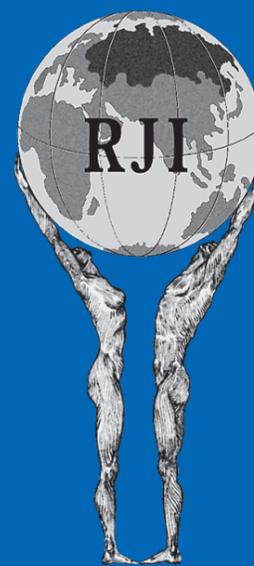


ISSN 1028-7221

Том 8 (17), Номер 2 (1), Апрель – Июнь 2014



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ

RUSSIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

<http://www.naukaran.ru>



НАУКА



**ТЕМАТИЧЕСКИЙ ВЫПУСК ПРИУРОЧЕННЫЙ  
К IX ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ  
«ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ЧТЕНИЯ В г. ЧЕЛЯБИНСКЕ»  
И МЕЖДУНАРОДНОЙ ШКОЛЕ С ЭЛЕМЕНТАМИ ШКОЛЫ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
«ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ  
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ»  
г. Челябинск, 24 августа – 31 августа 2014 года**

**Организаторы конференции**

Российская академия наук  
Уральское отделение Российской академии наук  
ФГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный университет  
Российское научное общество иммунологов  
ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН  
ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России  
ГБУЗ Челябинский областной клинический госпиталь ветеранов войн  
ООО «Академический инновационный научный центр»

**Конференция и школа проводятся при поддержке компаний**

ООО «Бекмен Культер» - представительство компании Beckman Coulter в России и СНГ, Москва  
ООО «ЛабТэк Лтд», Санкт-Петербург  
ООО «Хеликон», Москва  
ООО «ФЕРОН», Москва  
«БИО-РАД» Москва

Конференция поддержана грантом РФФИ 14-04-20001

**Организационный комитет**

**Сопредседатели**

Черешнев В. А., академик РАН и РАМН, профессор, д.м.н.  
Зурочка А. В., профессор, д.м.н.

**Заместители председателя:**

Альтман Д. Ш., профессор, д.м.н.  
Хайдуков С. В., д.б.н

**Члены оргкомитета**

Аклеев Александр Васильевич, профессор, д.м.н.	Лагерева Юлия Геннадьевна, к.м.н.
Бахметьев Борис Аркадьевич, к.м.н.	Пашнина Ирина Александровна, к.б.н.
Давыдова Евгения Валерьевна, к.м.н.	Продеус Андрей Петрович, профессор, д.м.н.
Заботина Татьяна Николаевна, профессор, д.м.н.	Раев Михаил Борисович, д.б.н.
Захаров Юрий Михайлович, Академик, профессор, д.м.н.	Симбирцев Андрей Семенович, профессор, д.м.н.
Зуева Елена Борисовна, к.б.н.	Семикина Елена Леонидовна, д.м.н.
Зурочка Владимир Александрович, к.м.н.	Суховой Юрий Геннадьевич, профессор, д.м.н.
Калинина Наталия Михайловна, профессор, д.м.н.	Тихонина Елена Александровна, к.м.н.
Кетлинский Сергей Александрович, Член-корреспондент, профессор, д.б.н.	Тотоян Арег Артемович, Член-корреспондент, профессор, д.м.н.
Козлов Иван Генрихович, профессор, д.м.н.	Топтыгина Анна Павловна, к.м.н.
Костоломова Елена Геннадьевна, к.б.н.	Тузанкина Ирина Александровна, профессор, д.м.н.
Кудрявцев Игорь Владимирович, к.б.н.	Черешнева Маргарита Владимировна, профессор, д.м.н.

## СОДЕРЖАНИЕ

---

Том 8 (17), Номер 2-3 (1), Апрель - Сентябрь 2014

---

ТЕМАТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ 3

---

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ 183

---

## ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕЛЕНА МИНЕРАЛЬНОЙ ВОДЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Абрамцова А. В., Пигунова Л. А.

*Отдел изучения механизмов действия физических факторов. Федеральное  
Государственное Бюджетное Учреждение Пятигорский Государственный Научно-  
Исследовательский Институт Курортологии Федерального Медико-биологического  
Агенства России, Пятигорск, Россия*

В эксперименте изучено профилактическое действие природной и модифицированной наночастицами селена (МНЧС) среднеминерализованной углекислой минеральной воды на устойчивость к нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией (ИГГсГк) у крыс линии Вистар. Курсовое применение МНЧС минеральной воды на животных, предотвратило проявления цитолиза после моделирования ИГГсГк. У патологической модели наблюдалось снижение массы тимуса на 20–28% и уменьшение её клеточности в 2 раза. Действие МНЧС минеральной воды повысило пролиферативную активность тимуса, не оказав влияния на его массу. Отличительным профилактическим действием МНЧС минеральной воды является восстановление окислительно-метаболического потенциала фагоцитов и сохранение их резервов сравнимым с уровнем интактных животных.

*Ключевые слова:* минеральная вода, наночастицы селена, гипоксическая гипоксия, лейкоциты.

**Введение.** Экспериментальные исследования превентивного действия кавказских минеральных вод показали увеличение резистентности к повреждающему действию гипоксической гипоксии и повышению выживаемости животных в экстремальных условиях [4]. Гипоксия, вызывая энергодифицит в органах и тканях, приводит к нарушению деятельности регуляторных систем, тем самым способствует развитию широкого круга дисрегуляторных патологий [1]. В связи с этим становится актуальной разработка программ профилактики и реабилитации пациентов при заболеваниях, в патогенезе, которых гипоксия вызывает изменения регуляторных контуров и нарушения в системе иммунной защиты организма [3]. С целью усиления непосредственного действия минеральной воды на клеточном уровне предложено модифицировать её состав наночастицами селена. Преимущество выбора модификации минеральной воды селеном в виде наночастиц, связано с участием его в антиоксидантных внутриклеточных систе-

мах, низкой токсичностью по сравнению с селенитом и большей биодоступностью [2,5].

**Целью** исследования являлось изучение эффективности применения природной и модифицированной минеральной воды, направленной на профилактику и коррекцию бицидной функции лейкоцитов в эксперименте.

**Материалы и методы.** Моделирование интервальной гипоксической гипоксии с гиперкапнией (ИГГс Гк) проводили в течение 9 дней с интервалом 24 часа, используя гермокамеру (вторая опытная группа). На фоне курсового (21 день) приема углекислой минеральной воды (МВ) «Красноармейская» (третья опытная группа) и МВ модифицированной наночастицами селена (четвертая опытная группа) моделирование ИГГсГк проводили с 13 дня курсового поения животных. Модифицирование минеральной воды наночастицами селена (диаметр не более 35 нм) проводили непосредственно перед поением с учетом массы животных (40 мкг/кг). Все животные содержались в стандартных условиях вивария. Декапита-

цию животных проводили на 22 день эксперимента.

Определяли массы тимусов и их клеточность, оценивали окислительно-метаболический потенциал фагоцитирующих нейтрофилов в периферической крови по фотометрическому тесту восстановления нитросинего тетразоля. Статистический анализ результатов проводили с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни (достоверность различий считали при  $p < 0,05$ ), и множественных сравнений Ньюмана-Кьюлс (результаты представлены Ме- медианами и 25–75% – процентилями).

**Результаты и обсуждение.** Моделирование тяжелой степени гипоксической гипоксии повышало аспартаттрансаминазу крови во второй группе животных (94,9 (82,8–100) ед./л.), в сравнение с животными интактной группы (79 (77–80,4) ед./л.). Под действием природной и модифицированной наноселеном МВ снижались показатели исследуемого фермента соответственно 74 (73–75,5) ед./л. и 71,9 (70,5–76,5), что свидетельствовало о развитии энергодефицита в тканях и угнетение его активности, без проявления синдрома цитолиза.

После 9 дневной ИГГсГк снижаются массы тимусов от 397 (335–443) мг до 267 (208–324) мг, при этом достоверно уменьшается и их пролиферативная активность (клеточность тимуса от  $83,9 (52–121) \times 10^9/л$  до  $38,5 (23,3–49) \times 10^9/л$ ,  $p = 0,04$ ). Клеточность тимуса достоверно возрастает на фоне приема природной МВ  $114,4 (69–137) \times 10^9/л$ , МВ с НЧ селена поддерживает пролиферативную активность тимуса в соответствии с уровнем интактных животных. В периферической крови достоверно снижаются показатели абсолютного количества сегментоядерных нейтрофилов во всех опытных группах, что, по-видимому, связано с эффлюксом лейкоцитов ткани. Микробицидные свойства лейкоцитов оценивали по окислительному метаболизму фагоцитирующих нейтрофилов. В результате расчета абсолютного числа фагоцитирующих клеток крови, было установлено статистически значимое увеличение спонтанной метаболической активности фагоцитов у животных, подвергшихся ИГГсГк во всех опытных группах в сравнение с группой интактных животных (Табл. 1).

Коэффициент функционально-метаболической активности (КФМА) фагоцитов периферической крови (Табл. 2) выявил снижение киллерной способности лейкоцитов в группе

животных с проведением ИГГсГк (вторая группа) по сравнению с интактными животными и на фоне приема минеральной воды (третья группа). При введении в минеральную воду НЧС (40 мкг/кг) поддерживался высокий уровень кислородозависимого пути биоцидности лейкоцитов в периферической крови, соответствующий уровню интактных животных (четвертая группа).

Таблица 1. Расчет абсолютного числа фагоцитирующих клеток крови подвергшихся ИГГсГк.

Группы животных	Полученные значения (условные единицы)	Среднее значение (условные единицы)
Интактные	18,8–26,3	22,3
Вторая	37,7–60,0	49
Третья	45,5–62,1	54,2
Четвертая	28,8–53,7	37,6

Таблица 2. Коэффициент функционально-метаболической активности (КФМА) фагоцитов периферической крови.

Группы животных	Полученные значения КФМА (условные единицы)	Среднее значение КФМА (условные единицы)
Интактные	1,26–1,35	1,27
Вторая	0,9–1,17	1,04
Третья	1,0–1,24	1,19
Четвертая	1,06–1,43	1,3

Таким образом, в результате курсового поения животных модифицированной минеральной водой с наночастицами селена наблюдается повышение устойчивости тканей к деструктивному действию тяжелой гипоксической гипоксии, снижаются проявления цитолиза, и сохраняется резерв кислородзависимой биоцидности лейкоцитов крови на уровне интактных животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляционная патология / Г.Н. Крыжановский // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2002. – с. 2–19.
2. Мирошниченко М.В. Изучение закономерностей синтеза и разработка технологии концентрата наночастиц нульвалентного селена для новых профилактических продуктов. // автореф. дис. к.т.н. – Ставрополь, 2013. – 23 с.

