgE (↓). Не наблюдалось такого дисбаланса в состоянии иммунитета, как при сопоставлении первых двух обследований. Было установлено, что большая нестабильность и колебания в показателях ИС выявлялись при переходе от весны к осени за летний период, чем при переходе от осени к весне за зимний период. На фоне иммунного дисбаланса возникало повышение частоты клинических признаков иммунной дисфункции инфекционного генеза, в структуре которых преобладали частые ОРВИ. Повышение уровня IgM при снижении показателей клеточного звена, сывороточного IgG, как правило, связано с повышением сезонной заболеваемости респираторно-вирусными инфекциями.

Второй период иммунного дисбаланса наблюдался в переходный сезон от весны к осени при проведении повторного обследования. Особенностью его динамики явилась активация иммунной системы на фоне количественной недостаточности лейкоцитов, снижения абс. значений субпопуляций лимфоцитов при тенденции к повышению процентного содержания $CD3^+$, $CD4^+$Т-лимфоцитов и NK-клеток. В период первого дисбаланса в ИС наблюдалось повышение активационного маркера $CD95^+$, при проведении мониторинга – нарастание экспрессии и увеличение других показателей клеточной активации: $HLA\text{-}DR^+$, акт. Т-лимфоцитов, акт. нейтрофилов (↑ФАН). Определялось статистически значимое снижение уровня IgM, IgG и умеренное повышение общего IgE. Если в ИС весеннего мониторинга, по отношению к предыдущим показателям отмечены относительно стабильные значения по многим параметрам, то в показателях ИС осеннего мониторинга наблюдался весьма значимый дисбаланс в системе клеточного, гуморального звена и значительное усиление экспрессии маркеров активации. Этот дисбаланс также наблюдался за переходное время от летнего сезона к осеннему. Выявленные тенденции в колебаниях ИС следует учитывать при планировании профилактических и оздоровительных мероприятий для персонала ГХК.

АЛГОРИТМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА (ИС) ПЕРСОНАЛА ГХК И НАСЕЛЕНИЯ Г. ЖЕЛЕЗНОГОРСКА НА ЭТАПЕ СЕЗОННОГО МОНИТОРИНГА

Орадовская И.В., Васильев А.А., Феоктистов В.В., Никонова М.Ф., Викулов Г.Х.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия

Второй этап мониторинга, проведенного через 5-6 лет после первичного обследования, включал те же сезоны весна – осень. ИС персонала ГХК в весенний сезон в сравнении с контролем характеризовался достоверным снижени-

ем лейкоцитов, лимфоцитов, повышением относительных значений $CD3^+$Т-лимфоцитов и NK-клеток, ФАН и ФАМ со St. aur. Wood, ФЧН и ФЧМ, ФАМ при опсонизации IgG, а также достоверным снижением абс. значений $CD3^+$, $CD4^+$Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов при тенденции к повышению $HLA\text{-}DR^+$. Динамика показателей ИС осеннего мониторинга выявила снижение $CD8^+$Т-лимфоцитов, $HLA\text{-}DR^+$ и акт. Т-лимфоцитов, а также достоверное повышение индекса иммунорегуляции, В-лимфоцитов и еще большее повышение $CD16^+$ лимфоцитов. По сравнению с весенним обследованием отмечено достоверное снижение относительных и абс. значений $HLA\text{-}DR^+$ (%), акт. Т-лимфоцитов и цитотоксических $CD8^+$Т-лимфоцитов и повышение $CD16^+$ клеток, В-лимфоцитов, ФАН, ФАМ и ФЧН при опс. IgG и тенденция к повышению $CD4^+$Т-лимфоцитов (%). В оба сезона года наблюдалась диссоциация в показателях относительных и абс. значений со снижением абс. значений клеточного звена и В-лимфоцитов. Последующее осеннее обследование персонала ГХК, по сравнению с предыдущим, за сезон весна-осень, выявило в ИС значительно больше отличий. По сравнению с показателями весеннего обследования в ИС определялось достоверное повышение лейкоцитов, абс. значений лимфоцитов, Т-лимфоцитов, $CD4^+$Т-лимфоцитов, относительных и абс. значений $CD8^+$Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, ФЧН при опс. IgG, уровня сывороточных IgG, IgA, а также достоверное снижение $CD4^+$Т-лимфоцитов (%) и индекса иммунорегуляции, $HLA\text{-}DR^+$ (%) и акт. Т-лимфоцитов, ФЧН, ФАМ со St.aur. и ФАМ при опс. IgG. По сравнению с показателями осеннего обследования в ИС определялось достоверное повышение лейкоцитов, абс. значений лимфоцитов, $CD4^+$Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, процентного и абс. содержания $CD3^+$, $CD8^+$Т-лимфоцитов, $HLA\text{-}DR^+$ и акт. Т-лимфоцитов, ФЧМ при опс. IgG, уровня IgG, IgA, достоверное снижение процентного содержания $CD4^+$, $CD16^+$ лимфоцитов, индекса иммунорегуляции, ФАН со St.aur. при опс. IgG, ФЧН, ФАМ без и при опс. IgG. Сопоставление показателей ИС персонала ГХК за наблюдаемые переходные периоды от весны к осени и далее от осени к весне следующего года показало, что в весенне-осенний период наблюдалось сходство в характере изменений при различиях в их величинах по показателям $CD8^+$, $CD16^+$лимфоцитов, маркерах активации $HLA\text{-}DR^+$ и акт. Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Значительно больше различий в изменении ИС определялось в последующий переходный период от осени к весне. Различия выявлялись как в характере отклонений, так и в диапазоне изменений. Сходство определялось только в показателях фагоцитоза. Наибольший дисбаланс выявлялся в показателях клеточного звена и гуморального (В-лимфоцитов, IgG, IgA, общего IgE). На формировании дисбаланса в ИС сказывались и погодные условия. В сезоны весна и осень они были более близкими по температурному режиму, осадкам, ветрам, атмосферному давлению и гелиомагнитным колебаниям. Летний сезон отличался наличием большого количества теплых солнечных дней. Переходный период от осени к весне в зимний сезон отличался низкими температурами, повышенной влажностью, обилием осадков, холодной затяжной весной и меньшим влиянием солнечного света. Погодные условия в сезоны осень и весна последующего года более различались, по сравнению с сезонами весна – осень.

Фенотип ИС у персонала ГХК и населения города, исходно обследованных весной, был очень схожим при достоверных отличиях по ряду параметров. В ИС населения достоверно выше были значения $CD3^+$, $CD4^+$Т-лимфоцитов (%), индекс иммунорегуляции, уровень сывороточных IgM, IgG, достоверно ниже – показатели цитотоксических клеток: относительных и абс. значений $CD8^+$, $CD16^+$ лимфоцитов, а также общего IgE. По сравнению с весенними показателями ИС в осенний сезон у населения выявлено достоверное повышение относительных и абс. значений $CD16^+$-лимфоцитов, ФЧН при опс. IgG и снижение $HLA\text{-}DR^+$ и акт. Т-лимфоцитов. Основные различия выявлялись в значениях цитотоксических клеток и маркерах клеточной активации. Фенотип ИС персонала и населения, обследованных осенью, различался еще меньше. У населения были достоверно снижены значения ФАН, достоверно выше уровень IgM. В ИС населения, обследованного в следующий весенний сезон, как и у персонала ГХК, отмечалось значительно больше отличий. По сравнению с контролем, выявлено достоверное повышение лейкоцитов, абс. значений $CD8^+$Т-лимфоцитов, ФАН и ФАМ, ФЧМ и ФЧМ при опс. IgG, В-лимфоцитов, уровня сывороточных IgM, IgG, IgA и снижение акт. Т-лимфоцитов. наибольшие различия в ИС между персоналом и населением выявлялись в исходно весенний сезон и в переходный период от осени к весне, как у персонала ГХК, со схожим характером изменений. Наибольший дисбаланс в ИС населения, как и персонала ГХК, выявлялся в переходный зимний период от осени к весне и по характеру отклонений был схожим с дисбалансом ИС персонала ГХК.

ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ В РАЗВИТИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА У ШАХТЕРОВ С ПЫЛЕВОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ЛЕГКИХ

Панев Н.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний», Новокузнецк, Россия

Введение. Важным звеном в патогенезе атеросклероза считается развитие дисфункции эндотелия. В настоящее время большое значение в атерогенезе придается также иммуновоспалительным механизмам, которые являются важным фактором повреждения эндотелия. Однако у больных с профессиональной патологией легких иммуновоспалительные механизмы атеросклероза и их взаимосвязь с эндотелиальной дисфункцией мало изучены, что обуславливает актуальность данного исследования.

Цель. Изучить особенности иммунного статуса и нарушений функции эндотелия у шахтеров с пылевой патологией легких в сочетании с атеросклерозом.

Материалы и методы. Обследованы 264 мужчины с ранее установленной пылевой патологией легких (ППЛ): 176 больных хроническим пылевым бронхитом и 88 – антракосиликозом. Контрольную группу составили 59 практически здоровых шахтеров. Всем проведено клинико-инструментальное обследование для выявления атеросклероза (ЭКГ, эхокардиография, велоэргометрия, холтеровское мониторирование ЭКГ, дуплексное и триплексное сканирование экстракраниальных и периферических артерий). Проведено иммунологическое обследование: количество CD3, CD4, CD8, CD16, CD19; определена концентрация сывороточных иммуноглобулинов (Ig) A, M, G, фагоцитарная активность нейтрофилов (ФАН) с частицами латекса; уровень общего комплемента и циркулирующих иммунных комплексов; уровень ци-

токинов: интерлейкинов – 1, 2, 4, 6, фактора некроза опухолей (TNF). Определен уровень белков острой фазы воспаления – гаптоглобина и С-реактивного белка (СРБ). Исследованы уровни маркеров эндотелиальной дисфункции: оксида азота, эндотелина-1, фактора Виллебранда, эдотелиальных молекул адгезии лейкоцитов (sVCAM-1).

Результаты. Были выделены 2 группы больных ППЛ: первая – в сочетании с атеросклеро-зом (201 человек) и вторая – без атеросклероза (63 человека). Анализ показал, что у боль-ных ППЛ в сочетании с атеросклерозом отмечается активация гуморального звена иммунитета с повышением относительного и абсолютного количества CD19, уровня сывороточного IgA, а также белков острой фазы воспаления (гаптоглобина и СРБ), свидетельствующие о наличии воспалительного процесса. Выявлено также увеличение синтеза цитокинов (интерлейкинов – 2, 6 и TNF), отражающее высокую активность иммуновоспалительного процесса у больных ППЛ в сочетании с атеросклерозом. Исследование гуморальных маркеров эндотелиальной функции показало, что у больных ППЛ в сочетании с атеросклерозом снижен уровень оксида азота и повышен уровень эндотелина-1, молекул адгезии лейкоцитов (sVCAM-1) и фактора Виллебранда, что свидетельствует о развитии эндотелиальной дисфункции. Имеется обратная корреляционная взаимосвязь уровня оксида азота с показателями иммуновопалительных процессов (цитокинами, сывороточным иммуноглобулином G, СРБ и общим комплементом) и прямая корреляционная взаимосвязь эндотелина-1 с иммуновоспалительными маркерами (интерлейкином-6, общим комплементом, гаптоглобином).

Заключение. Таким образом, у больных ППЛ в сочетании с атеросклерозом отмечены признаки иммуновоспалительного процесса с активацией гуморального звена иммунитета, увеличением синтеза цитокинов (интерлейкинов- 2, 6, TNF) и белков острой фазы (гап-тоглобина и СРБ), а также различных форм эндотелиальной дисфункции: вазомоторной (снижение синтеза оксида азота, повышение – эндотелина-1), гемостатической (повышение уровня фактора Виллебранда), адгезивной (повышение sVCAM-1). Имеется корреляционная взаимосвязь маркеров эндотелиальной дисфункции с показателями иммунного воспаления. Следовательно, воздействие аэрогенных частиц угольно-породной пыли на организм шахтеров наряду с формированием пылевой патологии легких, вызывает развитие хронического системного воспаления и способствует развитию эндотелиальной дисфункции, повышает риск возникновения раннего атеросклероза и его клинических проявлений.

ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ХЕМИЛЮМИНИСЦЕНТНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Саранчина Ю.В., Кеберле С.П.

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

Введение. Нейтрофилы выступают в качестве первой линии защиты организма от внешних патогенов. Нарушение их бактерицидной активности является патогенетическим звеном ряда заболеваний. Способность нейтрофилов образовывать необходимое количество активных форм кислорода и уровень ответа на индуктор «респираторного взрыва» может характеризовать активность защитных сил организма.

Цель. Определить метаболическую реактивность нейтрофилов при воздействии острой физической нагрузки.