3. Николаев С. Б. Фармакологическая коррекция иммунометаболических нарушений в условиях гипоксии. // автореф. дис. д.м.н.– Курск, 2011–48 с.
4. Полушина Н. Д., Фролков В. К., Ботвинева Л. А. Превентивная курортология: (Теорет. и прикладные аспекты, перспективы) // Изд-во Гос. НИИ курортологии и Пятигорск, 1997.– 241 с.
5. Распопов Р. В. Биодоступность и биокинетические характеристики некоторых приоритетных наноматериалов в эксперименте. // автореф. дис. к.б.н.– Москва, 2011.– 23 с.

## PREVENTIVE EFFECT OF THE MINERAL WATER MODIFIED BY USING NANOPARTICLES OF SELENIUM IN THE EXPERIMENT

Abramtsova A. V., Pigunova L. A.

In the experiment studied the preventive effect of natural and modified by using nanoparticles of selenium (MNS) moderately mineralized carbonated mineral water for resistance to normobaric hypoxic hypoxia with hypercapnia (NHHH) in rats of Wistar line. After modeling NHHH the manifestations of cytotoxicity in rats was prevented by using of MNS mineral water. In pathological models there was a decrease thymus weight by 20–28% and its cellularity to 2 times. Effect of MNS mineral water was increase of proliferative activity of thymus without affecting its mass. Distinguishing preventive effects of MNS mineral water is to restore of metabolic redox potential phagocytes and the preservation of their reserves comparable to the level of intact animals.

*Keywords: mineral water, selenium nanoparticles, hypoxemic hypoxia, leukocytes.*

## РОЛЬ ЦИТОКИНОВ ПРИ HELICOBACTER PYLORI-АССОЦИИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ У КОРЕННОГО И ПРИШЛОГО НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ХАКАСИЯ

Агеева Е. С.<sup>1</sup>, Саранчина Ю. В.<sup>1</sup>, Иптышев В. М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова»;  
<sup>2</sup>ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г. Я. Ремиевской», Республика Хакасия, Абакан, Россия

В статье представлены результаты исследования особенностей продукции IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  у пациентов с *Helicobacter pylori*-ассоциированными заболеваниями (хронический гастрит, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки). Обследованный контингент представлен двумя популяциями европеоидами и хакасами. Выявлены, что у больных с *Helicobacter pylori*-инфекцией наблюдается выраженный рост IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , различия носят статистически значимый характер у хакасов и европеоидов.

*Ключевые слова:* лимфоциты, хакасы, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , *H. pylori*.

**Введение.** Инфекцией *Helicobacter pylori* (НР) поражено более половины населения мира [2]. В России инфицированность НР взрослого населения колеблется в пределах 50–80%, а в некоторых регионах приближается к 100%. Показатели распространенности инфекции у детей не отличаются от таковых у взрослого населения [5, 7].

Длительное присутствие НР в организме человека индуцирует иммунный ответ, однако,

активность иммунной системы оказывается недостаточной для эффективной элиминации инфекта из организма. Углубленное изучение закономерностей нарушений продукции цитокинов лимфоцитами крови, популяционно-детерминированные иммунологические особенности продукции IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  у представителей разных этнических групп (хакасы, европеоиды) позволят расширить существующие на сегодняшний день представления о патогенезе

*Helicobacter pylori*-ассоциированных заболеваний и, возможно, разработать новые подходы к патогенетически оправданной терапии.

Целью работы являлось оценить роль IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  у пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, представителей у коренного и пришлого населения Республики Хакасия.

**Материалы и методы.** Обследованы 100 пациентов (52 европеоида и 48 хакасов) с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБ) и 128 пациентов (60 европеоидов и 68 хакасов) с хроническим антральным поверхностным гастритом (ХГ). Контрольной группой служили 120 здоровых доноров (60 европеоидов и 60 хакасов).

Отбор больных язвенной болезнью делали на основании клинических, эндоскопических и морфологических данных. Диагноз хронический гастрит устанавливался при морфологическом исследовании в соответствии с классификацией, разработанной на основе Сиднейской системы с использованием эзофагогастродуоденоскопии ЭФГДС (оценивались признаки, разработанные на основе Лос-Анджелесской системы). Обязательным критерием включения в группу исследования было наличие у пациентов НР, подтвержденное с помощью одного из четырех методов: быстрого уреазного теста, серологического, гистобактериоскопического исследования биоптатов слизистой оболочки желудка и ПЦР.

Определение уровня цитокинов (TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ ) в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) по инструкции, предлагаемой фирмой-производителем тест-систем («Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург). Учет результатов проводили с использованием спектрофотометра Immunochem 2100 («ThermoLabSystems», Финляндия). Результаты выражали в пкг/мл.

Статистический анализ результатов исследования производили с помощью пакета программ «Statistica for Windows 6.0». Результаты измерений представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха 25 и 75 процентов (С25 и С75). Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Для проверки статистической значимости различий показателей в сравниваемых группах использовали непараметрические критерии Вилкоксона (W) для независимых вы-

борок. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%. Для корреляционного анализа использовали критерий Спирмена.

**Результаты.** В результате исследования нами было установлено, что у пациентов с ХГ и ЯБ концентрация TNF $\alpha$  в сыворотке крови была значительно выше, чем в контроле. У европеоидов больных ХГ содержание TNF $\alpha$  составило 1180,0 (870,0–1900,0) пкг/мл, у пациентов с ЯБ – 980,0 (416,0–1570,0) пкг/мл, у здоровых доноров значения концентрации интерлейкина находились на уровне 54,0 (26,0–59,0) пкг/мл,  $p < 0,05$ . У хакасов содержание TNF $\alpha$  составило: 1210,0 (490,0–2130,0) пкг/мл – при ХГ и 1310,0 (580,0–2200,0) пкг/мл – у больных ЯБ. Оба значения превышали содержание TNF $\alpha$  в сыворотке крови у здоровых доноров (41,5 (33,0–50,0) пкг/мл,  $p < 0,05$ ). При межпопуляционном сравнении содержания цитокинов было обнаружено следующее: при ЯБ концентрация TNF $\alpha$  в сыворотке крови была статистически значимо выше у хакасов, чем у европеоидов ( $p < 0,05$ ). При ХГ такой закономерности обнаружено не было.

При изучении продукции IL-1 $\beta$  в сыворотке крови было показано, что у пациентов с НР-ассоциированными заболеваниями концентрация цитокина в сыворотке крови была значительно выше, чем в контроле. У европеоидов больных ХГ содержание IL-1 $\beta$  составило 812,0 (420,0–1200,0) пкг/мл, у пациентов с ЯБ – 890,0 (638,0–1570,0) пкг/мл, у здоровых доноров значения концентрации интерлейкина находились на уровне 47,0 (12,0–64,0) пкг/мл ( $p < 0,05$ ). У хакасов содержание IL-1 $\beta$  составило: 965,0 (650,0–1650,0) пкг/мл – при ХГ и 1160,0 (870,0–2010,0) пкг/мл – у больных ЯБ. Все значения превышали содержание IL-1 $\beta$  в сыворотке крови у здоровых доноров (24,0 (16,0–58,0) пкг/мл,  $p < 0,05$ ). Межпопуляционные различия показали, что при ЯБ различия были статистически значимо выше у хакасов, чем у европеоидов ( $p < 0,05$ ).

**Обсуждение.** Интерлейкины играют основную роль в регуляции про- и противовоспалительных реакций. Кроме того, они обуславливают специфические эффекты, ключевые в развитии НР-ассоциированного воспаления. Синтез цитокинов при НР-ассоциированных заболеваниях носит разный характер в зависимости от локализации патологического процесса. Так, например, при локализации язвы в же-

лудке уровень продукции цитокинов ниже, чем при локализации в двенадцатиперстной кишке [3, 8].

Полученные нами тенденции изменения уровня сывороточного цитокина IL-1 $\beta$  у больных, по сравнению с контролем, была выявлены и другими авторами. Роль IL-1 $\beta$  в патогенезе НР-ассоциированных заболеваний определяется выраженностью воспалительного, атрофического и ulcerогенного эффектов в слизистой оболочке желудка. При язвенной болезни желудка, ассоциированной с НР-инфекцией, повышенная экспрессия интерлейкина приводит к ингибированию секреции соляной кислоты, что изменяет рН и создает благоприятные условия для колонизации НР, способствует дальнейшему прогрессированию воспалительных изменений в теле желудка. Кислотная продукция уменьшается, со временем происходит потеря желез, т.е. начинается атрофия слизистой оболочки желудка [3]. В качестве одного из механизмов язвообразования рассматриваются участие IL-1 $\beta$  в окклюзии микроциркуляторного русла, ишемии и, как следствие, гипоксического повреждения клеток [3].

Таким образом, уровень интерлейкина-1 существенным образом влияет на рН содержимого желудка. Выявленные особенности кислотопродукции у хакасов и европеоидов [6] также могут быть связаны с характером экспрессии IL-1 $\beta$ , одного из ингибиторов кислотной продукции.

Другим патогенетически важным цитокином НР-инфекции является TNF $\alpha$ . В очаге воспаления TNF $\alpha$  запускает «цитокиновый каскад», увеличивает продукцию IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, оказывая провоспалительную функцию, а, следовательно, увеличивает повреждение слизистой оболочки желудка [4]. Гиперпродукция TNF $\alpha$  может быть одним из основных механизмов активации инфекционного про-

цесса при переходе от бессимптомного носительства к фазе клинических проявлений, что свидетельствует о прогрессировании заболевания. Кроме того, уровень цитокина в сыворотке крови значительно увеличивается при антигенной нагрузке, а так же в результате генетического полиморфизма [1].

Наши данные также имеют подтверждение и в результатах, представленных другими исследователями. Sun J. et al. (2006) показали повышение концентрации TNF $\alpha$  в сыворотке крови у пациентов с хронической инфекцией НР по сравнению с контролем [9].

**Выводы.** Таким образом, выявлен дисбаланс интерлейкинов сыворотки крови у пациентов, страдающих *Helicobacter pylori*-ассоциированной гастродуоденальной патологией, который характеризуется увеличением концентрации IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  у хакасов и европеоидов. У хакасов изменения носили более выраженный характер.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Имянитов Е. Н. Практическая онкология 2009, 10 (1), 1–7.
2. Лазебник Л. Б., Морозов И. А., Ильченко А. А., Хомерики С. Г. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2006, 1, 4–14.
3. Маев И. В. Кучерявый Ю. А., Оганесян Т. С. Иммунология 2008, 5, 4–11.
4. Телетаева Г. М. Практическая онкология 2007, 8 (4), 211–218.
5. Хомерики С. Г. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2006, 1, 37–46.
6. Штыгашева О. В., Агеева Е. С., Харьков В. Н., Степанов В. А. Гены и болезни хакасов. Красноярск: Поликор, 2010, 296.
7. Blaser M. J., Atherton J. C. J. Clin. Invest. 2004, 113, 321–333.
8. Moorchung N., Srivastava A. N., Gupta N. K. et al. Singapore Med. J. 2007, 48, 447–454.
9. Sun J., Aoki K., Zheng J.- X. et al. World J. Gastroenterol 2006, 12 (14), 2174–2180.

## THE ROLE CYTOKINES AT HELICOBACTER PYLORI-ASSOCIATED AN INFLAMMATION OF ABORIGINAL AND NON-ABORIGINAL INHABITANTS OF THE REPUBLIC OF KHAKASSIA

Ageeva E. S., Saranchina Y. V., Iptyshev V. M.

In article presented results research of features by level are IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  at patients with *Helicobacter pylori*-associated diseases (chronic gastritis, duodenal ulcers). The surveyed contingent is presented by two populations Caucasians and Khakas. Are revealed that at patients with *Helicobacter pylori*-infection expressed growth of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  is observed, distinctions have statistically significant character at Khakas than Caucasians.

*Keywords: lymphocytes, khakas, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , H.pylori.*

## ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО БИОФЛАВОНОИДА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ МЫШИНЫХ МОНОНУКЛЕАРОВ, АКТИВИРОВАННЫХ Т- И В-КЛЕТОЧНЫМИ МИТОГЕНАМИ

Албегова Д.З.<sup>1</sup>, Павлова С.И.<sup>2/3</sup>, Негребецкий В.В.<sup>1</sup>, Козлов И.Г.<sup>1/2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, <sup>2</sup>ФГУ ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва; <sup>3</sup>ФГБОУ ВПО Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

В современном мире актуальным является изыскание высоко избирательных иммуносупрессантов, не оказывающих влияния на клетки, которые не участвуют в иммунном ответе в момент терапевтического использования препаратов. Мишенью для этой подгруппы может являться запущенный в активированных лимфоцитах конкретный регуляторный или эффекторный механизм. На сегодняшний день с этой точки зрения большой интерес представляет класс полифенольных соединений растительного происхождения, поскольку многие флавоноиды демонстрируют разнообразные биологические эффекты на организменном уровне. Целью данного исследования являлось изучение влияния модифицированного биофлавоноида на пролиферацию мышинных мононуклеаров, активированных Т- и В-клеточными митогенами и сравнение этого эффекта с уже известным кверцетина дигидратом. В результате эксперимента было установлено, что применение обоих агентов в различной степени дозозависимо подавляло пролиферацию ЛПС- и Кона-активированных спленоцитов. Так, было показано, что модифицированный биофлавоноид в отличие от кверцетина дигидрата, активнее подавляет пролиферацию МНК, а следовательно, является более интересным для дальнейших исследований.

*Ключевые слова:* флавоноиды, мононуклеарные клетки, пролиферация.

В последнее время с точки зрения разработки новых лекарственных препаратов, большой интерес представляет класс полифенольных соединений растительного происхождения, поскольку многие флавоноиды демонстрируют разнообразные биологические эффекты на организменном уровне [1, 2, 3, 4, 5]. Изучение их механизмов действия на клеточном и молекулярном уровнях показывает, что некоторые флавоноиды способны селективно влиять на активность протеинкиназ [6, 7], а как следствие и на активацию сигнальных путей в клетках млекопитающих [8, 9, 10, 11].

В доступной для анализа научной литературе все больше появляется сведений об эффективности полифенолов растительного происхождения в модуляции и/или супрессии иммунного ответа, опосредованного различными субпопуляциями Т-лимфоцитов-хелперов (Th1, Th2, Th17). Многие флавоноиды *in vitro* угнетают пролиферацию митоген-активированных лимфоцитов [12], но есть

отдельные работы, демонстрирующие и диаметрально противоположный эффект [7]. Есть сведения о том, что кемпферол обладал слабой антипролиферативной активностью, а кверцетин значимо не влиял на пролиферацию и апоптоз В-лимфоцитов [13].

В работе Namgoong и соавт. представлены результаты по 34 индивидуальным флавоноидам, включающим производные халконов, флаванонов, флаван-3-олов, флавонов, флавононов, а также их гликозидов. Не все представители флавоноидов одинаково эффективно ингибировали пролиферацию Кона- и ЛПС-стимулированных мышинных лимфоцитов. Проллиферативный ответ Кона-стимулированных лимфоцитов подавляли все производные флавонов и флаванолов, имеющие 2,3-ненасыщенную связь и, по крайней мере, одну гидроксильную группу, тогда как пролиферацию ЛПС-стимулированных лимфоцитов в концентрации менее чем  $10^{-5}$  М подавлял только мирицетин [12].

Целью нашего исследования являлось изучение влияния модифицированного биофлавоноида (МБФ) на пролиферацию мышинных мононуклеаров, активированных Т- и В-клеточными митогенами и сравнение этого эффекта с уже известным в медицине кверцетина дигидратом (КД).

Перед началом основных исследований были проведены предварительные эксперименты, целью которых являлся подбор агентов (митогенов), индуцирующих пролиферацию лимфоцитов мышей, а также установление оптимальных концентраций этих веществ. Для индукции пролиферативного ответа преимущественно Т- и В-мышинных лимфоцитов был выбран конканавалин А (КонА; Sigma, США) и липополисахарид (ЛПС; Sigma, США) соответственно. Митогены были протестированы в условиях *in vitro* в диапазоне концентраций 1,0-30,0 мкг/мл. Уровни оптимальных концентраций активирующих агентов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Действующие концентрации агентов, активирующих лимфоциты

Активирующий агент, мкг/мл	
для В-лимфоцитов	для Т-лимфоцитов
ЛПС	КонА
10,0	15,0

Для оценки влияния исследуемого препарата на клеточную пролиферацию использовался метод оценки репликации ДНК, основанный на включении радиоактивной метки (<sup>3</sup>H-тимидин) в ДНК делящейся клеток. В экспериментах использовали спленоциты, выделенные из мышей-самцов двух линий: СВА и Balb/c. Клеточную суспензию засеивали в 96-луночный круглодонный планшет в конечной концентрации 10<sup>6</sup> клеток/луночка в полной питательной среде. Клетки инкубировали при 37°C, 100% влажности и 5% содержании углекислого газа в окружающем воздухе.

Через 24 ч преинкубации МНК с оптимальными концентрациями митогенов в опытные лунки вносили МБФ или КД и продолжали инкубацию еще в течение 48 ч. Во всех случаях исследуемые агенты (МБФ и КД) тестировали в диапазоне концентраций 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-7</sup> моль/мл (по 4 лунки на каждую концентрацию). В контрольные лунки вносили соответствующие объемы растворителя. За 16 часов до окончания культивирования в лунки добавляли

радиоактивную метку (<sup>3</sup>H-тимидин, конечная концентрация в лунке 5 мкКю/мл).

По истечении времени инкубации клетки из лунок собирали на автоматическом сборщике клеток, перенося радиоактивный материал на стеклянноволокнистые фильтры типа НА-930 (Whatmann, Великобритания). Затем высушенные фильтры помещали во флаконы из кварцевого стекла, содержащие по 4 мл сцинтилляционного раствора. Радиоактивность подсчитывали на счетчике β-частиц. При оценке действия экспериментального препарата сравнивали значения включений <sup>3</sup>H-тимидина в лунках с добавлением исследуемых агентов, и в контроле. Среднее значение для четырех измерений радиоактивности при каждой исследуемой концентрации выражали в процентах от контроля по следующей формуле:

$$\frac{(\text{имп/мин}) \text{ в опыте} \times 100\%}{(\text{имп/мин}) \text{ в контроле}}$$

Было выявлено, что внесение как МБФ так и КД в опытные лунки дозозависимо подавляло пролиферацию ЛПС- и КонА-активированных спленоцитов. Следует отметить, что при этом не наблюдалось зависимости антипролиферативного эффекта от принадлежности клеток к той или иной линии мышей, поэтому результаты всех серий экспериментов были усреднены и представлены в виде одной кривой на рис. 1.

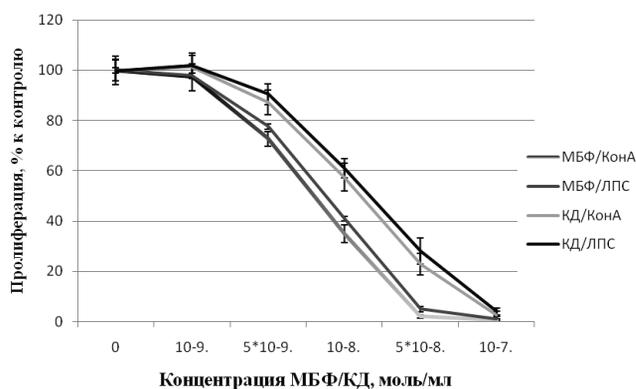


Рисунок 1. Влияние МБФ и КД на пролиферацию митоген-активированных спленоцитов мышей *in vitro*. Митогены: липополисахарид (ЛПС), конканавалин А (КонА). Уровень пролиферации клеток, не инкубированных с агентами (контроль), соответствует 100%.