Материалы и методы. Материал – венозная кровь, взятая у 22 студентов специальности «Лечебное дело» 2 и 3 курса (15 девушек и 7 юношей) в возрасте от 18 до 20 лет. Кровь забирали в два этапа: в покое и после воздействия физической нагрузки (пробы Кверга). Интенсивность окислительного взрыва определяли методом хемилюминесценции (ХЛ) при помощи 36-канального хемилюминисцентного анализатора «CL3604». Рассчитывали непараметрический критерий Вилкоксона, статистически значимыми считали различия с достоверностью $p \le 0,05$. Результаты представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей.

Результаты. Показатели спонтанной ХЛ после выполнения острой физической нагрузки статистически значимо отличались от значений в состоянии покоя. Так, после функциональной пробы спонтанное время выхода на максимум снизилось и составило 845,0 (0,0-2823,0) сек и 237,0 (53,0-687,0) сек соответственно ($p = 0,023$). Максимум интенсивности свечения [в покое – 13,9 (4,6-122,7) о.е. $\times 10^7$, после пробы – 370,2 (122,7-485,9) о.е.$\times 10^7$, $p = 0,041$] и площадь под кривой [в покое – 13,3 (11,6-15,3) о.е. $\times 10^{10}$, после пробы – 309,3 (258,8-652,4) о.е. $\times 10^{10}$, $p = 0,002$] статистически значимо повысились.

При зимозан-индуцированной ХЛ также наблюдалось уменьшение времени выхода на максимум [в покое – 4823,5 (4285,0-4945,0) с, после пробы – 845,0 (5,020-1743,0) с, $p = 0,041$], повышение максимума интенсивности [в покое – 133,6 (21,4-161,3) о.е. $\times 10^7$, после пробы – 983,8 (704,9-1309,8) о.е. $\times 10^7$, $p = 0,041$] и площади под кривой [283,1 (60,1-442,8) о.е. $\times 10^{10}$ и 2645,4 (2323,0-3979,3) о.е. $\times 10^{10}$ соответственно, $p = 0,041$]. Индекс стимуляции в состоянии покоя был статистически значимо выше, чем после воздействия стимула [11,8 (3,1-36,8) и 8,3 (3,9-9,9) соответственно, $p = 0,003$].

Заключение. Острая физическая нагрузка вызывает изменение метаболической реактивности нейтрофилов, что проявляется в повышении образования активных форм кислорода. Данная реакция может рассматриваться как показатель адекватной и эффективной функциональной активности нейтрофилов.

СОДЕРЖАНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 И ИНТЕРФЕРОНА-γ В ПЛАЗМЕ КРОВИ СПОРТСМЕНОВ С РАЗЛИЧНЫМ ПРОФИЛЕМ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АСИММЕТРИИ МОЗГА

Тамбовцева А.А., Швыдченко И.Н., Бердичевская Е.М.

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет физической культуры, спорта и туризма», Краснодар, Россия

Физические упражнения можно рассматривать как прототип физического стресса на организм. Как и многие другие физические стрессорные факторы, физические упражнения индуцируют во многом сходную картину гормональных и иммунологических реакций. В то же время иммунные модификации, вызванные физической нагрузкой, обладают широким диапазоном изменений (Walsh et. al., 2011), влияя положительно или отрицательно на здоровье спортсмена. С одной стороны, они

могут привести к повышенному риску возникновения респираторных инфекций (Pedersen, and Bruunsgaard, 1995); с другой стороны, многочисленные данные приводят к появлению новых интересных теорий, связанных с противовоспалительными эффектами регулярных, умеренных физических нагрузок (Petersen, and Pedersen, 2005; Vieira et al., 2011). Психологическая и двигательная индивидуальность человека во многом определяется функциональной асимметрией мозга (ФАМ) (Corballis, 2014). Профиль ФАМ тесно связан с успешностью в отдельных видах спорта и может значительно изменяться под воздействием регулярных физических нагрузок (Бердичевская и др., 2009). Структурная и функциональная асимметрия мозга формирует и регулирует индивидуальную иммунологическую реактивность на стрессорные стимулы (Stoyanov et al., 2012). Экспериментально показано, что эффекты, оказываемые различными полушариями мозга на иммунную систему, являются результатом асимметричного контроля мозга симпатической нервной системы (Neveu, 2008). Некоторые данные подтверждают, что гипоталамо-гипофизарно-адреналовая ось, автономная нервная система и цитокины могут быть вовлечены в это взаимодействие (Kenney and Ganta, 2014).

Цель. Определить влияние функциональной асимметрии мозга (ФАМ) на содержание интерлейкина (IL) 4 и интерферона-γ (IFNγ) в плазме крови спортсменов разного пола и тренированности с учетом их гормонального статуса. В исследовании приняли участие 44 спортсмена обоего пола (14 девушек и 30 юношей) различной спортивной специализации и квалификации (возраст от 18 до 21 года). Все участники были полностью информированы о целях исследования и подписали добровольное информированное согласие на участие в нем. При формировании групп все спортсмены в зависимости от индивидуального профиля асимметрии (ИПА) были разделены на четыре группы: I – юноши «правши», n = 14; II – юноши «левши», n = 16; III – девушки «правши», n = 8; IV – девушки «левши», n = 6. Группы I и II были разделены на 2 подгруппы с учетом квалификации юношей-спортсменов: Ia, IIa – высококвалифицированные спортсмены и Ib, IIb – спортсмены низкой квалификации. Концентрацию цитокинов и гормонов (адреналина, норадреналина, кортизола) в плазме крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем, согласно инструкции к тест-наборам. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 7 (StatSoftInc., США). Наблюдаемые различия считались не случайными при $P < 0,05$. В результате исследования не было выявлено статистически значимых гендерных различий между группами «правшей» и «левшей». Уровень IL-4 в плазме крови незначительно превышал порог чувствительности метода и не зависел ни от ФАМ, ни от тренированности спортсменов. В то же время содержание IFNγ у юношей с разным профилем ФАМ зависело от их тренированности: высококвалифицированные юноши как «правши», так и «левши» имели повышенное содержание IFNγ по сравнению со спортсменами низкой квалификации: 81,45 (74,50-89,30) и 90,60 (72,50-189,00) пг/мл против 63,20 (61,65-72,35) и 65,50 (57,40-66,70) пг/мл соответственно ($P < 0,05$). Содержание IFNγ положительно коррелировало с концентрацией кортизола у высококвалифицированных юношей «левшей» ($r = 0,63$), однако у «правшей» такая взаимосвязь отсутствовала. «Левши» имели также сниженный, по сравнению с правшами, уровень адреналина в плазме крови, но это не было связано с их тренированностью. Таким образом, содержание IFNγ у юношей спортсменов не обусловлено различиями в профиле ФАМ, а зависит от их тренированности. Повышенные уровни IFNγ в плазме крови высокотренированных спортсменов определяются, вероятно, факторами, отличными от гормонов стресса.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края, проект № 13-04-96560р_юг_а.

СВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ УПРАЖНЕНИЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 В СЛЮНЕ У ДЕТЕЙ

Швыдченко И.Н., Сергеев С.В.

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет физической культуры, спорта и туризма», Краснодар, Россия

В течение последних лет достигнуты значительные успехи в изучении влияния физических нагрузок на функционирование иммунной системы. В то же время, количество работ, посвященных детям, по-прежнему, небольшое, в связи с чем, наше понимание взаимодействий между физической нагрузкой и иммунной системой в детском и подростковом возрасте остается недостаточным. Физическая активность играет важную роль в тканевом анаболизме, росте и развитии организма. Уникальной особенностью физических упражнений является то, что они приводят к одновременному повышению антагонистических медиаторов: анаболических гормонов (гормона роста, инсулино-подобного ростового фактора 1) и катаболических провоспалительных цитокинов, таких как, интерлейкин (IL) 1β, IL-6, фактор некроза опухоли (TNF) а (Nemet, Eliakim, 2010). Это подчеркивает важность адаптации к физическим упражнениям детей и подростков. Оптимальный баланс между анаболическими и воспалительными/катаболическими ответами на нагрузку определяет эффективность занятий и положительное воздействие физических упражнений на здоровье детей и подростков.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния однократной физической нагрузки на содержание IL-8 в слюне у детей, посещающих секцию борьбы дзюдо.

В исследовании приняли участие 19 мальчиков: 9 детей в возрасте от 5 до 7 лет (1-е детство) и 10 детей в возрасте от 8 до 12 лет (2-е детство). Родители всех участников были полностью информированы о целях исследования и подписали добровольное информированное согласие на участие в нем ребенка. Критериями включения в исследование также служили: отсутствие острых воспалительных заболеваний и обострений хронических заболеваний, отсутствие иммунопатологии и заболеваний полости рта. Тренировочное занятие проводилось в течение 90 мин и включало в себя оздоровительные физические упражнения, направленные на укрепление мышц опорно-двигательного аппарата, элементарные технико-тактические приемы. Образцы слюны (1-2 мл), полученные до и после тренировки, центрифугировали, отбирали супернатант и хранили его при -20 °С до проведения исследования. Концентрацию IL-8 в слюнной жидкости определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией

к тест-набору (ООО «Цитокин», Россия). Чувствительность метода составляла 20 пг/мл. Обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 7 (StatSoftInc., США). Центральные тенденции и дисперсии количественных признаков описывали медианой и интерквартильным размахом (Q_1-Q_3). Сравнение групп по количественным признакам проводили с использование непараметрических критериев Манна–Уитни – для сравнения двух независимых групп и критерия Вилкоксона для парного сравнения двух зависимых групп. Наблюдаемые различия считались не случайными при $P < 0,05$. В результате проведенного исследования нами не было выявлено статистически значимых различий в содержании IL-8 в слюне до тренировки между группами детей 1-го и 2-го детства: у детей в возрасте от 5 до 7 лет концентрация IL-8 в слюне составила 229,1 (130,7-505,0) пг/мл, у детей от 8 до 12 лет – 267,0 (72,6-536,0) пг/мл. После однократного тренировочного занятия саливарный уровень IL-8 у детей обеих возрастных групп повысился, при этом у детей 2-го детства наблюдались тенденции к более высокому приросту IL-8 по сравнению с детьми младшего возраста: 500,0 (246,0-1190,0) пг/мл ($P < 0,01$) и 390,0 (222,0-494,0) пг/мл ($P < 0,05$), соответственно. Таким образом, однократная физическая нагрузка приводит к повышению провоспалительного статуса детей, вероятно, за счет усиления активности симпатической нервной системы.

Работа поддержана РФФИ и Министерством образования и науки Краснодарского края, проект № 16-44-230391р_а.

ЭКСПРЕССИЯ АКТИВАЦИОННЫХ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ НЕЙРОМЫШЕЧНОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Широлапов И.В., Пятин В.Ф., Жестков А.В., Никитин О.Л., Баишева Г.М., Веретельник Е.Н.

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Самара, Россия

Одним из перспективных направлений иммунологических исследований является анализ активационного профиля лимфоцитов, поскольку качество и характер иммунного ответа взаимосвязаны с активностью различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток. Так, повышение уровня экспрессии поверхностных активационных антигенов лимфоцитов может совпадать с обострением патологического процесса, коррелирует с усилением активности иммунной системы или выражает ее способность и «готовность» отвечать на воздействие факторов окружающей среды, включая различные патогены и стрессоры. Немедикаментозная реабилитация в условиях длительной нейромышечной стимуляции находит в последние годы всё более широкое применение не только в физиологии движений и профессиональном спорте, а также в практике восстановительной медицины, однако влияние такого воздействия на систему иммунного реагирования остается мало изученным.

Исследование динамики экспрессии ранних и поздних активационных маркеров лимфоцитов при длительной нейромышечной стимуляции составило цель нашей работы.

Материалы и методы. Иммунологическое исследование выполнено у 39 женщин (группа нейромышечной стимуляции – 20 человек, возраст 65±4 года; группа контроля – 19 женщин, 67±4 года). Для нейромышечной стимуляции использовали аппарат для медицинской реабилитации Power Plate (Голландия), продолжительность тренинга – 24 недели. Реабилитационный режим: нагрузка по принципу прогрессии 3 раза/нед по 30 мин, частота работы платформы 30-40 Гц, амплитуда смещения – 2 мм. Методом проточной цитометрии исследовано количество клеток, экспрессирующих $CD25^+$ и $HLA\text{-}DR^+$.