По рис. 1 видно, что антипролиферативная активность обоих агентов была выше по отношению к спленоцитам, активированным КонА и ЛПС, однако значительно и достоверно ( $p < 0,05$ ) отличалась в зависимости

от используемого препарата. Эффект МБФ и КД в концентрации  $10^{-9}$  моль/мл составил  $97,2 \pm 5,4\%$  и  $101,4 \pm 4,6\%$  соответственно для МНК, стимулированных Кона и  $98,0 \pm 6,5\%$  и  $102,0 \pm 4,8\%$  для ЛПС-стимулированных клеток, что не имело достоверных различий в сравнении с контрольными значениями. При использовании КД в концентрации  $5 \times 10^{-9}$  моль/мл процент пролиферации составил  $87,3 \pm 4,8\%$  для МНК, стимулированных Кона, и  $90,5 \pm 4,2\%$  для стимулированных ЛПС. В то время как при применении МБФ в той же концентрации процент пролиферации Т-клеток составил  $72,7 \pm 2,9\%$ , а В-лимфоцитов –  $77,5 \pm 5,3\%$ , что достоверно ( $p < 0,05$ ) отличалось от данных, полученных на препарате КД. В концентрации  $10^{-8}$  моль/мл разница в проценте пролиферации между двумя агентами МБФ и КД была также статистически достоверной ( $p < 0,05$ ). Так, пролиферация при использовании МБФ и КД в отношении МНК, стимулированных Кона составила  $34,8 \pm 3,5\%$  и  $57,5 \pm 5,4\%$  соответственно, а для клеток, стимулированных ЛПС –  $41,0 \pm 6,8\%$  и  $61,0 \pm 3,7\%$ . При внесении в лунки МБФ и КД в концентрации  $5 \times 10^{-8}$  моль/мл процент пролиферации составил  $2,0 \pm 0,5\%$  и  $22,7 \pm 4,3\%$  соответственно, при стимуляции Кона, и  $4,8 \pm 2,5\%$  и  $28,0 \pm 5,2\%$  при стимуляции ЛПС. Процент пролиферации МНК, стимулированных Кона при применении МБФ и КД в концентрации  $10^{-7}$  моль/мл, составил  $0,75 \pm 0,2\%$  и  $2,6 \pm 1,5\%$ , и клеток, стимулированных ЛПС –  $1,0 \pm 0,5\%$  и  $4,0 \pm 1,5\%$  соответственно.

Учитывая полученные результаты, можно предположить, что в МБФ и КД способны в различной степени ингибировать тирозинкиназы, однако для таких заключений необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, результаты экспериментов по изучению антипролиферативных эффектов МБФ и КД *in vitro* позволяют заключить следующее:

1. МБФ и КД в диапазоне концентраций  $10^{-9}$  –  $10^{-7}$  моль/мл дозозависимо подавляют пролиферацию митоген-активированных Т- и В-лимфоцитов в условиях *in vitro*. Однако, МБФ достоверно ( $p < 0,05$ ) активнее подавляет пролиферацию МНК, а, следовательно, является более интересным для дальнейших исследований, в отличие от известного препарата КД.

2. Не выявлено межлинейных (СВА и Balb/c) различий в проявлении антипролиферативной активности МБФ и КД *in vitro*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Шульпекова Ю.О. Флавоноиды расторопши пятнистой в лечении заболеваний печени. Рус. мед. журн. 2004, 12 (5), 248-250.
2. Donfack J.H., Simo C.C., Ngameni B. et al. Antihepatotoxic and antioxidant activities of methanol extract and isolated compounds from *Ficus chlamydocarpa*. Nat. Prod. Commun. 2010, 5(10), 1607-1612.
3. Chauhan P.S., Satti N.K., Suri K.A. et al. Stimulatory effects of Cumin-cyminum and flavonoid glycoside on Cyclosporine-A and restraint stress induced immune-suppression in Swiss albino mice. Chem. Biol. In-teract. 2010, 185(1), 66-72.
4. Dagne A., Melkamu T., Schutten M.M. et al. Enhanced inhibition of lung adenocarcinoma by combinatorial treatment with indole-3-carbinol and silibinin in A/J mice. Carcinogenesis. 2011, 32(4), 561-567.
5. Feng Y.H., Zhou W.L., Wu Q.L. et al. Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. Acta. Pharmacol. Sin. 2002, 23(10), 893-897.
6. Atluru D., Jackson T.M., Atluru S. Genistein, a selective protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits interleukin-2 and leukotriene B4 production from human mononuclear cells. Clin. Immunol. Immunopathol. 1991, 59, 379-387.
7. Guruvayoorappan C., Kuttan G. Amentoflavone, a biflavonoid from *Biophytum sensitivum* augments lymphocyte proliferation, natural killer cell and antibody dependent cellular cytotoxicity through enhanced production of IL-2 and IFN-gamma and restrains serum sialic acid and gamma glutamyl transpeptidase production in tumor-bearing animals. J. Exp. Ther. Oncol. 2007, 6(4), 285-295.
8. Chen C.C., Chow M.P., Huang W.C. et al. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. Mol. Pharmacol. 2004, 66(3), 683-693.
9. Chen M., Gu H., Ye Y. et al. Protective effects of hesperidin against oxidative stress of tert-butyl hydroperoxide in human hepatocytes. Food Chem. Toxicol. 2010, 48(10), 2980-2987.
10. Chen S.R., Xu X.Z., Wang Y.H. et al. Icariin derivative inhibits inflammation through suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways. Biol. Pharm. Bull. 2010, 33(8), 1307-1313.
11. Funakoshi-Tago M., Tago K., Nishizawa C. et al. Licovhalcone A is a potent inhibitor of TEL-Jac2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation. Biochem. Pharmacol. 2008, 76(12), 1681-1693.

12. Namgoong S.Y., Son K.H., Chang H.W. et al. Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 1993, 54, 313-320.
13. Zunino S.J., Storms D.H. Resveratrol alters proliferative responses and apoptosis in human activated B lymphocytes in vitro. *J. Nutr.* 2009, 139, 1603-1608.

## INFLUENCE OF MODIFIED BIOFLAVONOID ON PROLIFERATION OF MURINE MONONUCLEAR CELLS ACTIVATED WITH T-AND B-CELL MITOGENS

Albegova D.Z.<sup>1</sup>, Pavlova S.I.<sup>2/3</sup>, Negrebetsky V.V.<sup>1</sup>, Kozlov I.G.<sup>1/2</sup>

<sup>1</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, <sup>2</sup>D. Rogachev Federal Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, <sup>3</sup>Russia Chuvash State University, Cheboksary

In today's world is topical to find highly election immunosuppressants, which has no effect on cells that are not involved in the immune response at the time of the therapeutic use of drugs. Target for this subgroup may be launched in activated lymphocytes specific regulatory or effector mechanism. To date, at this point of great interest is the class of polyphenolic compounds of plant origin, as many flavonoids demonstrate a variety of biological effects at the organism level. The purpose of this study was to investigate the influence of the modified bioflavonoid on proliferation of murine mononuclear cells activated with T-and B-cell mitogens and to compare this with the already known effect of quercetin dihydrate. As a result of experiment, it was found that the use of both agents to varying degrees dose dependently inhibited proliferation of ConA and LPS-activated splenocytes. Thus, it was shown that modified bioflavonoid unlike quercetin dihydrate, actively inhibits the proliferation of MNCs and, hence, is more interesting for further studies.

*Key words: flavonoids, licorice root, mononuclear cell, proliferation*

---

---

## МОДИФИЦИРОВАННЫЙ БИОФЛАВНОИД СУПРЕССИРУЕТ РЕАКЦИЮ КОНТАКТНОЙ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У МЫШЕЙ

Албегова Д. З.<sup>1</sup>, Павлова С. И.<sup>2/3</sup>, Негребетский В. В.<sup>1</sup>,  
Кягова А. А.<sup>1</sup>, Козырь Л. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, <sup>2</sup>ФГУ ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва; <sup>3</sup>ФГБОУ ВПО Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

В экспериментах *in vivo* исследовано влияние кверцетина дигидрата и нового модифицированного биофлавоноида на течение реакции контактной чувствительности у мышей. Реакция контактной чувствительности мышей (КЧ) к 2,4-динитрофторбензолу (ДНФБ) является классической моделью Т-клеточного иммунного ответа *in vivo*. С использованием данной модели в нашей лаборатории показано, что вновь синтезированный модифицированный биофлавоноид при внутривенном использовании, обладает большей способностью супрессировать реакцию контактной чувствительности у мышей в сравнении с уже известным кверцетина дигидратом. Возможно, благодаря своей уникальной структуре новое вещество менее чем кверцетина дигидрат, подвержен метаболизму, и, следовательно, обладает устойчивостью и большей эффективностью при внутрибрюшинном введении.

*Ключевые слова:* флавоноиды, контактная гиперчувствительность, иммуносупрессия.

Флавоноиды – представители природных фенольных соединений, в основе структуры которых лежит система из конденсированных бензольного и гетероциклического колец с боковым фенильным заместителем (фенилбензопираны). Они содержатся почти во всех высших растениях, где часто представлены в форме гликозидов. Из растений выделены и идентифицированы тысячи индивидуальных флавоноидов. Огромное число работ, посвященных исследованию флавоноидов, демонстрирует, что эти вещества обладают широким диапазоном активностей. *In vitro* они угнетают различные ферментные системы животных и человека (в том числе эффективно ингибируют различные киназы сигнальных путей в клетке [1], а *in vivo* проявляют противовоспалительные [2], иммуностимулирующие [3], антиканцерогенные [4], противоопухолевые [5] и другие эффекты. Изучение свойств этих соединений привело к тому, что в последние десятилетия они привлекают внимание исследователей в качестве веществ, перспективных для получения лекарственных препаратов [6].

**Целью** данного исследования являлось изучение иммуносупрессивного действия модифицированного биофлавоноида (МБФ) в реакции контактной чувствительности у мышей (КЧ) и сравнение его эффекта с известным веществом кверцетин дигидратом (КД). Реакция КЧ мышей к ДНФБ является классической моделью Т-клеточного иммунного ответа *in vivo*.

В экспериментах были использованы мыши линий СВА (самцы весом 18–20 г, возраст 8–10 недель), полученные из питомника РАМН (Крюково, Московская область). Животные содержались на стандартном пищевом рационе вивария при свободном доступе к воде и пище. Экспериментальные группы животных формировали рандомизированно по 8 мышей в каждой.

В опытах использован полученный экспериментальным путем модифицированный биофлавоноид.

Статистическую обработку результатов проводили путем расчета средней арифметической и средней ошибки средней арифметической. Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента, разницу считали достоверной при  $P < 0,05$ .

Инициацию реакции контактной чувствительности (КЧ) к ДНФБ у мышей линии СВА проводили согласно общепринятому экспериментальному подходу с незначительными мо-

дификациями [72]. Животных сенсibilизировали путем аппликации на выбритую кожу брюшка 50 мкл 0,3% раствора ДНФБ в ацетоне на 0 день. Исследуемые вещества вводили парентерально в дозе  $2,6 \cdot 10^{-5}$  моль/кг. Через 6 суток после сенсibilизации на внутреннюю поверхность правого уха наносили разрешающую дозу ДНФБ (5 мкл 0,2% раствора). На левое ухо наносили аналогичный объем растворителя (ацетона). Отрицательным контролем ( $K^-$ ) служила группа интактных (несенсibilизированных) мышей, получивших только аппликацию разрешающей дозы ДНФБ. Через 24 часа после повторного нанесения ДНФБ оценивали интенсивность реакции КЧ по разнице отека правого и левого ушей (специфическое локальное воспаление). Толщину ушей измеряли в миллиметрах специальным микрометром, снабженным световым индикатором (Россия). Интенсивность супрессии реакции КЧ в процентах рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ супрессии} = \left( 1 - \frac{E - K^-}{K^+ - K^-} \right) * 100\%$$

где E,  $K^+$ ,  $K^-$  – отек уха у мышей в опытной группе (МБФ или КД), группе положительного и отрицательного контроля, соответственно.

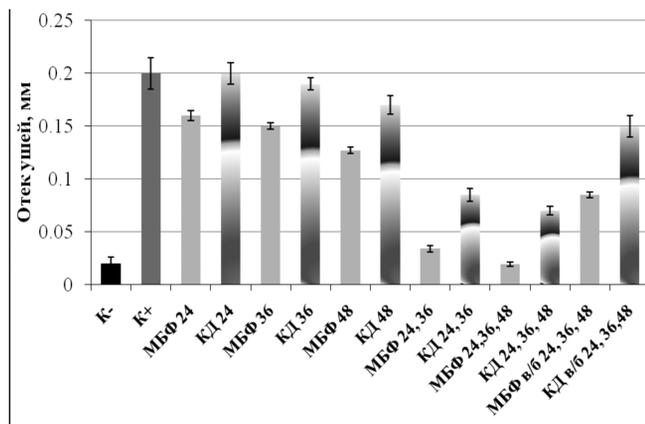
Для проведения эксперимента, мыши были разделены на следующие группы:

- $K^-$  (отрицательный контроль) – интактные мыши, которым на ухо наносили только разрешающую концентрацию ДНФБ;
- $K^+$  (положительный контроль) – группа мышей с индукцией КЧ, которым проводилась сенсibilизация и провокация ДНФБ (мыши из группы положительного контроля ( $K^+$ ) разбивались аналогично опытному на подгруппы и получали в те же сроки соответствующие объемы растворителя).

Разделение на группы мышей, получавших МБФ или КД парентерально представлено в таблице 1.

Внутри группы положительного контроля не замечалось статистически значимых различий в интенсивности реакции КЧ (значение отека уха) между подгруппами, получавшими в разные сроки физиологический раствор с 5% этанолом в качестве растворителя. Поэтому при статистической обработке результатов все значения обрабатывались вместе, что на рисунке 1 отражено как  $K^+$ .

Как представлено на рисунке 1 внутривенное введение мышам КД или МБФ через



**Рисунок 1.** Влияние различных режимов введения МБФ и КД на выраженность отека уха мышей в реакции КЧ, индуцированной ДНФБ. К<sup>+</sup> – положительный контроль (сенсibilизация + провокация). К<sup>-</sup> – отрицательный контроль (провокация без сенсibilизации)

24-48 ч после сенсibilизации дозозависимо подавляло развитие отека уха мыши. Так, однократное внутривенное введение КД в дозе  $2,6 \times 10^{-5}$  моль/кг, в зависимости от сроков после сенсibilизации, вызывало супрессию КЧ на 10–20%. Однако достоверных различий в этих группах между собой и по отношению к положительному контролю не было. При введении КД через 24 часа супрессии не наблюдалось. Процент супрессии КЧ при введении КД через 36 ч после сенсibilизации был равен  $10,0 \pm 4,0\%$ , при введении через 48 ч –  $20,0 \pm 4,5\%$ . Двухкратное применение

**Таблица 1.** Сроки и пути введения мышам МБФ и КД.

Опытные группы мышей	Сроки и пути введения МБФ и КД			
	внутривенно			внутрибрюшинно
	24 ч	36 ч	48 ч	24, 36, 48 ч
I (МБФ)	+			
I (КД)	+			
II (МБФ)		+		
II (КД)		+		
III (МБФ)			+	
III (КД)			+	
IV (МБФ)	+	+		
IV (КД)	+	+		
V (МБФ)	+	+	+	
V (КД)	+	+	+	
VI (МБФ)				+
VI (КД)				+

КД через 24 и 36 часов вызывало подавление реакции на  $64,0 \pm 2,7\%$ , в свою очередь трехкратное – на  $72,2 \pm 4,5\%$ . По отношению к контролю, различия в величине отека были достоверными ( $p < 0,05$ ). Внутрибрюшинное введение КД в максимальной дозе (суммарная доза  $7,8 \times 10^{-5}$  моль/кг) супрессировало КЧ только на  $27,8 \pm 4,5\%$ . Использование модифицированного биофлавоноида привело к более значительному подавлению реакции. Так, однократное внутривенное применение данного агента через 24, 36 и 48 часов вызывало супрессию КЧ на  $22,0 \pm 3,3\%$ ,  $30,0 \pm 2,7\%$  и  $41,0 \pm 3,2\%$  соответственно, что являлось достоверным ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю и препарату КД. Двух- и трехкратное внутривенное введение МБФ давали почти полное подавление КЧ. Так, при двухкратном введении супрессия составила –  $92,2 \pm 3,7\%$  ( $p < 0,05$ ), а при трехкратном –  $100 \pm 2,5\%$  ( $p < 0,05$ ). Однако, внутрибрюшинное введение МБФ в максимальной дозе (суммарная доза  $7,8 \times 10^{-5}$  моль/кг) супрессировало КЧ только на  $64,0 \pm 3,0\%$ .

Таким образом, результаты этой серии опытов показали:

1. Парентеральное введение (в/в, в/б) КД и МБФ дозозависимо подавляет реакцию КЧ.
2. Внутривенное введение эквивалентных доз МБФ и КД более эффективно подавляет КЧ, по сравнению с внутрибрюшинным использованием этих препаратов.

3. Внутривенное и внутрибрюшинное введение МБФ подавляет развитие реакции КЧ значительнее, чем использование КД.

Различные режимы парентерального введения мышам МБФ на ранней стадии после сенсibilизации приводили к дозозависимому подавлению реакции КЧ. Трехкратное внутривенное введение этого агента в дозе  $2,6 \cdot 10^{-5}$  моль/кг практически отменяло развитие КЧ у экспериментальных животных, однако такое же по кратности внутрибрюшинное введение МБФ было менее эффективным, но в сравнении с КД было значительным. Возможно, последний результат указывает на то, что при внутрибрюшинном введении создается меньшая концентрация изучаемого препарата в плазме крови, свидетельствуя об интенсивном метаболизме флавоноидов при прохождении их через эпителиальные барьеры до достижения системного кровотока. Можно предположить, что модифицированный биофлавоноид, благодаря своей структуре, не подвергается столь быстрому разрушению, поэтому показывает хорошие результаты и при внутрибрюшинном введении.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S. et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987, 262 (12), 5592-5595.
2. González-Gallego J., Sánchez-Campos S., Tuñón M.J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp.* 2007, 22 (3), 287-293.
3. Hsu S.D., Dickinson D.P., Qin H. et al. Green tea polyphenols reduce autoimmune symptoms in a murine model for human Sjogren's syndrome and protect human salivary acinar cells from TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity. *Autoimmunity.* 2007, 40 (2), 138-147.
4. McCormick D.L., Johnson W.D., Bosland M.C. et al. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by soy isoflavones and by Bowman-Birk inhibitor. *Nutr Cancer.* 2007, 57 (2), 184-193.
5. Varghese L., Agarwal C., Tyagi A. et al. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005, 11 (23), 8441-8448.
6. Chen C.L., Levine A., Rao A. et al. Clinical pharmacokinetics of the CD19 receptor-directed tyrosine kinase inhibitor B43-Genistein in patients with B-lineage lymphoid malignancies. *J. Clin Pharmacol.* 1999, 39 (12), 1248-1255.
7. Kim T.Y., Kripke M.L., Ullrich S.E. Immunosuppression by factors released from UV-irradiated epidermal cells: selective effects on the generation of contact and delayed hypersensitivity after exposure to UVA or UVB radiation. *J. Invest. Dermatol.* 1990, 94, 26-32.

## MODIFIED BIOFLAVONOID SUPPRESS CONTACT HYPERSENSITIVITY IN MICE

Albegova D. Z.<sup>1</sup>, Pavlova S. I.<sup>2/3</sup>, Negrebetsky V. V.<sup>1</sup>,  
Kyagova A. A.<sup>1</sup>, Kozyr L. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, <sup>2</sup>D. Rogachev Federal Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, <sup>3</sup>Russia Chuvash State University, Russia

In *in vivo* experiments we studied the effect of quercetin dihydrate and new modified bioflavonoid in model of contact sensitivity reaction in mice. Reaction of contact sensitivity in mice (CS) to 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) is a classic model of T-cell immune response *in vivo*. Using this model in our laboratory demonstrated that newly synthesized modified bioflavonoid by intravenous use, have a greater ability to suppress contact sensitivity reaction in mice in comparison with the already known quercetin dihydrate. Perhaps because of its unique structure the new substance of less than quercetin dihydrate susceptible to metabolism and therefore has higher efficiency and stability by intraperitoneal injection.

*Key words:* flavonoids, licorice root, contact hypersensitivity, immunosuppression

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФАГОЦИТОВ КРОВИ НА ФОНЕ ХИМИОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЛОСТИ РТА

Альтман Е. В.<sup>1</sup>, Чуксина Т. Ю.<sup>2</sup>, Важенин А. В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Стоматологическая поликлиника № 5, <sup>2</sup>Клиника ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет, <sup>3</sup>ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

Применение иммуномодулятора Полиоксидоний в терапии сопровождения химиолучевого лечения рака слизистых оболочек полости рта сопровождалось повышением активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов, усилением кислородзависимых механизмов бактерицидности, сниженных до проведения лечения, что свидетельствует о восстановлении функционального резерва фагоцитов, на фоне системных цитопенических эффектов ХЛТ, позволяющее снизить частоту инфекционно-воспалительных осложнений химиолучевого лечения.

*Ключевые слова:* рак ротовой полости, Полиоксидоний, фагоциты.