Результаты. Исследование активационных процессов в иммунной системе женщин выявило, что уровень экспрессии на лимфоцитах маркера ранней стадии активации ($CD25^+$ – α-цепь рецепторного комплекса интерлейкина-2) практически не изменялся в течение всей программы исследования у испытуемых из обеих групп. Так, в группе контроля этот показатель находился на уровне 16±3 кл/мл. В группе нейромышечной стимуляции абсолютное количество лимфоцитов, экспрессирующих $CD25^+$, незначительно снизилось к 24-й неделе тренинга (15±1 кл/мл, $p > 0,05$). Различия в показателе экспрессии $CD25^+$ между обеими группами не были достоверными. Абсолютное количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер поздней активации ($HLA\text{-}DR^+$), в группе нейромышечной стимуляции было наиболее низким через 12 недель исследования (92±15 кл/мл), что соответствовало снижению на 39,87% ($p < 0,05$). Однако к концу 24 нед этот показатель в испытуемой группе несколько увеличился до значений, близких к таковым перед стартом программы (136±16 кл/мл, $p < 0,05$). В группе контроля наблюдалось постепенное снижение абсолютного количества $CD3^+DR^+$ лимфоцитов: 174±23, 150±24, 144±21 кл/мл в начале исследования, в середине и в конце соответственно. Различие по абсолютному количеству $CD3^+DR^+$ лимфоцитов между группами было достоверным через 12 недель исследования.

Заключение. Обострение ряда заболеваний, в частности атопических, сопряжено с интенсивными активационными процессами в иммунной системе, что сопровождается выраженным увеличением экспрессии ранних активационных антигенов, одновременно усиленная экспрессия поздних маркеров коррелирует с тяжестью заболевания. В нашем исследовании показано, что длительная нейромышечная стимуляция не вызывает усиления активационного профиля лимфоцитов, а также каких-либо патологических сдвигов в основных показателях иммунной системы человека, поэтому является объективно-безопасным типом спортивной и медицинской реабилитации.

ИММУНОЛОГИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У КОЗ ЗААНЕНСКОЙ ПОРОДЫ В ПЕРИОД РАЗДОЯ

Бахта А.А.

ГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Иммунологический статус животного формируется при определенных условиях содержания и кормления и, таким образом, приобретает индивидуальностью, его также отличает вид животного, пол, возраст, особенности организма. Немаловажным фактором является период технологического цикла. Представляет интерес изучение иммунологического статуса коз зааненской породы в период раздоя.

Цель и задачи. Изучить состояние факторов врожденного иммунитета у коз зааненской породы в период раздоя. В ходе исследования в задачи входило: изучить уровень лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови, изучить показатели фагоцитоза, такие как фагоцитарное число, фагоцитарный индекс, фагоцитарную активность у коз зааненской породы в период раздоя.

Материалы и методы. Исследование проведено на группе коз зааненской породы в период раздоят (n = 30). В крови определяли лизоцимную активность по методу Дорофейчука, БАСК определяли по методу Смирновой О.В. и Кузьминой Т.В., фагоцитарную активность определяли с использованием культуры *Staph. albus.*

Результаты. У коз зааненской породы в период раздоя уровень лизоцимной активности составил 10,55±1,2 % лизиса, уровень БАСК составил 62,55±5,65% лизиса *E. coli*, фагоцитарное число 4,6±0,9, фагоцитарный индекс 2,2±0,4, фагоцитарная активность 72,55±8,95. При анализе полученных данных выявлено, что уровни показателей вороженного иммунитета в данный период характеризуются максимальными значениями по сравнению с другими технологическими стадиями.

Заключение. Полученные данные указывают на то, что у коз после родов в период раздоя наблюдается максимальная активация факторов врожденного иммунитета.

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА У КОШЕК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ХПН, ВЫЗВАННОЙ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

Карпенко Л.Ю., Бахта А.А., Трофимец Е.И.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Хроническая почечная недостаточность (ХПН) – это симптомокомплекс, являющийся исходом многих хронических болезней почек, при котором про-

ТАБЛИЦА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС КОШЕК НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ХПН, ВЫЗВАННОЙ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ (M±m, N = 20) (К ТЕЗИСАМ КАРПЕНКО Л.Ю. И ДР. «ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА У КОШЕК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ХПН, ВЫЗВАННОЙ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ»)

№	Показатель	Ед. из.	Опыт (n = 15)			Контроль (n = 5)
			Латентная стадия (n = 5)	Стадия азотемии (n = 5)	Стадия уремии (n = 5)	
1	Лизоцимная активность	Ед. ОП	10,3±1,2	9,53±0,9	8,11±0,85*	15,1±0,3
2.	БАСК	% лизиса *E. coli*	65,3±8,5	53,66±5,8	40,32±5,5*	69,46±0,3
3	Фагоцит. инд.	%	61,3±2,3	56,46±2,7	50,15±3,1*	65,3±2,3
4	Фагоцит. число		10,3±1,23	9,32*	6,51±1,3*	11,5±0,95
5	Фагоцит. индекс		1,1±0,03	0,91±0,02	0,71±0,015*	1,23±0,02
6	Иммуноглобулин А	г/л	4,12	3,12	5,02±1,3	3,32±1,76
7	Иммуноглобулин М	г/л	2,5	3,4	2,3±1,34	1,5±0,65
8	Иммуноглобулин В	г/л	11,3	8,5	13,32±2,3*	9,15±1,32
9	ЦИК	Оп.ед.	0,14±0,025	0,18±0,3	0,2±0,02*	0,08±0,01
10	γ-глобулины	г/л	18,32	18,53	25,48	15,14

Примечание.* – достоверно относительно значений у контрольной группы ($p < 0,005$).

исходит необратимая гибель большинства нефронов, в результате чего почки перестают справляться со своей функцией выведения токсических веществ из организма животного. В ветеринарной практике эта патология встречается достаточно часто (до 14,1% от общего количества клиентов ветеринарных клиник, и может быть одной из основных причин заболеваемости и смертности животных. Наиболее часто причиной развития ХПН у кошек становится гломерулонефрит, связанный с отложением комплексов антиген–антитело в базальной мембране клубочков. Данная патология характеризуется неуклонным прогрессированием, начавшись, процесс постепенно приводит к склерозированию почечной ткани. Таким образом, представляет интерес изучение изменений врожденного и приобретенного иммунитета у кошек при данной патологии, так как гломерулонефрит, в отличие от других первоначальных причин развития ХПН, имеет иммуно-воспалительную природу.

Цель и задачи. Изучить динамику показателей врожденного и приобретенного иммунитета у кошек с ХПН, вызванную гломерулонефритом.

Материалы и методы. Иммуно-биохимические исследования у кошек с разными стадиями ХПН проводили на кафедре биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины». Объектом исследования являлись кошки с разными стадиями ХПН. Для исследования отобрали кошек в возрасте 7-9 лет, беспородных, у которых причиной развития данной патологии являлся гломерулонефрит. Из данной группы животных (n = 15) 5 кошек были отобраны с латентной стадией ХПН, 5 кошек со стадией азотемии и 5 кошек со стадией уремии. Группой контроля была группа клинически здоровых кошек (n = 5), подобранная по методу пар-аналогов. По полученным результатам, отраженным в таблице, видно, что в процессе прогрессирования ХПН снижается активность врожденного иммунитета, в то время как повышается активность приобретенного иммунитета. Такие явления со стороны иммунной системы связаны с иммуно-воспалительной природой гломерулонефрита.

Заключение. Таким образом, по полученным данным можно судить о том, что в процессе прогрессирования ХПН у кошек наблюдается снижение активности врожденного иммунитета, и усиление активности приобретенного. Данное исследование указывает на то, что гломерулонефрит отличается иммунно-воспалительной природой. В практике ветеринарного врача данные знания возможно применить при выборе соответствующей терапии, ориентируясь на первопричину возникновения патологического процесса.

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПОРОСЯТ

Карпенко Л.Ю., Енукашвили А.И., Балыкина А.Б.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Среди болезней новорожденных поросят, наносящих большой экономический ущерб, широкое распространение получили болезни желудочно-кишечного тракта, протекающие с симптомами диареи. В качестве возбудителей этих болезней выступают многочисленные представители вирусов, бактерий. Большое значение имеет, в связи с этим, знание особенностей состояния иммунной резистентности поросят на разных возрастных этапах развития.

Цель и задачи. Изучение возрастной динамики содержания Т- и В-лимфоцитов у поросят раннего постнатального периода.

Материалы и методы. Исследование было проведено на 5 группах животных: 1 группа – новорожденные поросята до дачи молозива (n = 10), 2 группа- поросята в возрасте 96 часов (n = 10), 3 группа – поросята в возврате 10 дней (n = 10), 4 группа – поросята в возрасте 20 дней (n = 10), 5 группа – поросята в возрасте 60 дней (n = 10). В крови определяли содержание Т- и В-лимфоцитов. Т-лимфоциты определяли методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана, В-лимфоциты определяли в реакции розеткообразования с эритроцитами барана, обработанными антителами с комплиментом.

Результаты. Представлены в таблице.

Полученные данные свидетельствуют о том, что общее количество Т- и В-лимфоцитов у поросят раннего постнатального периода подвержено возрастным изменениям. Наименьшее количество числа лимфоцитов было у новорожденных поросят до выпойки молозива, максимальное значение наблюдалось у поросят в возрасте 60 дней. В даннике общего количества лимфоцитов в крови поросят прослеживается тенденция к увеличению абсолютного числа лимфоцитов по мере увеличения возраста животных. Рассматривая отделано динамику Т- и В-лимфоцитов следует отметить, что в первые дни жизни поросят основную массу среди лимфоцитов составляли Т-клетки. По мере взросления животных идет увеличение как абсолютного числа В-лимфоцитов, так и количества розеткообразующих В-лимфоцитов.

Заключение. Нами отмечено, что до дачи молозива, содержание Т- и В-лимфоцитов у поросят является минимальным, после приема молозива количество лейкоцитов возрастает за счет лимфоцитов. Далее с 10 по 60

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ КАРПЕНКО Л.Ю. И ДР. «ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПОРОСЯТ»)

Возраст поросят	Количество лимфоцитов × 10^9/л	Т-лимфоциты				В-лимфоциты ЕАС-РОК	
		а ЕРОК		ЕРОК			
		*10^9/л	%	*10^9/л	%	*10^9/л	%
До дачи молозива	4,99±0,07	0,80±0,02	6,5±0,3	2,5±0,1	18,4±0,5	1,6±0,1	12,7±0,6
96 часов	6,44±0,13	1,36±0,06*	7,7±0,5	3,66±0,17	20,4±0,6	2,4±0,1	13,5±0,8
10 дней	10,14±0,18*	1,63±0,15	7,2±0,7	5,06±0,25*	22,6±0,9	3,43±0,16*	15,1±0,6
20 дней	11,8±0,19	1,8±0,13	7,7±0,6	5,4±0,27	31,3±1,3*	3,96±0,19	26,4±0,9*
60 дней	12,15±0,4	2,6±0,3*	15,4±0,8*	5,56±0,6	39,4±1,4*	4,03±0,3	35,7±07*

Примечание.* – статистически достоверно относительно показателей предыдущего возраста ($p < 0,05$).

день наблюдается возрастание количества лимфоцитов, за счет В-клеток, данный механизм компенсирует описанный дефицит факторов естественной резистентности у поросят данного возрастного периода.

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЛИЗОЦИМНОЙ И БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПОРОСЯТ

Карпенко Л.Ю., Енукашвили А.И., Балыкина А.Б.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Основная нагрузка по защите организма поросят в ранний постнатальный период ложится на факторы неспецифического иммунитета. Первые недели жизни являются критическими фазами для молодняка, ведь в этот период системы защиты организма только начинают развиваться, и поросята наиболее уязвимы для воздействия негативных факторов. Большое значение имеет, в связи с этим, знание особенностей состояния факторов врожденного иммунитета у поросят раннего постнатального периода.

Цель и задачи. Целью исследования было изучение возрастной динамики активности лизоцима крови и бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК) у поросят раннего постнатального периода.

Материалы и методы. Исследование было проведено на 5 группах животных: 1 группа – новорожденные поросята до дачи молозива (n = 10), 2 группа – поросята в возрасте 96 часов (n = 10), 3 группа – поросята в возврате 10 дней (n = 10), 4 группа – поросята в возрасте 20 дней (n = 10), 5 группа – поросята в возрасте 60 дней (n = 10). В крови определяли лизоцимную активность по методу Дорофейчука, БАСК определяли по методу Смирновой О.В. и Кузьминой Т.В.

Результаты (представлены в таблице)**.** Полученные данные свидетельствуют о том, что наименьшее значения лизоцимной активности наблюдается у новорожденных поросят до дачи молозива. Далее на протяжении всех исследуемых периодов наблюдается увеличение данного показателя. На весь исследуемый период данный показатель увеличился в 23,8 раза. При анализе уровня БАСК следует отметить, что минимальные значения наблюдаются в возрасте 20 дней, максимальные значения в возрасте 96 дней в период выпойки молозива.

Заключение. Нами отмечено, что до дачи молозива, содержание таких факторов врожденного иммунитета как лизоцимная и бактерицидная активности сыворотки крови является минимальным, после дачи молозива наблюдается возрастание данных показателей неспецифической защиты. После 96 часов, начиная с 10-дневного возраста, происходит постепенное снижение показателей врожденного иммунитета вплоть до 20-дневного возраста. Эти изменения связаны с изменением состава молока свиноматок и недостаточным развитием собственных защитных механизмов. Таким образом, возрастной период 10-20 дней можно считать критическим периодом в раннем постнатальном развитии поросят.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ЛИМФОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПОРОСЯТ ПРИ ОСТРОЙ БРОНХОПНЕВМОНИИ

Крячко О.В.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Функция рецепторных молекул и их ассоциаций состоит во взаимодействии с внеклеточными компонентами и инициировании специфического клеточного ответа. Эти и другие молекулы поверхности лейкоцитов экспрессируются на определенных стадиях дифференцировки и активации клеток белой крови и являются характерными фенотипическими признаками последних. Тест розеткообразования, применяемый для выявления поверхностных рецепторов на мембране лейкоцитов, основан на различиях их рецепторной структуры (лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов), которые при взаимодействии с эритроцитами могут спонтанно присоединять последние к своей поверхности. Прямой тест используют для определения количества Т-лимфоцитов (т.к. эти клетки несут рецепторы к эритроцитам барана). Розетки могут формироваться за счет иммуноглобулинов, которые образуются в В-клетках или фиксируются на клетках (гранулоцитах, моноцитах). Феномен розеткообразования может возникать не только с эритроцитами, но и с другими клетками и искусственными гранулами.

Цель. Выявить динамику экспрессии рецепторов к эритроцитам барана на лимфоцитах и нейтрофилах крови поросят при остром течении бронхопневмонии.

Материалы и методы. Объект исследования – свиньи 3,5 мес. возраста, больные неспецифической бронхопневмонией. Животные содержались в условиях свинокомплекса на стандартном рационе и подбирались по принципу аналогов (порода, живая масса, общее развитие). Были сформированы две группы по 6 животных: 1-я – с клиническими признаками заболевания легких (поросятам этой группы проводили антибиотико- и витаминотерпию по схеме хозяйства в течение 15 суток) и 2-я – клинически здоровых, в дальнейшем именуемые «интактные». Диагноз «бронхопневмония» ставился на основании результатов клинического осмотра, термометрии, наличия кашля, истечений из носовых ходов. Пробы крови отбирали у поросят из орбитального венозного синуса по методике Дж. Понда (1983). Кровь от 6 животных каждой группы исследовали до лечения и через 7, 14 и 21 сутки после его на-

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ КАРПЕНКО Л.Ю. И ДР. «ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЛИЗОЦИМНОЙ И БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПОРОСЯТ»)

Возраст поросят	Лизоцимная активность, % лизиса	БАСК,, %
До дачи молозива	1,4±03	62,52±5,5
96 часов	5,8±0,41*	78,9±5,0*
10 дней	6,8±1,3	70,8±4,1*
20 дней	12,2±1,59*	50,44±6,5*
60 дней	33,4±2,4*	64,2±5,0

Примечание.* – статистически достоверно относительно показателей предыдущего возраста ($p < 0,05$).

чала. Определение содержания розеткобразующих лейкоцитов с эритроцитами барана (Е-РОЛ и Е-РОН) проводили по экспресс-методике И.Д. Понякиной и соавт. (1991). Определение индекса нагрузки (ИН) производили по формуле: ИН = Е-РОЛ,% / Е-РОН,%, где Е-РОЛ – количество Е-розеткообразующих лимфоцитов; Е-РОН – количество Е-розеткообразующих нейтрофилов.

Результаты. Относительное количество Е-РОЛ в начале заболевания в 1,3 раза было ниже ($P > 0,05$) уровня интактных животных; затем отмечалось нарастание процента Е-РОЛ – максимальное значение 42,0±3,39% на 14-е сутки, но достоверных отличий между результатами исследований до и после лечения не установлено, средние показатели колебались в пределах 38,6-42,0% не достигая уровня интактных животных. Абсолютное содержание Е-РОЛ имело сходную динамику с таковой относительного содержания Е-РОЛ, то есть имело тенденцию к снижению и к 21-м суткам в 1,2 раза было ниже исходного показателя и в 1,4 раза ниже ($P > 0,05$) уровня интактных животных.

Как относительное, так и абсолютное количество нейтрофилов, обладающих адгезивной активностью (Е-РОН) имели тенденцию к снижению и было в 1,2 раза ($P > 0,05$) ниже уровня интактных животных. В процессе лечения относительное содержание Е-РОН продолжало снижаться и уже через 7 суток было в 1,5 раза ниже ($P > 0,05$) исходного значения; далее показатель несколько повышался, но не достигал исходного уровня и был в 1,5 раза ниже ($P > 0,05$) уровня интактных животных. В абсолютных цифрах колебания количества Е-РОН имели несколько иную динамику: было отмечено возрастание показателя к 14-м суткам до 0,22±0,04 Г/л, что не имело достоверных отличий от уровня интактных животных, далее наблюдали резкое снижение показателя до 0,13±0,05 Г/л, что в 1,7 раза было ниже ($P < 0,05$) предыдущего значения.

Индекс нагрузки, вычисляемый как соотношение розеткообразующих лимфоцитов и нейтрофилов, являющийся интегральным показателем и объективно указывающий на наличие в организме сбалансированной иммунной реакции, к 14-м суткам возрастал ($P < 0,05$) в 1,5 раза с 4,72±0,41 до 7,36±0,96 ед., что свидетельствовало о снижении к этому сроку сопротивляемости организма и дисбалансе в иммунной системе исследованных животных.

Таким образом, количество рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток крови поросят при остром течении бронхопневмонии имело тенденцию к снижению, что и определяло специфику иммунного ответа при данной патологии с наличием дисбаланса между его звеньями.

ЛИМФОИДНАЯ ТКАНЬ СТЕНКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ ВОЛКА – *CANIS LUPUS*

Панфилов А.Б.[1], Зеленевский Н.В.[2], Щипакин М.В.[2], Вирунен С.В.[2], Прусаков А.В.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», Киров, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Иммунная система животных находится в сфере пристального внимания ветеринарных морфологов. Ухудшающаяся экология и возрастающее антропогенное воздействия на естественные биоценозы нередко приводят к срыву адаптационных возможностей и сокращению популяции редких и исчезающих видов. С этой точки зрения иммунная система является индикатором экологического благополучия.

Одним из крупных периферических отделов иммунной системы является кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань. Иммунные структуры, ассоциированные со слизистой оболочкой толстой кишки, расцениваются как барьерные, способные оказать защиту в случае антигенного воздействия. Лимфоидные узелки, часто с герминативными центрами и короной из Т-лимфоцитов, имеются в собственной пластинке и подслизистой основе стенки толстой кишки животных.

Цель. Изучить синтопию, половые особенности и морфометрические параметры кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани как периферических органов иммунной защиты у волка (*Canis lupus*), обитающего в естественном биоценозе.

Материалы и методы. Обследована толстая кишка 14 волков обоего пола в возрасте девяти месяцев, обитающих в Кировской области. Материалом для исследований служили органокомплексы толстой кишки в естественной синтопии. Подготовку кадаверного материала и дифференцировку лимфоидных узелков проводили по Т. Гельльман (1921) в модификации А.Б. Панфилова (2016).

Результаты. Общая площадь стенки трёх отделов толстой кишки девятимесячных волков и волчиц составила в среднем соответственно 596,93±83,21 см^2 и 343,42±65,78 см^2. Отмеченная разница связана в основном с площадью стенки ободочной кишки (у волка 383,2±64,23 см^2, а у волчицы – 168,49±54,4 см^2), и в меньшей степени с площадью стенки прямой кишки: у волка она больше на четверть.

В слизистой оболочке слепой кишки расположены одиночные лимфоидные узелки и лимфогландулярные комплексы. Плотность округлых, диффузно расположенных как первичных, так и вторичных лимфоидных узелков на 1 см^2 в слепой кошке волка составляет 9,73±1,54 штук, а у волчицы – 10,21±1,95 штук. В стенке ободочной кишки у волчицы насчитывается 10,72±1,69 лимфоидных узелка, а у волка – 8,44±1,25 узелка на 1 см^2. У обоих полов в стенке проксимального отдела прямой кишки волка число лимфоидных узелков в среднем равно 11,32±1,75 штук на 1 см^2. При этом статистическая разница между аналогичными показателями у самца и самки этого вида статистически недостоверна ($p \geq 0,05$).

Заслуживают внимания полученные нами данные по плотности расположения лимфоидных узелков в стенке дистального участка прямой кишки волка. У самца этот показатель равен 36,18±4,25, а у самок достигает 67,39±6,12 штук на 1 см^2.

Заключение. Вся площадь кишечно-ассоциированная лимфоидной ткани толстой кишки к площади её стенки составляет у волчицы 29,91%, а у волка – 65,24%.

ФАГОЦИТАРНАЯ СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У ЛОШАДЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ОБСТРУКТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ В ДИНАМИКЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГАЛОТЕРАПИИ

Романова О.В.[1], Крячко О.В.[1], Червинская А.В.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. У лошадей хронические воспалительные заболевания нижних воздухоносных путей (ХОБЛ) сопровождаются стойким повышением вязкости бронхиальной слизи, что приводит к тяжелым продолжительным нару-

шениям внешнего дыхания. Наиболее распространённой причиной гиперпродукции слизи в крупных бронхах и бронхиолах у лошадей является вирусная инфекция, перенесённая в раннем возрасте (грипп, адено-, герпесвирусная инфекция и пр.) или персистентная герпесвирусная инфекция, которая может определяться в некоторых районах у 100% поголовья спортивных лошадей. Все вирусы герпеса лошадей (ВГЛ) обладают выраженным иммуносупрессивным действием, некоторые типы ВГЛ способны длительное время – на протяжении всей жизни лошади – сохраняться в эпителиоцитах, спинномозговой жидкости животных. Этими особенностями и определяется хроническое, почти бессимптомное, течение некоторых герпесвирусных инфекций. Клинически воспалительные заболевания нижних дыхательных путей визуализируются только тогда, когда вторично контаминированная слизь у больных или переболевших ВГЛ лошадей накапливается в бронхах, становится предельно вязкой, плотной и обусловливает бронхоконстрикцию. Таким образом, представляются важными превентивные или симптоматические меры по контролю уровня врожденного иммунитета у лошадей с признаками хронического нарушения дыхания.

Цель. Изучить влияние сухого солевого аэрозоля на показатели функциональной активности нейтрофилов периферической крови у лошадей с признаками воспалительных заболеваний дыхательных путей.

Материалы и методы. В наших опытах мы использовали 12 голов лошадей, страдающих ХОБЛ на протяжении нескольких лет, сформированных в 2 группы по 6 животных, одна из которых (опыт) находилась на 10-дневном курсе галотерапии, другие 6 лошадей служили контролем и не получали лечения. До начала исследований и после сеансов галотерапии у лошадей обеих групп получали периферическую кровь, где определяли общее число нейтрофилов и их фагоцитарную активность по методу Потапова С.Г. (1977).

Результаты. В результате исследований получены данные о том, что сухой солевой аэрозоль натрия хлорида оказывает позитивное влияние на функциональную активность нейтрофилов, в частности, на их способность к фагоцитозу. Число нейтрофилов, способных к фагоцитозу возрастало в 1,62 раза ($P \leq 0,05$) по сравнению с исходным уровнем уже после первого сеанса галотерапии с 22,7±0,82% до 36,7±2,50%, что в 1,5 раза превысило ($P \leq 0,05$) аналогичный показатель у животных контроля – 24,1±1,71%. Спустя 10 дней число фагоцитарноактивных нейтрофилов у лошадей получавших галотерапию оставалось на достигнутом после первого сеанса уровне, достоверно превышая показатели контрольной группы. В контрольной группе животных фагоцитарная активность нейтрофилов была почти постоянной (21-22-24 %) и на протяжении всего эксперимента не претерпевала достоверных изменений по отношению к исходному значению. Под влиянием галотерапии увеличивалось не только число нейтрофилов, способных к фагоцитозу, но и количество поглощенных ими объектов почти в 2,0 раза ($P \leq 0,05$) по сравнению с исходным значением и уровнем группы контроля 2,05±0,91 против 0,98±0,54 ед.

Заключение. Полученные нами данные позволяют говорить о положительном влиянии сухого солевого аэрозоля на показатели врожденного иммунитета лошадей, в частности, на их микрофагальное звено. Для лошадей это имеет принципиальное значение, так как именно с изменением нейтрофильной активности связывают большинство хронических патологий у этого вида животных.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ СТАРЫХ ЛОШАДЕЙ

Щипакин М.В., Дугучиев, И.Б., Зеленевский, Н.В., Прусаков, А.В., Вирунен, С.В.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Базой для проведения исследований послужил единственный в Российской Федерации «Конный реабилитационный центр «Дар». В настоящее время

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ ЩИПАКИНА М.В. И ДР.)