**Введение.** Актуальность проблемы злокачественных новообразований головы и шеи определяется неуклонным ростом данной патологии в России и в мире. Злокачественные новообразования слизистой оболочки полости рта (СОПР) отличаются быстрым и агрессивным течением, ранним метастазированием, что требует применения высоких доз облучения. Воздействие лучевой терапии на слизистые оболочки приводит к развитию радиомукозитов, угнетению неспецифической иммунной защиты тканей. Радиомукозиты требуют прекращения курса терапии, что значительно снижает эффективность лечения [1]. В связи с этим предпринимаются попытки предупреждения развития нежелательных побочных эффектов химиолучевого лечения с помощью введения в схему терапии препаратов иммуномодулирующего действия [2]. В качестве терапии сопровождения химиолучевого лечения шире всего в онкологии применяются препараты иммуностропного действия. В настоящем исследовании в качестве терапии сопровождения химиолучевой терапии (ХЛТ) был использован отечественный препарат Полиоксидоний, обладающий широким спектром фармакологического воздействия. Полиоксидоний применяется в качестве иммуномодулятора, детоксиканта, антиоксиданта, обладает свойствами пролонгатора действия

и носителя фармакологически активных соединений. Детальное изучение биологического действия Полиоксидония, начатое некоторыми исследователями еще в начале 80-х годов на различные звенья иммунной системы, показало его выраженный эффект на неспецифическую резистивность организма, проявляющуюся в активации антиинфекционной активности клеток преимущественно гранулоцитарного ряда. В связи с этим, целью настоящего исследования явилась оценка функциональных свойств нейтрофилов крови при применении иммуномодулятора Полиоксидоний в комплексном лечении местнораспространенного плоскоклеточного рака СОПР.

**Материалы и методы.**

**Обследуемый контингент.** Клинически и иммунологически обследовано 26 пациентов с гистологически верифицированным плоскоклеточным раком СОПР II–III стадии, средний возраст которых составил  $58 \pm 2,4$  года. Клинически оценивали общий и локальный статус пациентов, применяли современные методы визуализации.

Группу пациентов до лечения (2) методом простой рандомизации разделили на две равновеликие подгруппы 3 и 4: в третью группу вошли пациенты которые получали стандартную дистанционную  $\gamma$ -терапию в режиме динамиче-

ского (3 фракции по 4 Гр, затем с разовой дозой 2 Гр, 5 раз в неделю до суммарной очаговой дозы 38-40 Гр) или традиционного фракционирования (5 фракций по 2 Гр, 5 раз в неделю до суммарной очаговой дозы 44 Гр) с применением радиомодификатора цисплатина в средней дозе от 6 до 100 мг/м<sup>2</sup> на 400 мл физиологического раствора. Радиомодификатор цисплатин (6 мг/м<sup>2</sup>) применяли за 1 час до облучения, 1 раз в день.

В стандартную схему лечения 4 группы пациентов в качестве терапии сопровождения включили иммуномодулятор Полиоксидоний. Препарат вводили внутривенно капельно 6 мг 1 раз в сутки по схеме в 1, 2, 4, 7, 10, 13 дни. Курсовая доза 36 мг. Контролем служили здоровые лица, средний возраст 54,6±4,3 (1 группа).

**Материал для исследования.** Забор крови производили утром, из локтевой вены объемом 6 мл в вакуумную пробирку с K<sub>3</sub>EDTA объемом 9 мл, натошак всем пациентам до начала лучевой терапии (группа 2) и на 7-8 сутки от начала терапии (3,4 группы).

**Оценка функционального состояния нейтрофилов.** Функциональную активность ней-

трофилов периферической крови исследовали путем определения активности фагоцитоза, интенсивности фагоцитоза и определения фагоцитарного числа с помощью стандартных методов. Способность к кислородзависимому киллингу определяли с помощью восстановления нитросинего тетразолия [3].

**Статистические методы исследования.** Применяли пакет прикладных программ Statistica for Windows vers. 6.0. фирмы StatSoft Inc. (США), проводилось определение медианы (Me), интерквартильного размаха (Q25-Q75), сравнение групп с помощью критерия Вилкоксона.

**Результаты и обсуждение.** Согласно цели исследования, были изучены следующие функции нейтрофилов периферической крови: активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число, кислородзависимые бактерицидные механизмы (НСТ-тест спонтанный и индуцированный, индексы НСТ тестов). Результаты исследований представлены в таблице 1.

Анализ таблицы 1, показал достоверное снижение активности и интенсивности фагоцитоза

Таблица 1. Показатели функциональной активности нейтрофилов у пациентов с плоскоклеточным раком СОПР до и после ХЛТ и ХЛТП.

Показатели	1 группа Контрольная	2 группа До лечения	3 группа После ХЛТ	4 группа После ХЛТП	p
	M±m	M±m	M±m	M±m	
Активность фагоцитоза	38 ± 1,36	35,1 ± 1,9	32,9 ± 1,1	44,6 ± 1,9	0,03 1-3 0,01 1-4 0,008 2-1 0,003 2-4 0,002 3-4
Интенсивность фагоцитоза	1,27 ± 0,06	1,24 ± 0,04	1,19 ± 0,02	1,52 ± 0,06	0,003 1-3 0,002 1-4 0,001 2-4 0,002 3-4
Фагоцитарное число	3,36 ± 0,1	3,2 ± 0,11	3,23 ± 0,1	3,4 ± 0,07	
НСТ спонтанная активность	24,8 ± 3,5	18,1 ± 0,69	17,8 ± 1,13	20,6 ± 1,6	0,004 1-3 0,01 1-2 0,01 1-4
НСТ индекс спонтанной активности	0,32 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,002 1-2 0,008 1-3 0,001 2-4 0,01 3-4
НСТ индуцированная активность	39,5 ± 2,6	34,3 ± 1,9	32,7 ± 1,4	42,0 ± 2,2	0,005 1-2 0,008 1-3 0,003 2-4 0,004 3-4
НСТ индекс индуцированной активности	0,52 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,57 ± 0,03	0,002 1-2 0,045 1-3 0,003 3-4 0,02 2-4

нейтрофилов в группах пациентов до ХЛТ и после курса лучевой терапии без применения Полиоксидония в терапии сопровождения в сравнении с контрольной группой и пациентами, получающими Полиоксидоний. При этом фагоцитарное число не имело отличий среди изучаемых групп. Многими исследованиями показано, что Полиоксидоний воздействует на все звенья фагоцитарного процесса: активизирует миграцию фагоцитов, усиливает клиренс чужеродных частиц из кровотока, повышает поглотительную и бактерицидную активность фагоцитов [4]. Известно, что бактерицидность фагоцитов обусловлена кислородзависимыми и кислороднезависимыми механизмами. Способность к продукции активных форм кислорода (АФК) является одним из универсальных свойств фагоцитов крови. Ключевым событием образования АФК является сборка ферментативного комплекса НАДФ-оксидазы [3]. Необходимым условием этого являются сигналы от фагоцитарных рецепторов, отвечающих за распознавание патогена. Сборка ферментативного комплекса приводит к тому, что один из его компонентов, а именно  $gp91^{phox}$ , приобретает конформацию, способную передавать электрон, полученный от НАФН, на молекулу кислорода. В результате этой реакции образуется короткоживущий супероксид анион или супероксид радикал. Сам по себе он не обладает бактерицидной активностью, но способен запускать последующую цепь реакций, приводящих к формированию токсичных для микробов АФК. НСТ – тест отражает интенсивность образования в клетке АФК. Нашими исследованиями показано, что после проведения ХЛТ в сопровождении Полиоксидония уровень спонтанной НСТ-активности сопоставим с контрольной группой, в то время как в остальных группах 2, 3 его показатель

был существенно снижен в сравнении со здоровыми лицами, что предполагает его непосредственное участие в механизмах генерации АФК. Способность Полиоксидония восстанавливать бактерицидный потенциал фагоцитов до нормы, показана при инкубации лейкоцитов больных с хронической гранулематозной болезнью в питательной среде с добавлением препарата. Индекс спонтанной НСТ-активности имел аналогичную достоверную тенденцию роста у пациентов в группе ХЛТП. Системное введение Полиоксидония на фоне проведения курса химиолучевой терапии привело к нормализации показателей НСТ индуцированной активности нейтрофилов и индекса индуцированного НСТ-теста в этой группе пациентов, несколько превышающих показатели контрольной группы, что свидетельствует о восстановлении функционального резерва фагоцитов, на фоне системных цитопенических эффектов ХЛТ, позволяющее снизить частоту инфекционно-воспалительных осложнений химиолучевого лечения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П. А. Герцена» Минздрава России. 2012. – С. 4–25.
2. Chiappelli, F. The Molecular Immunology of Mucositis: Implications for Evidence-Based Research in Alternative and Complementary Palliative Treatments / F. Chiappelli // *Evid. Based Complement Alternat. Med.* – 2005. – Vol. 2, N 4. – P. 489-494.
3. Маянский А.Н. Лекции по иммунологии / Н. Новгород: Изд-во Ниж-ГМА; 2003. – 272 с.
4. Новиков, В.И. Иммунотерапия при злокачественных новообразованиях / В.И. Новиков, В.И. Карандашов, И.Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2002. – 160 с.

#### POLIOKSIDONY'S INFLUENCE ON THE FUNCTIONAL CONDITION OF PHAGOCYTES OF BLOOD AGAINST HEMIOLUCHEVA OF PLOSKOKLETOCH-NOGO'S THERAPY OF THE CANCER OF THE ORAL CAVITY

Altman E. V.<sup>1</sup>, Chuksina T. Y.<sup>2</sup>, Vazhenin A. V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Stomatologic policlinic No. 5, <sup>2</sup>Klinikagbou VPO Southern Ural state medical university, <sup>3</sup>GBOU VPO Southern Ural state medical university, Chelyabinsk

Application Polioksidoni immunomodulator therapy support chemoradiotherapy cancer of the oral mucosa was accompanied by an increase in the intensity of activity and phagocytosis of neutrophils, increased oxygen-dependent bactericidal mechanisms, reduced before treatment, indicating that restoration of functional reserve of phagocytes, against systemic effects tsitopenichesky CRT, reduces the incidence of infectious inflammatory complications chemoradiotherapy.

*Key words: oral cancer, Polioksidoni, phagocytes*

## РОЛЬ ПОЛИОКСИДОНИЯ В ИЗМЕНЕНИИ УРОВНЕЙ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ НА ФОНЕ ХИМИОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

Альтман Е.В.<sup>1</sup>, Чуксина Т. Ю.<sup>2</sup>, Важенин А. В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Стоматологическая поликлиника № 5, <sup>2</sup>Клиника ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет, <sup>3</sup>ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

Изучено влияние иммуномодулятора Полиоксидоний, применяемого в качестве терапии сопровождения химиолучевого лечения рака слизистой оболочки полости рта, на изменение количественных характеристик ряда про- и противовоспалительных цитокинов. Установлено стимулирующее действие Полиоксидоний, в отношении продукции про- и противовоспалительных цитокинов, что можно расценивать как положительный системный иммуномодулирующий эффект препарата.

*Ключевые слова:* рак ротовой полости, Полиоксидоний, цитокины.

**Введение.** Рак слизистой оболочки полости рта занимает 1,2–4% в структуре онкологической патологии [1,2]. В настоящее время онкологический диагноз выставлен более 70 тысячам жителей Челябинской области. Известно, что рак органов ротовой полости развивается в 5–7 раз чаще у мужчин. Пик заболеваемости приходится на возраст 60–70 лет [3].

Современные исследования показывают, что начальные стадии канцерогенеза сопряжены с активацией процессов свободно-радикального окисления в клетке и сопровождаются освобождением ряда провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), простагландинов, циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2). Предполагают, что снижение противоопухолевого иммунитета может быть также связано с ростом уровня цитокинов ингибиторного действия: TGF- $\beta$ , ИЛ-10 и др. [4]. Изучение биологии раковых клеток, механизмов раковой иммуносупрессии открывает перспективы использования протоколов иммунотерапии рака. Имеется ряд работ по системному и локальному применению иммуномодулятора Полиоксидоний в онкологии в качестве терапии сопровождения химиолучевого лечения с целью предупреждения и ослабления цитопенических реакций, гепато- и нефротоксичности [5]. Активируя эффекторы врожденного иммунитета, и усиливая синтез цитокинов клетками моноцитарно-макрофагальной

системы, Полиоксидоний оказывает лейкопозитический, цитолитический эффект, участвует в противоинфекционной резистентности организма. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение влияния иммуномодулятора Полиоксидоний, используемого в качестве терапии сопровождения химиолучевого лечения рака СОПР на уровни ряда про- и противовоспалительных цитокинов.

### Материалы и методы.

**Обследуемый контингент.** Клинически и иммунологически обследовано 26 пациентов с гистологически верифицированным плоскоклеточным раком СОПР II–III стадии, средний возраст которых составил  $58 \pm 2,4$  года. Клинически оценивали общий и локальный статус пациентов, применяли современные методы визуализации.

Группу пациентов до лечения (2) методом простой рандомизации разделили на две равновеликие подгруппы 3 и 4: в третью группу вошли пациенты которые получали стандартную дистанционную  $\gamma$ -терапию в режиме динамического (3 фракции по 4 Гр, затем с разовой дозой 2 Гр, 5 раз в неделю до суммарной очаговой дозы 38–40 Гр) или традиционного фракционирования (5 фракций по 2 Гр, 5 раз в неделю до суммарной очаговой дозы 44 Гр) с применением радиомодификатора цисплатина в средней дозе от 6 до 100 мг/м<sup>2</sup> на 400 мл

физиологического раствора. Радиомодификатор цисплатин (6 мг/м<sup>2</sup>) применяли за 1 час до облучения, 1 раз в день.

В стандартную схему лечения 4 группы пациентов в качестве терапии сопровождения включили иммуномодулятор Полиоксидоний. Препарат вводили внутривенно капельно 6 мг 1 раз в сутки по схеме в 1, 2, 4, 7, 10, 13 дни. Курсовая доза 36 мг. Контролем служили здоровые лица, средний возраст 54,6±4,3 (1 группа).

**Материал для исследования.** Забор крови производили утром, из локтевой вены объемом 6 мл в вакуумную пробирку с K<sub>3</sub>EDTA объемом 9 мл, натошак всем пациентам до начала лучевой терапии (группа 2) и на 7–8 сутки от начала терапии (3,4 группы).

**Определение количества цитокинов.** Измерение уровня регуляторных цитокинов в крови TNF-α, INF-γ, IL-4, IL-6, IL-8 (пг/мл) с помощью тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» г. Новосибирск. Уровень стабильного конечного продукта окисления пероксинитрита-нитротирозина (нМ) с помощью тест-системы для ИФА (Nitrotyrosine, НВТ). Учет результатов производили на спектрофотометре «Multiscan Plus» (Финляндия) при соответствующей длине волны.

**Статистическая обработка материала.** Применяли пакет прикладных программ Statistica for Windows vers. 6.0. фирмы StatSoft Inc. (США), проводилось определение среднего значения (M) и стандартного отклонения (σ), сравнение групп производили с помощью критерия Манна-Уитни.

**Обсуждение и результаты.** Поскольку развитие любого иммунного ответа сопровождается активной секрецией цитокинов, обладающих плеотропными свойствами, представляет особый интерес определение уровней некоторых цитокинов и конечных стабильных метаболитов оксида азота (нитротирозин) у пациентов с плоскоклеточным раком СОПР до и после химиолучевой терапии (ХЛТ) и химиолучевой терапии с Полиоксидонием (ХЛТП), результаты определения которых представлены в таблице 1.

Анализ таблицы 1, показал отсутствие значимых изменений со стороны уровня TNF-α, во всех группах, однако после ХЛТП отмечен более высокий уровень данного цитокина в периферической крови, но в силу большого разброса показателей внутри группы, не имеющий достоверных отличий от других групп. В работе [6] показано, что Полиоксидоний способен в определенных концентрациях и дозозависимо стимулировать спонтанный и индуцированный синтез следующих цитокинов: IL1β, IL6, TNF-α, INF-γ, что лежит в основе противоинфекционной защиты организма. Уровень IL-6 был максимально высоким в группе до лечения и чуть ниже в группе пациентов после ХЛТП в сравнении со здоровыми лицами и показателями после ХЛТ без применения иммуномодулятора. Чрезмерно высокие темпы продукции провоспалительных цитокинов у пациентов с раком СОПР могут быть опасны в направлении развития системной цитокинемии и септических осложнений.

Таблица 1. Характеристика уровня цитокинов и нитротирозина до и после химиолучевого лечения

Группы	1 группа Здоровые n=23	2 группа До лечения n=26	3 группа После ХЛТ n=25	4 группа После ХЛТП n=25	p
	M±σ	M±σ	M±σ	M±σ	
TNF-α, пг/мл	6,4± 2,8	11,7± 3,4	7,4± 3,2	13,03± 5,3	-
INF- γ, пг/мл	16,8± 3,3	34,2± 6,3	13,3± 2,4	23,7± 4,8	0,01 1–2 0,02 2–3 0,001 3–4
IL-4, пг/мл	7,3 ±2,05	7,3± 1,5	6,47± 2,6	9,01± 2,16	-
IL-6, пг/мл	12,8± 3,2	27,8 ± 3,7	9,4± 2,6	24,8± 4,1	0,01 1–2 0,003 2–3 0,002 3–4
IL-8, пг/мл	158,3± 12,7	167,4± 16,5	156,5± 19,2	159,8± 25,7	-
Нитротирозин, нМ	30,1± 7,1	62,1 ±7,1	19,01± 4,07	28,04± 5,2	0,001 1–2 0,002 2–3 0,01 2–4

нений. Авторами [7] показано, что IL-6 обладает способностью подавлять образование провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , клетками моноцитарно-макрофагальной системы, тем самым предупреждая последствия цитокинемии. Полиоксидоний обладает свойствами влиять на синтез цитокинов, как провоспалительной, так и противовоспалительной направленности, что лежит в основе его иммуномодулирующего эффекта. Определение уровня маркерных цитокинов Th1 и Th2 лимфоцитов, в частности IL4 и IFN- $\gamma$  показало достоверное повышение IFN- $\gamma$  в группе пациентов до лечения, при этом соотношение IFN- $\gamma$  к IL4 в этой группе также было самым высоким в сравнении с контрольной группой и пациентами после ХЛТ, что отражает функциональную девиацию иммунного ответа в сторону Th1 клеток. Также, в группе пациентов после ХЛТП уровень иммунного интерферона значительно различался с группой ХЛТ, что позволяет предположить его непосредственное влияние на продукцию цитокинов. В работе [8] показана способность Полиоксидония усиливать гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) к Т-зависимым антигенам. ГЗТ является важным показателем функционального состояния клеточного иммунитета и четко коррелирует со способностью Т-лимфоцитов давать пролиферативный ответ на Т-антигены, а также со способностью продуцировать цитокины. Количество интерлейкина -4 среди изучаемых групп не имело достоверных различий. Также, не обнаружено достоверных различий между группами уровня хемокина IL-8, секреторного продукта активированных макрофагов, имеющего лишь тенденцию к повышению в группе пациентов до лечения. Биологические эффекты интерлейкина -8 реализуются в сфере повышения хемоаттракции нейтрофилов, усиления адгезивных свойств иммуноцитов и их активной экстравазации.

Количество нитротирозина- конечного стабильного продукта окисления пероксинитрита в группе пациентов до лечения было максимальным и достоверно отличалось от показателей других изучаемых групп. Повышение концентрации нитротирозина при раке СОПР, имеющего более длительный период полужизни, чем уровни нитратов и нитритов, является индикатором усиления продукции оксида азота и отражает степень

воспалительных изменений, индуцированных реактивными дериватами NO. После ХЛТ и ХЛТП уровень нитротирозина достоверно снизился в сравнении со 2 группой, при этом значимых изменений его уровня относительно контрольной группы не зафиксировано как в 3, так и в 4 группах.