Показатели	Референтные значения и единицы измерения	Возраст лошадей 24 года	Возраст лошадей 27 лет	Возраст лошадей 30 лет
Л	5,0-10,0 × 10^9/л	4,00±0,52	9,52±0,95	11,43±0,82
Э	5,5-9,0 × 10^{12}/л	8,91±0,93	6,23±0,74	5,08±0,61
Hgb	80-140 г/л	161,25±18,39	117,79±13,14	88,62±9,29
Hct	30-50	41,32	29,53	24,17
Лейкограмма				
М	0 %	0	0	0
Ю	0 %	0	0	0
П	1-6 %	0	2	4
С	45-70 %	63	53	47
Э	1-4 %	0	0	1
Б	0-1 %	0	0	0
МОН	0-5 %	5	6	7
Л	20-45 %	39	31	19
СОЭ	40-70 мм/час	38	60	72

в нём содержатся более 60 лошадей в возрасте от 10 до 35 лет. Для лошадей созданы адекватные возрасту и физиологическому состоянию гигиенические условия содержания.

Цель. Определить иммунологические показатели крови лошадей в возрасте от 24 до 30 лет.

Материалы и методы. Средняя продолжительность жизни лошади составляет 18 лет. Обследованы старые лошади трёх возрастных групп (24 года, 27 лет, 30 лет) по пять животных в каждой. Биохимические и клинические исследования венозной крови проведены на анализаторе Stat Fax 2100 Awareness, лейкограмма определена по Шиллингу.

Результаты. Установлены следующие биохимические и морфологические показатели крови (табл.)

У лошадей в возрасте 24 года установлено статистически достоверно меньшее число лейкоцитов в сравнении с животными старших возрастных групп и референтных показателей. Одновременно зафиксировано последовательное снижение числа эритроцитов: если у лошадей в возрасте 24 года этот показатель равен $8,91 \pm 0,93 \times 10^{12}$/л; к 30-летнему возрасту, он уменьшается на 42,99%. Заслуживает внимания Hgb показатель плотности гемоглобина в цельной крови. С возрастом лошади он достоверно и последовательно снижается, достигая минимальной величины у 30-летних лошадей. Hct у лошадей в возрасте 24 лет находится на нижней границе нормы – 41,32%. Но к 30 годам жизни он составляет 24,17%, что ниже нижнего референтного значения. Количество сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в крови старых лошадей с возрастом уменьшается, а моноцитов – увеличивается. К 30 годам жизни лошади отмечен значительный рост СОЭ: у 24-летних животных этот показатель находится на нижней границе референтного показателя, но к 30 года жизни он увеличивается в 1,89 раза, достигая 72 мм/час.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аак О.В. ... 89
Абакушина Е.В. ... 155, 156, 274
Абатурова С.Б. ... 44
Абдулкина Н.Г. ... 286
Абдуллаева Л.Х. ... 175
Абишева Н.Н. ... 10
Абрамова Т.В. ... 256
Абрамовских О.С. ... 177, 222, 229
Авдеева Ж.И. ... 157, 279
Авдонкина Н.А. ... 263
Аверьянов А.В. ... 183
Авруцкая В.В. ... 181, 184
Агафонова Е.В. ... 85
Агафонова О.А. ... 260
Агрба В.З. ... 37
Азаров И.И. ... 254
Азизов И.С. ... 145
Азизова З.Ш. ... 176, 248
Аклеев А.А. ... 282
Акунеева Т.В. ... 229
Алабедалькарим Н.М. ... 72
Александров А.В. ... 253
Александров Г.В. ... 271
Александрова Н.В. ... 253
Алехина И.Ю. ... 253
Алешина Г.М. ... 220
Алешкин А.В. ... 263
Алешкин В.А. ... 277
Алпатова Н.А. ... 77, 145
Альмухаметова О.Н. ... 245, 246
Альтман Д.Ш. ... 208
Аляхнович Н.С. ... 288
Амаба С.Т. ... 46
Амбросов И.В. ... 273
Амикишиева А.В. ... 53
Аминев Р.М. ... 254
Амичба А.А. ... 47
Аммур Ю.И. ... 67
Амстиславская Т.Г. ... 45
Андреев В.А. ... 254
Андреева А.А. ... 165
Андреева Е.А. ... 175
Андреева И.И. ... 97, 173
Андреева Л.А. ... 89
Андриевских И.А. ... 222
Андрюшин А.Е. ... 13
Аникеева О.С. ... 11
Аникина А.Н. ... 98
Антонов А.В. ... 164
Анциферова Ю.С. ... 175, 188
Апт А.С. ... 35, 55, 74, 81
Аракельян Р.С. ... 130
Арефьева А.С. ... 99
Арипова Т.У. ... 176, 237
Арискина О.Б. ... 233
Аронов Д.А. ... 11, 54, 275
Арсентьева Н.А. ... 104, 133, 146
Арсентьева Н.В. ... 273
Артамонов А.Ю. ... 49, 51
Артыкова М.А. ... 237
Асадчиков В.Е. ... 230
Асеева Е.В. ... 91, 100
Астахова Т.М. ... 72
Астраханцева И.В. ... 24
Атретханы К.-С. Н. ... 22
Афанасьева В.С. ... 128
Афанасьева О.И. ... 128
Афиногенова В.П. ... 220
Афонина И.А. ... 235, 278
Ахалова Е.А. ... 251
Ахмалтдинова Л.Л. ... 145
Ахматова Н.К. ... 60, 71
Бабаян А.А. ... 189
Бабушкина И.В. ... 108, 227
Багина У.С. ... 157
Баева Т.А. ... 12
Баженов А.И. ... 150
Баженов Д.О. ... 13, 49
Базарный В.В. ... 133
Базикян Э.А. ... 230
Баишева Г.М. ... 294
Байбарина Е.В. ... 127
Баймурзина Ю.Л. ... 179
Баландин С.В. ... 49
Балацкая Н.В. ... 13, 223, 225
Балдуева И.А. ... 263
Балыкина А.Б. ... 296, 297
Барабаш Л.В. ... 286
Баранов С.И. ... 277
Баранова О.П. ... 116
Барановская С.А. ... 14
Баранцевич Е.Р. ... 203
Барило А.А. ... 103
Баринова А.С. ... 251
Баркая В.С. ... 47
Барковская М.Ш. ... 103
Барышева О.Ю. ... 121
Басина В.В. ... 146
Батенева А.В. ... 266
Батов С.В. ... 168
Баторов Е.В. ... 78, 166
Батрак Н.В. ... 184
Батуашвили Т.А. ... 77
Батурина И.Л. ... 177
Бахта А.А. ... 295
Бахтин А.В. ... 160
Бацунов О.К. ... 104, 146, 231, 232
Бачурина А.С. ... 217
Бегишева Р.Р. ... 147
Бедулева Л.В. ... 57, 61
Белова С.В. ... 108, 227
Беловолова Р.А. ... 211
Белогородцев С.Н. ... 15, 38
Белоусова А.В. ... 46
Белохвостикова Т.С. ... 227
Белый Ю.Ф. ... 51
Бельтюков П.П. ... 203
Беляева Е.Н. ... 139
Беляева Л.В. ... 148
Белякова К.Л. ... 16, 258
Бенедицкая Е.В. ... 253
Бердичевская Е.М. ... 292
Бердюгина О.В. ... 139, 140
Березовская К.В. ... 250
Берлина М.А. ... 58
Берлов М.Н. ... 16, 65
Бизин И.В. ... 174
Бирко О.Н. ... 127
Бишева И.В. ... 134
Блинов А.Е. ... 111
Блинов Г.А. ... 111
Блинова Е.А. ... 103
Бляхер М.С. ... 36, 263
Бовин Н.В. ... 54
Богачев С.С. ... 166
Богданова К.В. ... 68
Богомолов А.Г. ... 103
Богомолов А.Н. ... 206
Богрянцева М.П. ... 266
Божок Г.А. ... 72
Бойко Н.В. ... 217, 218, 219
Бондарев В.П. ... 157, 268, 280
Бондарева Е.А. ... 262
Бондаренко С.К. ... 191
Борзова Н.Ю. ... 187
Борисевич И.В. ... 268, 270
Борисов А.Г. ... 158
Борисова О.В. ... 60
Бочкова М.С. ... 54
Братчиков О.И. ... 215
Бриллиант С.А. ... 17
Брындина И.Г. ... 66
Бугаева М.С. ... 76
Будкова А.И. ... 81, 105, 119
Бузмаков А.В. ... 230
Булавинцева Т.С. ... 18, 28

Буркин М.А. 259, 264
Бурмистрова А.Л. 80, 122, 238
Бурова Л.А. 23
Бутвиловская В.И. 99
Бухарина А.Ю. 70
Бушмина О.Н. 18
Быкадорова О.В. 31
Быкова В.В. 217
Быстров А.М. 222
Быстрова Н.А. 42, 182, 206, 210
Бычкова Н.В. 98, 239
Бычкова С.В. 193, 198
Бязрова М.Г. 19
Вавилов Н.В. 178, 254
Вайтина А.М. 39, 70
Валеева А.Р. 105
Валиева Ю.В. 41
Ванько Л.В. 189, 243
Вараксин В.В. 168
Варламова О.Н. 111
Вартанян Н.Л. 58
Василенко А.Г. 122
Василенко Е.А. 24
Василенко М.А. 106
Васильев А.А. 290
Васильев В.Б. 59
Васильев И.В. 144
Васильева Е.А. 107
Васильева Е.В. 151
Васильева О.А. 20
Васин И.А. 187
Васнева Ж.П. 148
Вафин И.А. 164
Вахова Е.С. 224
Велижинская Т.А. 85
Вербов В.Н. 151
Веретельник Е.Н. 294
Вержбицкая Н.Е. 164
Ветлугина Т.П. 265
Викулов Г.Х. 290
Вильданова О.Р. 75
Виноградов С.Ю. 53
Вирунен С.В. 298, 299
Вишневский А.Ю. 280
Вишневский Б.И. 139
Вишникина Е.Д. 168
Власенко А.Ю. 59
Власик Р.А. 149
Власова Н.В. 93
Волков А.В. 277
Волкова М.В. 266
Волкова Т.О. 157, 161
Волошин С.А. 99
Воробьев Е.А. 203
Ворожцова В.С. 70
Вороненко И.И. 211
Воронин Д.Н. 188, 194
Воронина Е.Н. 181
Воронова С.Н. 43
Воронцова И.М. 85
Воропай А.А. 118
Вторушина И.А. 260
Вторушина В.В. 179
Гаврилова М.В. 20, 72
Гаврилова Н.А. 276
Гаврилова С.И. 201
Гаврилова Т.В. 21
Гаврилюк В.П. 206, 212, 240, 248
Гаврилюк Е.В. 200
Гавриш С.А. 182
Газанова Н.Д. 169
Гайдуль К.В. 267
Гайсина А.Р. 179
Гайсина А.Ф. 179
Галагудин И.В. 27
Галимзянов Х.М. 130
Галимов Ш.Н. 179
Галимова Э.Ф. 179
Галкина Г.А. 118
Галлиулина О.А. 263
Гальвидис И.А. 86, 259
Гамалей С.Г. 266
Гамзаев М.Г. 224
Ганусов В.В. 142
Гапонов А.М. 58
Гармаев Д.Э. 267
Гарнюк В.В. 203
Гварамия И.А. 37
Гвоздев И.И. 127
Гейн С.В. 12, 21
Гейн О.Н. 21
Гельцер Б.И. 114
Генералов И.И. 266
Георгиев Г.П. 58
Герасимова Д.Г. 107, 244
Гервазиева В.Б. 116
Гизингер О.А. 128
Гладкова Е.В. 108, 227
Гладкова С.Е. 260
Глебездина Н.С. 180
Глушков А.Н. 164, 183
Глявина М.М. 76
Гнучев Н.В. 58
Гоголева В.С. 22, 29
Годовалов А.П. 31, 178
Голенков А.К. 67
Голицына А.А. 109
Головачёва Е.Г. 128
Головин А.С. 23
Головин И.Ю. 228
Головинская О.В. 273
Голубева Е.Л. 195
Гольдин Б.Г. 149
Гольдина И.А. 149, 267
Гончаров А.Г. 169
Гончарова З.А. 110, 111
Горбунов Н.П. 59
Гордеева Л.А. 181
Гордова В.С. 23
Горелова Л.А. 142
Горенчук А.Н. 254
Горностаев Н.Г. 44
Горохова Л.Г. 76
Горшкова Е.А. 24
Горшкова Е.Н. 24
Гребеняк О.А. 186
Григорьева Е.А. 23, 51
Григорян М.С 98
Григорянц А.А. 118, 184
Гриценко В.А. 32, 33
Гронская А.С. 73
Грудинина Н.А. 59
Грязева И.В. 58
Губернаторова Е.О. 25
Гукасян Е.Л. 217
Гулам М.Р. 168
Гуляев Н.И. 200
Гурина О.П. 111
Гурьянова С.В. 73, 87
Гусев Е.Ю. 113, 129
Гусева В.И. 80
Гусева М.Н. 174
Гусева О.Е. 26, 100, 240
Давыдова Г.А. 225
Давыдова Е.В. 208
Давыдова М.Н. 202
Даниленко Е.Д. 266
Даниленко В.Н. 50
Данилова И.Г. 18
Даровских С.Н. 75
Деев И.А. 171
Дементьева Е.А. 111
Демьяненко И.А. 34
Демьянова В.Т. 163
Денисова Е.В. 223
Дешева Ю.А. 135
Джалилова Д.Ш. 40
Джаримок А.Р. 212
Джумаева Д.Н. 237, 248
Дидковский Н.А. 201
Добронравов В.А. 214
Добрынина М.А. 32, 33
Догонадзе М.З. 139
Долгарева С.А. 18
Долгова Е.В. 166
Долгушин И.И. 27, 229, 282
Долгушина А.И. 205
Дробышевская В.Г. 171

Дружинина Ю.Г. ... 212
Друцкая М.С. ... 22, 25, 29
Дубов В.С. ... 234
Дугучиев И.Б. ... 299
Дударев И.В. ... 111, 241
Дударева М.В. ... 181, 241
Дукардт В.В. ... 32, 33
Дунец Н.А. ... 54
Дуросова П.А. ... 112
Дутова С.В. ... 268
Душкин А.В. ... 267
Дьякова М.Е. ... 141, 144
Дятлов Д.А. ... 95
Евдокимов А.В. ... 80
Евдокимова Н.Р. ... 50
Евсеева Г.П. ... 241, 242
Евсеева Н.А. ... 285
Евстифеев В.В. ... 27
Елкина С.И. ... 14, 78
Емельянов В.В. ... 28
Емельянов И.В. ... 177
Емельянов Н.Н. ... 253
Емельянова Н.В. ... 263
Емельянова Н.П. ... 226
Емельянова О.И. ... 253
Емельянова Э.Б. ... 186
Енукашвили А.И. ... 296, 297
Епанешникова В.Б. ... 82
Еремеев В.В. ... 27
Ермакова К.Д. ... 24
Ермин К.В. ... 76
Ермоленко Е.И. ... 28, 50
Еромолаева С.А. ... 58
Ерохина С.А. ... 29, 62
Ерохов П.А. ... 44, 72
Ершова А.В. ... 139, 140
Ерыгина Е.Н. ... 112
Есимова И.Е. ... 143
Ефименко М.В. ... 241, 242
Ефимов Г.А. ... 24
Ефременков А.М. ... 240, 248
Ешимбетова Г.З. ... 182, 176
Жанарстанова Г.А. ... 152
Жданов К.В. ... 152
Жданова А.С. ... 29
Жданова О.Л. ... 216
Жестков А.В. ... 294
Жиляева М.В. ... 280
Жоголев К.Д. ... 254
Жоголев Д.К. ... 254
Жоголев С.Д. ... 254
Жук И.Е. ... 271
Жукова А.Г. ... 76
Жукова А.С. ... 243
Жулай Г.А. ... 121, 159
Журавлева Ю.А. ... 113, 214
Журкин М.А. ... 254
Жученко М. ... 76
Зайцев О.Н. ... 282
Зайцева И.П. ... 282
Зайцева Н.С. ... 283
Закиров Р.Ш. ... 107, 120, 244, 255
Залялиева М.В. ... 147
Замолодчикова Т.С. ... 30
Заморина С.А. ... 54
Замяткина О.В. ... 200
Зарубаев В.В. ... 273
Затолокин П.А. ... 106
Захарова Л.А. ... 284
Захарова Н.Б. ... 212
Захарова П.В. ... 143
Зварцев Р.В. ... 29
Зверев В.В. ... 67
Здор В.В. ... 114
Зеленевский Н.В. ... 298, 299
Зеленова З.В. ... 287
Зенков А.Л. ... 31
Зиганшин О.Р. ... 128
Зима А.П. ... 20
Зимина Е.М. ... 35
Златник Е.Ю. ... 31, 160
Золотарева Е.И. ... 31
Зонова Е.В. ... 124
Зорина Н.А. ... 163
Зотова А. ... 32
Зотова М.А. ... 177
Зотова Н.В. ... 129
Зубков А.В. ... 92
Зубков Д.А. ... 273
Зубрий О.Н. ... 139
Зуева Е.Б. ... 32, 33
Зуева М.М. ... 277
Зульбалаева Д.Ф. ... 191
Зурочка А.В. ... 32, 33
Зурочка В.А. ... 33
Зыблев С.Л. ... 213
Зыблева С.В. ... 213
Зыкова Т.А. ... 130, 137
Иванец Т.Ю. ... 189
Иванникова Л.П. ... 165
Иванов А.М. ... 152, 165, 200
Иванов В.Б. ... 268
Иванова И.П. ... 115
Иванова О.Н. ... 244
Иванова О.С. ... 266
Ившина И.Б. ... 40
Игнатова И.Е. ... 37
Игнатьев К.С. ... 157
Ильин М.В. ... 112
Ильина А.Я. ... 251
Илькович М.М. ... 116
Ильницкая С.И. ... 53
Имянитов Е.Н. ... 174
Ирина М.П. ... 57
Исаев П.Ю. ... 87
Исанбаева Л.М. ... 160
Истомина Е.В. ... 141
Ищенко А.М. ... 269
Кабина Н.А. ... 235
Кавеленова Л.М. ... 93
Кажарова С.В. ... 270
Казаков С.П. ... 162
Казицкая А.С. ... 76
Кайгородова Е.В. ... 165
Каландарова А.Н. ... 187
Каледин В.И. ... 53
Калинин Р.С. ... 271
Калинина Е.А. ... 189
Калинина Н.М. ... 98, 239
Калиниченко Е.О. ... 60
Калиновская Н.Ю. ... 126
Калиновский А.В. ... 166
Калмыкова Н.В. ... 34
Калошин А.А. ... 35, 60
Камалов З.С. ... 197
Каменских Н.А. ... 164
Каневский Л.М. ... 29, 62
Капина М.А. ... 35, 55, 81
Капитанова К.С. ... 255
Капкаева Р.Х. ... 257, 258
Каприн А.Д. ... 155, 156
Капустин И.В. ... 36, 136
Карал-оглы Д.Д. ... 37
Карасев М.М. ... 271
Каратаев Г.И. ... 47
Караулов А.В. ... 48, 210
Карпенко Л.Ю. ... 295, 296, 297
Карпенко С.Ф. ... 130
Карпова М.Р. ... 268
Карпова Я.Д. ... 72
Карякина Е.В. ... 108
Касимова Г.С. ... 68
Катаргина Л.А. ... 223
Кащенко Э.А. ... 15, 38, 169
Кеберле С.П. ... 292
Кибардин А.В. ... 58, 274
Ким А.С. ... 217, 218
Кириенкова Е.В. ... 106
Кирилина Е.А. ... 21
Кирсанов А.Н. ... 188, 194
Кирюхина Л.Д. ... 144
Киселева Е.П. ... 56, 59
Киселева Т.Н. ... 13
Киселевский М.В. ... 157
Клецко Л.И. ... 254
Климкина Т.Н. ... 245
Климко Н.Н. ... 89
Климов А.В. ... 171

Климов В.В. 87, 171
Климович В.Б. 58
Клинушкина Е.Ф. 67
Кляусов А.С. 88
Кнауэр Н.Ю. 103
Кныш С.В. 127, 132
Княжева М.А 45
Ковалева Л.А. 224
Ковалева С.В. 247
Коваленко Е.И. 29, 62
Ковчур П.И. 161
Кожевников Ю.А. 277
Козаченко Н.В. 145
Козлов В.А. 103
Козлов В.В. 51
Козлов И.Г. 156, 230
Козлов К.В. 152
Козлова Е.С. 287
Козлова О.С. 91, 100
Козлова Я.И. 89
Козловская Г.В. 38
Козловский Ю.Е. 38
Кокряков В.Н. 16, 65, 220
Коленчукова О.А. 131, 284
Колесников О.Л. 27
Колмакова Т.С. 218
Колобов А.А. 271
Колобовникова Ю.В. 143
Колпаков С.А. 137
Колупаев В.А. 285
Колыхалов И.В. 201
Комарова Л.В. 72
Комбарова С.Ю. 136
Кондаков С.Э. 250, 289
Конджария И.Г. 47
Кондратьева Е.В. 271
Кондрашова Е.А. 196
Конеева Ц.О. 43, 44
Коненкова Л.П. 117
Конищева А.Ю. 116
Кононова Т.Е. 143
Коноплева М.В. 36, 150
Конопля А.А. 182
Конопля А.И. 42, 200, 210, 212, 215, 240, 248
Конопля Н.А. 42
Конорюкова А.А. 68
Копейкин П.М. 49
Коренчук Ю.В. 39
Кормщикова Е.С. 255
Корнилова О.Г. 270, 271
Коровкина Е.С. 270
Коротенко О.Ю. 285
Коршунова Е.Ю. 227
Космиади Г.А. 142
Костевич В.А. 59
Костин С.В. 248
Костинов М.П 71, 220, 270
Костоломова Е.Г. 229
Косырева А.М. 38, 40
Косякова Н.И. 89, 96
Котелева С.В. 136
Котелева С.И. 36
Котов С.С. 254
Котылева М.П. 28
Кох Е.В. 177
Коханов А.В. 230
Кочина О.А. 40
Краббе Н.В. 135
Кравченко П.Н. 159
Крамская Т.А. 28
Красильникова А.К. 175
Красильникова К.С. 183
Краснопольская Л.М. 263
Краснопрошина Л.И. 134
Кремено С.В. 286
Кречетова Л.В. 179, 195
Криволапова И.М. 287
Кривцова Ю.Н. 98
Кривых М.А. 271
Кричевская Г.И. 224
Кролевец Д.И. 173
Кротова В.А. 260
Крошкина Н.В. 184
Круглова Н.А. 66
Крукиер И.И. 118, 184
Крутецкая И.Ю. 58
Крылова А.А. 58
Крылова Н.В. 272
Крынский С.А. 201
Крячко О.В. 297, 298
Ксанаев И.И. 209
Кубанов А.А. 256
Кувшинова И.Н. 260
Кудашева Е.Л. 168
Кудашева Э.Ю. 255, 268
Кудлинг Т.В. 271
Кудрявцев И.В. 28, 49, 56, 105, 116, 151, 158
Кудряшова А.В. 185, 190
Кузина М.А. 68
Кузнецов А.А. 222
Кузнецов С.А. 130
Кузнецова А.С. 205
Кузнецова М.С. 26
Кузнецова Р.Н 172, 173, 231, 232
Кузубова Н.А. 63
Кузьмина Н.С. 92
Кукина О.М. 71
Куклина Е.М. 41, 180
Кукушкина Е.А. 263
Култаева Р.Ш. 182
Куляшова Л.Б. 28
Кундер Е.В. 266
Купчина Е.А. 226
Курбатова О.В. 107, 120, 244
Курилин В.В. 68
Курмышкина О.В. 161
Курников Г.Ю. 118
Курочкина Ю.Д. 117, 153
Кучинская М.М. 135
Куюкина М.С. 40
Кхедри Ф. 118
Лабис В.В. 230
Лавренова Н.С. 28
Лаврентьева И.Н. 273
Лагутина Л.В. 64
Лазарева А.М. 90
Лазарева Н.М. 116
Ланда С.Б. 141
Лапин С.В. 80, 214, 262
Лапштаева А.В. 186
Ларин С.С. 58
Лебедева Е.С. 63
Лебедько О.А. 26, 240
Левагина Г.М. 266
Левкова Е.А. 186
Левкович М.А. 118, 184
Легач Е.И. 72
Леонова Г.Н. 272
Леонтьева Г.Ф. 28
Леплина О.Ю. 153, 166
Лернер А.А. 135
Лесниченко Д.А. 91
Лисицына Т.А. 225
Литвинова Е.С. 18, 42
Литвинова Л.С. 42, 54, 106, 124
Литвинюк А.А. 61
Лифанцева Н.В. 43, 44
Лобачева О.А. 265
Логинов П.А. 76
Логинова Ю.В. 177
Логунова Н.Н. 35, 55, 74, 81
Локтионов А.Л. 18, 48
Локтионова А.В. 18
Ломтатидзе Л.В. 247
Лопатина Т.К. 36
Лопатухина Е. 32
Лукина С.А. 63, 207
Лушова А.А. 19
Лыгина Ю.А. 94
Лысенко И.Б. 130
Лысикова С.Л. 273
Лысюк Е.Ю. 58, 274
Любимова Н.Е. 104, 133, 151, 171
Людыно В.И. 56
Люпина Ю.В. 44, 72
Лядова И.А. 47

Лядова И.В. 142
Лях Р.В. 212
Мавзютов А.Р. 132
Маврин М.Ю. 212, 215
Маврина Л.В. 211
Мазинг А.В. 80, 105
Мазоха К.С. 91, 100
Мазурина С.А. 92
Мазуров Д. 32
Мазуров Д.В. 66
Майер Д.А. 214
Майоров К.Б. 35, 55, 74
Макарова О.В. 40
Максимов Г.В. 151
Максютов А.З. 68
Малахова Е.А. 200, 206
Малашенкова И.К. 201
Малинина И.П. 124
Малкова А.М. 81, 119
Малышев М.Е. 233
Малышкина А.И. 175, 188
Мальцев В.Н. 215
Мальцев Н.А. 178
Мамонова И.А. 227
Мандра Ю.В. 133
Манжос М.В. 93, 100
Маничева О.А. 139
Маркелова Е.В. 114, 202, 216
Маркова Е.В. 11, 45, 99
Мартыненко И.Г. 136
Мартынов А.И. 102, 287
Мартынов Б.В. 165
Марусенко И.М. 121
Марченко А.К. 260
Маслянский А.Л. 80, 105
Масяго Л.Н. 260
Матвеева Л.В. 257, 258
Матвеевская Н.С. 277
Матуа А.З. 46, 47
Махарова М.А. 172
Мацко Е.Ф. 288
Медведев А.И. 278
Медведева Н.Н. 284
Медведева С.Ю. 46
Медикова Л.Д. 266
Медкова А.Ю. 47
Медуницын Н.В. 145, 275, 279
Мелащенко Е.С. 42
Меледина И.В. 152
Мельников И.Ю. 285
Мельникова В.И. 43, 44
Меньшиков И.В. 39, 57
Меняева Е.В. 152
Меркулов В.А. 157, 275
Меркушкина Т.А. 147
Мешкова М.Е. 200, 206
Мешкова Т.Д. 66
Микаелян П.К. 48
Миквабиа З.Я. 47
Милехина С.А. 245
Милованова О.В. 110, 111
Минаева Н.В. 163
Мирошкина Л.В. 120
Мирсаяпова И.А. 132
Мирютова Н.Ф. 286
Мирославский О.В. 102
Михайлов В.С. 44
Михайлова В.А. 49, 69, 258
Михайлова Н.А. 35, 60
Михайлова Н.Н. 76
Михин В.П. 200
Мишарина Л.В. 187
Мишинов С.В. 166
Мищенко А.Л. 251
Мовсесянц А.А. 270, 273
Модестов А.А. 158
Моисеева Е.В. 11, 54, 275
Моисеева Т.В. 93
Молова Л.Б. 137
Морозов С.А. 202
Морозова О.Н. 196
Моруга Р.А. 162
Мосина Л.М. 257, 258
Москалев А.В. 162
Мосягин В.Д. 268
Мошев А.В. 158
Мужецкая Т.О. 214
Музафарова С.А. 197
Муравейник О.А. 250, 289
Мурашкин Н.Н. 107
Мурашов Э.Г. 93
Мусаходжаева Д.А. 160, 176, 187, 237
Мухаметзянова Е.И. 37
Мухина И.В. 76, 107
Мухтеремова Г.А. 102
Мяснянкин А.А. 230
Мячикова В.Ю. 80
Наговицына Е.Б. 196
Нагорный С.Н. 188
Назаренко М.М. 141
Назаренко П.М. 48
Назаров А.С. 49
Назаров В.Д. 214
Назарова Е.Л. 163
Невежкина Т.А. 127, 132
Невидимова Т.И. 265
Невская Л.В. 145
Недоспасов С.А. 22, 24, 25, 29
Нежинская Г.И. 50
Некрасова И.В. 41, 180
Непомнящая Е.М. 164
Неприна Г.С. 155
Нерсесян С.Л. 181
Нестеренко В.Г. 36
Нестерова И.В. 247
Нехаева Т.Л. 263
Никашина А.А. 184
Никипелова Е.А. 164
Никитин В.Ю. 152, 165
Никитин О.А. 168
Никитин О.Л. 294
Никитин Ю.В. 152
Никитина А.А. 21
Никитина В.Б. 265
Никитина И.Ю. 142
Никитюк Н.Ф. 276
Никифоров В.С. 95
Николаев А.А. 191
Николаева М.А. 189, 195
Николаева Т.Н. 51
Николин В.П. 53
Никонова М.Ф. 290
Никонова Т.И. 177
Никушкина К.В. 177
Нимирицкий П.П. 271
Ница Н.А. 277
Новик А.В. 263
Новиков В.В. 118
Новиков П.С. 250, 289
Новикова Е.В. 280
Новикова И.А. 31, 160
Новикова Л.В. 186
Новикова Л.И. 277
Новицкий В.В. 20
Новоженина В.С. 177
Норка А.О. 231
Носенко М.А. 22
Нуриев Р.И. 259
Обухов Ю.И. 276
Овечко Н.Н. 78
Овсянникова Л.Ф. 211
Овчинников Д.А. 203
Овчинникова Т.В. 49, 65
Огурцов Д.П. 201
Олейник В.М. 121, 159
Олейник Е.А. 117, 153
Олейник Е.К. 121, 159
Оленникова Р.В. 181
Олефир Ю.В. 268, 270, 275
Олина А.А. 180
Омельянюк М.Ю. 222
Орадовская И.В. 290
Орлов Д.С. 49, 51
Осидак Л.В. 128
Осиков М.В. 245, 246
Осипов С.А. 88
Осипова И.В. 233
Оскорбина О.С. 181

Оспельникова Т.П. 116
Останин А.А. 117, 153, 277
Останкова Ю.В. 149, 154, 172, 260
Офицеров В.И. 212
Павлушкина Л.В. 99
Падерина Л.А. 61, 123
Пазина Т.Ю..... 51
Пазынина Г.В..... 54
Панев Н.И. 285, 291
Панев Р.Н..... 285
Панкратова Е.В. 89
Панова И.А. 185, 190
Панова Н.А. 52
Пантелеев А.В. 142
Панурина Р.Л. 277
Панфилов А.Б. 298
Парамонов И.В. 163, 255
Параскун А.А. 53
Парейшвили В.В. 190
Пасман Н.М. 175
Пасова И.А. 155, 156
Патышева М.Р. 165
Пашнина И.А. 119, 287
Перова М.В..... 232
Перова Т.Л. 141, 144
Персова Е.А. 108
Пескарёв В.Е. 277
Петричук С.В.....107, 120, 244
Петров А.А..... 226
Петров А.В..... 271
Петрова Е.О. 122
Петрова О.А. 133
Петровская М.С. 223
Пивкина Т.В. 100
Пивоварова Л.П. 233
Пиневич А.А. 58
Пипиа Н.П..... 263
Пичугов С.М. 27
Плосконос М.В. 190, 191
Побединская О.С. 251
Поленок Е.Г. 164
Полтарейко Д.С..... 200
Полушина Л.Г. 133
Понасенко А.В. 83
Пономарева Е.В. 201
Пономаренко Е.А. 38
Попкова А.С. 121
Попова Н.А. 53
Попова Н.Д..... 277
Порываева В.А..... 260
Посвятенко А.В. 58, 274
Постнова Е.Л. 77
Правдин Е.В. 192
Прилипов А.Г..... 19
Прилуцкая И.А. 204
Прилуцкий А.С. 83, 94
Продеус А.П. 95
Пронин А.В. 51
Проскурякова А.С. 166
Протасов Е.А. 271
Прохоренко И.Р..... 96
Прохоренко С.В. 89
Прохоренко Т.С. 20
Прусаков А.В. 298, 299
Пустыгина А.В..... 198
Путков С.Б..... 162
Пушкарев В.П. 95
Пушкарева Ю.Э. 95
Пушкарь В.А..... 186
Пьянкова З.А. 46
Пятин В.Ф. 294
Радаева О.А. 186, 204
Радзюкевич Я.В. 96
Радыгина Т.В. 107, 120, 244
Раев М.Б. 54
Разуваева Я.Г. 267
Рамазанова З.К. 136, 263
Рапопорт Е.М. 54
Резапов Б.Р. 250, 289
Резников Ю.П. 99
Ремизова И.И. 193, 198
Родкина Г.Н. 162
Розенштейин М.Ю. 250, 289
Розенштейн А.З. 250, 289
Рокотянская Е.А. 185, 190
Романов А.А. 159
Романов В.А. 112, 282
Романова Н.В. 112
Романова О.В. 298
Романчук А.Л. 234
Ронь Г.И. 278
Рубакова Э.И. 35, 55, 81
Рубина А.Ю. 99
Рубова С.Р. 254
Рубцов Н.Б. 103
Рудой А.С..... 162
Рукавишников М.Ю. 260
Румпель О.А. 285
Рунова О.Б. 280
Рутто К.В. 56
Рыбникова Е.А. 95, 102
Рыжавский Б.Я..... 26
Рылов А.В. 255
Рядинская Л.А. 164
Савенкова Н.Д. 98
Савин С.З. 186
Савин Т.В..... 173
Савицкая Е.А..... 241
Савкин И.В..... 45
Савочкина А.Ю. 205, 229
Савченко А.А..... 158
Садыкова Г.К. 19
Сазонова О.В. 124
Самойлович М.П. 58
Самохина И.В.....107, 120, 244
Санникова О.Ю..... 196
Сапожникова Н.В. 139
Саранчина Ю.В. 292
Саркисян Н.Г..... 278
Сарматова Н.И. 131
Сафронова И.В..... 267
Сахаров П.А. 89
Сашенков С.Л. 285
Саяпина Л.В. 276
Сбойчаков В.Б..... 254
Светлакова Е.А. 133
Свирщевская Е.В. 30
Свистунова Е.А. 213
Свитич О.А. 67
Селедцов В.И..... 169
Селедцова Г.В. 15, 38, 169
Селезнева Н.Д. 201
Сельков С.А. ... 13, 16, 49, 69, 198, 258, 262
Семакова П.Н..... 121
Семенов А.В. 104, 146, 149, 151, 154, 171, 172, 260, 273
Семенова М.А..... 56
Семенова Н.И. 97
Семин Е.Г. 47
Семушина С.Г..... 275
Сенников С.В. 68
Сенькина Е.И. 206
Сергеев В.Г..... 56
Сергеев С.В. 73, 293
Сергеева В.Е. 23
Сердюк Л.И. 145
Серебряков А.А. 230
Серебрякова М.К. 105, 116, 151
Серов Д.А..... 96
Серова Т.А..... 134
Сесь Т.П. 116
Сибгатуллина Н.А. 92
Сидоров А.Ю. 57, 123
Сидорова Л.П. 28
Сизиков А.Э. 103, 117
Сизова С.В..... 230
Сизякина Л.П. ... 97, 101, 125, 173, 241, 283
Силаев А.А. 202, 208
Силаенкова М.М. 38
Симакова Н.Ю. 98
Симбирцев А.С.....204, 219, 271
Симутенко Л.В. 77
Синельникова Н.А. 98, 239
Синчугова Т.В. 277
Синяшина Л.Н. 47
Скарнович М.О. 266
Скирда Т.А. 136
Скирневская А.В. 250, 289

Скопичев В.Г. 52
Скоробогатова О.В. 287
Скороходкина О.В. 105
Скуратовская Д.А. 106
Слепова О.С. 224
Слонимская Е.М. 165
Слонова Д.А. 58
Смерчинская Т.В. 247
Смиренина И.В. 186
Смирнов И.В. 58
Смирнов К.А. 214
Смирнова М.Н. 104
Смирнова С.В. 90, 103
Смолдовская О.В. 99
Смолина Т.П. 272
Смолоногина Т.А. 135
Смольникова В.Ю. 189
Смольникова М.В. 82, 103
Смородченко А.Т. 23
Смык А.В. 99
Снегирева Н.А. 20, 72
Снигирев А.Я 61, 70
Снимщикова И.А. 235, 278
Соколенко А.П. 174
Соколов А.В. 23, 59
Соколов Д.И. 13, 16, 49, 69, 198, 258
Соколова М.В. 150
Солдатенкова А.В. 35, 60
Солдатов А.А. 157, 279
Соловьева И.В. 251
Соловьева Л.Н. 262
Соловьева Н.С. 139
Соломатина Л.В. 214
Сорожкина Е.С. 224, 225
Сотникова Н.Ю. 194
Стагниева И.В. 217, 218, 219
Становова М.В. 44
Старикова Э.А. 23, 59, 61
Старостина Н.М. 152, 153, 202, 277
Старшинова А.А. 139, 141
Стахеева М.Н. 165
Сташкевич Д.С. 122
Степанова Е.О. 189, 195
Стефанов В.Е. 271
Столбовая А.Ю. 58
Столов С.В. 93
Столпникова В.Н. 71
Столярова Е.Ю. 61, 123
Стоянов А.С. 289
Стоянова Н.А. 133
Стрелин С.А. 229
Стрельцова М.А. 29, 62
Ступак В.В. 166
Суворов А.Н. 28, 50
Сулина Н.Ю. 217
Сулутьян А.Э. 117
Сумеркина В.А. 205
Суняйкина О.А. 206
Супрун Е.Н. 100
Супрун С.В. 100, 196
Сурков А.Н. 244
Суркова Е.А. 63
Суслов А.П. 34, 36, 150
Суслова Т.А. 122
Суспицын Е.Н. 174
Сухина И.А. 152, 165
Сухобаевская Л.П. 273
Суховей Ю.Г. 229
Сходова С.А 71
Сысолятина Е.В. 58
Сычев И.А. 135
Тамбовцева А.А. 73, 292
Тарабановская Н.А. 165
Тарасов О.Н. 48
Татаринова Н.К. 281
Терентьев А.С. 57
Терехов И.В. 261
Терещенко С.Ю. 82
Тетруашвили Н.К. 179, 195
Тимганова В.П. 54
Тимофеева А.В. 238
Тимофеева Л.А. 243
Тимофеева М.Р. 63
Тихонова М.А. 45, 117, 175
Тишко В.В. 206
Ткаченко К.Е. 83
Ткаченко О.Ю. 262
Ткаченко Т.Н. 260
Тодосенко Н.М. 124
Токаревич Н.К. 133
Токарская М.М. 14, 78
Толпыго С.М. 30, 64
Тоначева О.Г. 158
Топол И.А. 65
Топтыгина А.П. 255
Торопова Л.Р. 229
Тотолян Арег А. 93, 104, 105, 133, 146, 151, 154, 171, 214, 232, 260
Травников О.Ю. 179
Трапш Х.З. 46
Триандофилиди Е.И. 160
Трифонова Е.П. 124
Тришина И.Н. 105
Тронина Т.И. 39
Трофимец Е.И. 295
Трофимов В.В. 248
Трушникова Р.В. 207
Тузанкина И.А. 196, 278
Тулупова М.С. 216
Тульская Е.А. 36, 263
Туманов А.В. 25
Тур Е.В. 222
Турмова Е.П. 208
Турова А.В. 194
Тыринова Т.В. 117, 166
Тырнова Е.В. 220
Тюменцева Н.В. 70
Тютина А.А. 39
Тюхтина З.П. 145
Тяпаева Я.В. 32, 33
Удальцов О.Е. 254
Ульянова Е.П. 164
Умнякова Е.С. 16, 65
Унгер И.Г. 229
Уразова О.И. 143
Уракова М.А. 66
Устинникова О.Б. 280
Устинова М.А. 136
Устиченко В.Д. 72
Устьянцева Л.С. 193, 250
Учеваткина А.Е. 89
Файзуллаева Н.Я. 248, 249
Федоров И.А. 246
Федорова И.М. 136, 263
Федорова Я.Б. 201
Федоскова Т.Г. 95, 102, 287
Федулова Э.Н. 107
Фейзханова Г.У. 99
Фельдшерова А.А. 150
Феоктистов В.В. 290
Феофанова Т.В. 134, 287
Филатенкова Т.А. 49, 51
Филатов А.В. 66
Филатов М.В. 141
Филатова М.С. 208
Филимонов П.Н. 152
Филимонов С.Н. 285
Филина А.Б. 67
Филиппова Л.В. 89, 168
Филиппова Ю.Ю. 238
Фисенко В.Г. 208
Фомина К.В. 68
Фомина О.И. 208
Фомина С.Г. 118
Фошина Е.П. 134, 220
Фрейдлин Е.В. 244
Фрейдлин И.С. 23
Фролов М.Л. 10
Фролова Е.В. 89
Хабибулина Л.Р. 91, 93, 100
Хазиахматова О.Г. 42, 54, 124
Хайбуллина З.Г. 179
Хайдарова Ф.А. 167, 197
Хайдуков С.В. 54, 230
Хайлов Н.А. 201
Хайруллина Р.М. 132
Халилов М.А. 235
Хаматдинова З.Р. 132

Хамизова М.М. ... 209
Хантакова Ю.Н. ... 68
Хараева З.Ф. ... 137, 209
Харитонов М.А. ... 254
Харитонова М.В. ... 125
Харламова Т.С. ... 251
Харченко А.В. ... 42
Хац Ю.С. ... 34
Хегай Т.Р. ... 249
Хлусов И.А. ... 42
Хобракова В.Б. ... 267, 281
Ходжаева Н.В. ... 167
Хоконова Т.М. ... 209
Холименко И.М. ... 215
Холодок Г.Н. ... 241, 242
Хонина Н.А. ... 175
Хоробрых М.Н. ... 163
Хохлова А.С. ... 226
Хохлова Е.В. ... 49, 69
Храмова Т.В. ... 70, 168
Храмцов П.В. ... 54
Храмцова Ю.С. ... 70
Хромова Е.А. ... 71
Царева Е.Е. ... 108
Цейтлер Т.А. ... 28
Целоева Х.И. ... 251
Цепокина А.В. ... 83
Цимбалова Е.Г. ... 120
Цыганкова С.В. ... 54
Цыганов Е.Н. ... 47
Чагина Е.А. ... 109, 132, 234
Чалый И.А. ... 10, 123
Чаша Т.В. ... 194
Чемодакова К.А. ... 165
Чепанов С.В. ... 198, 262
Чепурнова Н.С. ... 127, 216
Червинская А.В. ... 298
Чердынцева Н.В. ... 165
Черевко Н.А. ... 250, 289
Черешнев В.А. ... 21, 28
Черешнева М.В. ... 21
Чериков В.С. ... 53
Чернов С.В. ... 166
Чернохаева И.В. ... 141
Черных Е.Р. ... 202, 152, 166
Чернышова И.Н. ... 20, 72
Честнихина А.Д. ... 235, 278
Четвернина Е.А. ... 229
Чигаева Е.В. ... 234
Чиненова Л.В. ... 239
Чистякова Г.Н. ... 193, 198
Чудилова Г.А. ... 247
Чудин А.В. ... 13
Чумасова О.А. ... 117, 277
Чупахин О.Н. ... 28
Чурина Е.Г. ... 143
Чурина М.А. ... 172
Чуров А.В. ... 121, 159
Чурюкина Э.В. ... 101
Шабалдин А.В. ... 83
Шабалдина Е.В. ... 83
Шабанов Д.В. ... 95, 102
Шабанов П.Г. ... 50
Шабашова Н.В. ... 168
Шайдулина Р.Р. ... 39
Шамова К.П. ... 193, 250
Шамова О.В. ... 49, 51
Шапошников А.В. ... 137, 164
Шаравьева И.Л. ... 21
Шардаков В.И. ... 163
Шаркеев Ю.П. ... 42
Шарова В.Г. ... 200
Шарова Н.П. ... 44, 72
Шатохин М.Н. ... 212, 215
Шатунов А.А. ... 200
Шашкова О.А. ... 58
Швыдченко И.Н. ... 73, 292, 293
Шевела Е.Я. ... 78, 152, 202, 277
Шевелева А.Р. ... 16, 258
Шевцов М.А. ... 269
Шевцова З.В. ... 46, 47
Шевякова Е.А. ... 130, 137
Шеметова М.А. ... 128
Шепелькова Г.С. ... 27, 74
Шилов Е.С. ... 24
Шилов Ю.И. ... 31, 254
Шилова Л.Н. ... 253
Шипунов М.В. ... 152
Ширина И.В. ... 152
Ширинский В.С. ... 126
Ширинский И.В. ... 126
Ширманова М.В. ... 24
Широлапов И.В. ... 294
Шитикова М.Г. ... 213
Шишкина Л.Н. ... 266
Шишков А.А. ... 115, 169
Шишкова Ю.С. ... 27, 75
Шкорик Е.В. ... 202
Шляхтенко Т.Н. ... 198
Шмонин А.А. ... 262
Шморгун Т.В. ... 251
Шнайдер М.А. ... 126
Шоазизов Н.Н. ... 237
Шойбонов Б.Б. ... 64
Шохина М.Д. ... 235, 278
Штоббе А.А. ... 202
Штойко М.А. ... 53
Шуленина Е.А. ... 274
Шульгина О.Г. ... 31, 160
Шульгинова А.А. ... 206, 210
Шумилов П.В. ... 251
Шуплецова В.В. ... 42
Щеголева Л.В. ... 161
Щекина Е.Г. ... 269
Щелчкова Н.А. ... 76
Щипакин М.В. ... 298, 299
Эсауленко Е.В. ... 146
Эсмедляева Д.С ... 141, 144
Югай Ю.В. ... 109
Южакова Д.В. ... 24
Юрова К.А. ... 42, 54, 124
Юшков Б.Г. ... 17, 70
Яблонский П.К. ... 141
Ядыкина Т.К. ... 76
Яковлев А.К. ... 77
Янковская А.А. ... 78
Янов Ю.К. ... 220
Яременко М.В. ... 152
Яровинский Б.Г. ... 95
Ястребова Н.Е. ... 78

ОПТИМАЛЬНЫЙ ВЫБОР ПРИ ТЕРАПИИ ВНУТРИВЕННЫМИ ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ

Гамунекс®-С

иммуноглобулин человека нормальный 100 мг/мл

- В 2 раза меньшая нагрузка объемом по сравнению с 5%-ми внутривенными иммуноглобулинами за счет высокой концентрации препарата [1]
- Оптимальные характеристики препарата для безопасного лечения пациентов с сопутствующими заболеваниями [1,2]
- Значительное снижение частоты возникновения инфекций у пациентов с первичными иммунодефицитами [3]
- Быстрое повышение и длительное сохранение в пределах нормы уровня тромбоцитов у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой [4]
- Выраженный и длительный клинический эффект при терапии хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии [5]

Краткая инструкция по препарату Гамунекс®-С
(Иммуноглобулин человека нормальный, очищенный хроматографически)

Лекарственная форма и состав: раствор для инфузий, 10%. В 1 мл содержится: иммуноглобулин человека нормальный (100 мг), глицин (15 мг), вода для инъекций (до 1 мл). **Показания к применению:** Первичный гуморальный иммунодефицит (врожденная агаммаглобулинемия, общий вариабельный иммунодефицит, иммунодефицит с гиперпродукцией Ig M, связанный с Х-хромосомой, синдром Вискотта - Олдрича, тяжелые комбинированные иммунодефициты); Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура; Хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия. **Противопоказания:** Анафилактические или тяжелые системные реакции на введение иммуноглобулина человека. Больные с тяжелым селективным дефицитом IgA (сывороточный IgA<0,05 г/л) при наличии антител к иммуноглобулину А, могут получать Гамунекс®-С с исключительными мерами предосторожности. **Меры предосторожности:** Имеются данные о том, что внутривенное введение иммуноглобулина человека может привести к дисфункции почек, острой почечной недостаточности, осмотическому нефрозу и смерти. У пациентов, предрасположенных к острой почечной недостаточности внутривенные иммуноглобулины должны применяться в минимальных дозах и с минимальной скоростью введения. **Побочное действие:** При введении препарата Гамунекс®-С могут развиваться те же реакции, что и после внутримышечного или внутривенного введение других препаратов иммуноглобулина человека: рвота, тошнота, крапивница, беспокойство, приливы, одышка, боли в животе, миалгии, артралгия, головокружение, обморок, озноб, лихорадка, головная боль. **Форма выпуска:** во флаконах по 25 мл, 50 мл и 100 мл. **Условия хранения/транспортировки**: При температуре 2–8°С. Не замораживать. Срок годности – 36 мес. Возможно хранение препарата при температуре до 25°С в течение 6 мес. в любое время на протяжении срока годности.

Перед назначением препарата, упомянутого в данном материале, пожалуйста, ознакомьтесь с полной инструкцией по применению лекарственного препарата.

Претензии направлять по адресу: АО «Р-Фарм», 123154, г. Москва, ул. Берзарина д. 19, корпус 1.
Тел.:+7-495-956-79-37, факс.:+7-495-956-79-38.
E-mail: info@rpharm.ru, safety@rpharm.ru

Литература: 1. Gelfand E. W. Differences between IGIV products: Impact on clinical outcome. International Immunopharmacology. 2006; 6(4):592 – 599; 2. Siegel J. Safety considerations in IGIV utilization. International Immunopharmacology 2006; 6 (4): 523-7; 3. Roifman C.M., 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. International Immunopharmacology 2003;3:1325-1333; 4. Bussel J.B., Eldor A., Kelton J.G., 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; 5. Hughes R.A.C., 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; 7: 136–44.

Р-ФАРМ Инновационные технологии здоровья
GRIFOLS

**АО «Р-Фарм», 123154, Москва, ул. Берзарина д.19, корпус 1.
тел: +7-495-956-79-37
факс: +7-495-956-79-38**

Доказано наукой. Подтверждено пациентами.

ISSN 1563-0625