Таким образом, нами установлено повышающее действие иммуномодулятора Полиоксидоний, используемого в качестве терапии сопровождения химиолучевого лечения рака СОПР, в отношении продукции ряда цитокинов, как провоспалительной, так и противовоспалительной направленности, что можно расценивать как положительный системный иммуномодулирующий эффект препарата. В качестве его позитивного влияния на Т звено иммунитета следует отметить наличие в группе ХЛТП функциональной девиации иммунного ответа в отношении Th1 хелперной популяции клеток.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пачес, А.И. Опухоли головы и шеи / А.И. Пачес.- М.: Медицина, 2000.- 480 с.
2. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность).- М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России. 2012.- С. 4-25.
3. Важенин, А.В. Повышение эффективности работы онкологической службы в Челябинской области / А.В. Важенин, Д.В. Доксов, А.С. Доможирова и др. // Рос. онкол. журн.- 2007.- № 5.- С. 42.
4. Зубова, С.Г. Молекулярные механизмы действия фактора некроза опухолей  $\alpha$  и трансформирующего фактора роста  $\beta$  в процессе ответа макрофага на активацию / С.Г. Зубова, В.Б. Окулов // Иммунология.- 2001.- № 5.- С. 18-22.
5. Новиков В.И. Иммуноterapia при злокачественных новообразованиях / В.И. Новиков, В.И. Карандашов, И.Г. Сидорович.- М.: Медицина, 2002.- 160 с.
6. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы: механизм действия и клинические применения / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология.- 2003.- Т. 24, № 4.- С. 196-203.
7. Saganuma M., Okabe S., Kurusu M., et al. Discrete roles of cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation // Int. J. Oncol.- 2002.- Vol. 20.- P. 131-136.
8. Ширшев С.В. Характеристика иммуномодулирующих эффектов Полиоксидония у детей, страдающих рецидивирующими обструктивными бронхитами / В.А. Лопатина, И.П. Корюкина, А.С. Иванова//Иммунология.-2000.-№ 5.- С.53-55.

## POLIOKSIDONY'S ROLE IN CHANGE OF LEVELS REGULATORY CITOKINOV AGAINST HIMIOLUCHEVA OF PLOSKOKLETOCHNOGO THERAPY OF THE CANCER OF THE MOUTH

Altman E. V.<sup>1</sup>, Chuksina T. Y.<sup>2</sup>, Vazhenin A. V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Stomatologic policlinic No. 5, <sup>2</sup>Klinikagbou VPO Southern Ural state medical university, <sup>3</sup>GBOU VPO Southern Ural state medical university, Chelyabinsk

The effect of immunomodulator Polioksidoniy used as the accompaniment chemoradiation therapy of cancer of the oral mucosa, the change of the quantitative characteristics of a number of pro-and anti-inflammatory cytokines. Polioksidoniya established stimulatory effect in respect of production of pro-and anti-inflammatory cytokines, which can be regarded as a positive systemic immunomodulatory effect of the drug.

*Key words: oral cancer, Polioksidoniy, cytokines.*

---

---

## УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОЛИВАЛЕНТНОЙ АЛЛЕРГИЕЙ

Ахмалтдинова Л. Л., Авдиенко О. В., Сорокина М. А.

*Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан*

Целью исследования стало мультиплексное исследование содержания цитокинов при поливалентной аллергии методом иммунофлуоресцентного xMap мультиплексного определения на ферромагнитных частицах. Было обследовано 59 человек контрольной группы, 49 пациентов с клинически-значимой сенсibilизацией к одному аллергену и 53 пациента с клинически-значимой полисенсibilизацией. Диагноз подтверждался анамнезом, кожными пробами, аллерген-специфическим IgE и общим IgE. В группе пациентов с моновалентной сенсibilизацией зафиксировано повышение интерлейкина-13. В группе с полисенсibilизацией наблюдается повышение уровня интерлейкинов Th2-ответа: интерлейкина-8, интерлейкина-9, совместно с повышением уровня провоспалительных цитокинов: интерлейкина-17, фактора некроза опухоли.

*Ключевые слова:* цитокины, поливалентная аллергия, ИЛ-17, ИЛ-9.

**Введение.** Несмотря на значительный прогресс в изучении патогенеза, в разработке новых методов диагностики и лечения, аллергия продолжает оставаться серьезной медико-социальной проблемой и может быть с полным правом отнесена к мультифакториальным заболеваниям. В последние десятилетия во всем мире наблюдается резкое увеличение больных с аллергопатологией [1,2].

Одновременно с ростом числа больных изменяется эпидемиология аллергических заболеваний, увеличивается полиморфизм проявлений, все большее значение для практической медицины приобретает поливалентная гиперсенсibilизация, сочетанные формы аллергических заболеваний. Механизмы повышенной

чувствительности отдельных индивидов остаются недостаточно изученными. Цитокины – многочисленная, неоднородная, универсальная группа биологически активных пептидных веществ, которые выступают в качестве внутриклеточных гормонов и регуляторов, главным образом, в иммунной системе [3]. Аллергия одно из тех состояний, к пониманию которого приблизились через изучение роли цитокинов. По современным представлениям контроль аллергического иммунного ответа тесно связан с Ил-4-зависимым Th2 клеточным иммунным ответом [4,5].

**Целью** исследования стало мультиплексное исследование содержания цитокинов при поливалентной аллергии.

**Материалы и методы:** Опытную группу составили 53 пациента (средний возраст 38,5 лет), имеющие в анамнезе клинические случаи с типичной клинической картиной аллергии (крапивница, ангионевротический отек, аллергический ринит, аллергический конъюнктивит), признаки оценивались после осмотра или опроса специалистом аллергологом. Признаками полиаллергии являлись проявления острых аллергических реакций на аллергены (такие как пыльцевые, пищевые, бытовые) не менее чем к 3 аллергенам. Для подтверждения диагноза использовали кожные пробы (в 54% случаев) и определение IgE к основным микстам (пищевые, пыльцевые, бытовые, клещевые миксты производства Вектор-Бест). Средний уровень общего иммуноглобулина Е составил в этой группе  $266,4 \pm 29,3$  МЕ/л. Группу сравнения составили 49 человек, у которых клинически значимая сенсibilизация указана в анамнезе для 1 аллергена (средний возраст 36,1 год). Средний уровень общего иммуноглобулина Е составил в этой группе  $240,4 \pm 36,3$  МЕ/л. Для подтверждения диагноза использовали кожные пробы (в 70% случаев) и определение аллерген-специфического IgE. Контрольная группа составила 59 человек (средний возраст 35,6 лет) с отсутствием клинических проявлений аллергии и уровнем общего иммуноглобулина Е менее 100 МЕ/л (средний уровень составил  $71,4 \pm 10,4$  МЕ/л). Критерием исключения из обследования было наличие острых аллергических проявлений на момент сдачи крови, а так же острые инфекционные или воспалительные процессы и хронические заболевания в стадии обострения.

Для определения уровня цитокинов была использована мультиплексная иммунофлуоресцентная технология BioPlex xMap с использованием наборов Био-рад [6]. В данное исследование вошло мультиплексное исследование следующих показателей Eotaxin, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-17, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-В, ИЛ-R, IP-10, Ил-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF, RANTES, TNF, VEGF.

Статистический анализ проводился непараметрическими методами, значимость различий между группами определялась с помощью непараметрического U критерия Манна-Уитни, из описательных статистик указаны в статье медиана и квартильный размах (Me и IQR).

При множественном сравнении уровня цитокинов выявлено, что в группе моноаллергии достоверно повышен уровень интерлейкина-13 (Me 3,72 пг/мл IQR 6,110, в контрольной группе Me 2,32 пг/мл IQR 6, в группе с поливалентной аллергией Me 2,55 пг/мл IQR 3,29), интерлейкина-1 (Me 1,30 пг/мл IQR 2,42 в контрольной группе Me 0,63 пг/мл IQR 0,77, в группе с поливалентной аллергии Me 0,66 пг/мл IQR 0,75) по сравнению с обеими группами. Наблюдается повышение уровня интерлейкина-8, повышение содержания растворимого рецептора интерлейкина 1, повышение содержания интерферона-гамма, однако из-за большой вариации показателя в группе, эти значения не достигли значимости.

В группе с полиаллергией значимо повышен уровень интерлейкина-17 (Me 5,3 пг/мл IQR 5,55, в контрольной группе 1,01 пг/мл IQR 3,63, в группе с моноаллергией Me 1,69 пг/мл IQR 5,23), интерлейкина-8 (153,4 пг/мл IQR 624,01, в контрольной группе 30,83 пг/мл IQR 270,37, в группе с моноаллергией 97,56 пг/мл IQR 271,2), интерлейкина-9 (Me 4,94 пг/мл IQR 6,9, в контрольной группе Me 1,78 пг/мл IQR 4,36, в группе с моноаллергией Me 1,19 пг/мл IQR 1,69), растворимого рецептора интерлейкина-1 (Me 16,9 пг/мл IQR 8,94, в контрольной группе 9,22 IQR 11,15, в группе моноаллергии 15,25 пг/мл IQR 13,8), фактора некроза опухоли (12,79 пг/мл IQR 8,98, при контрольных 9,41 пг/мл IQR 4,89, при группе аллергии 9,93 пг/мл IQR 5,49). Вместе с повышением уровня растворимого рецептора интерлейкина-1, достоверно падает уровень самого интерлейкина-1, по сравнению с группой моноаллергии (Me 0,66 пг/мл IQR 0,750, в контроле 0,63 пг/мл IQR 0,77, в группе с моноаллергией 1,30 пг/мл IQR 2,42). Полученные данные могут говорить о том, что при формировании полисенсibilизации цитокины Th2 начинают преобладать. Повышение уровня растворимого рецептора интерлейкина-1 носит компенсаторный характер, для снижения эффектов провоспалительного интерлейкина-1. Однако повышение провоспалительного фактора некроза опухоли вероятно определяет распространенность сенсibilизации и проаллергическую настроенность иммунной системы. Интерлейкин-17 опосредует хронизацию аллергического воспаления. Мы не выявили повышения классических медиаторов аллергического воспаления, таких как интерлейкин-4 и-5, однако тот факт, что нашей целью было исследование

пациентов с аллергией в течение ремиссии аллергических симптомов возможно это объясняет. Стоит отметить, при исследовании цитокинов методом с высокой чувствительностью и широким динамическим диапазоном наблюдается большая вариабельность содержания их в сыворотке.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богова А. В., Ильина Н. И., Лусс Л. В. Тенденции в изучении эпидемиологии аллергических заболеваний в России за последние 10 лет//Российский аллергологический журнал.– № 6.– 2008.– С 3–7.
2. Ильина Н. И. Эпидемия аллергии – в чем причина?// Российский аллергологический журнал.–2004.–№ 1.– С.37-41.
3. Симбирцев А. С. Классификация и биологические функции цитокинов// Цитокины и воспаление.–2004.– Т. 3-№ 2.– С.16-22.
4. Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation// Mol. Immunol.– 2002.– V.38 (12–13).– P.881-885.
5. Licona-Limón P., Kim L. K., Palm N. W., Flavell R. A.. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells// Nat. Immunol.–2013.– V.14 (6).– P.536-542.
6. Houser B. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview//Arch. Physiol. Biochem.– 2012.– V. 118 (4).– P.192-196.

### CYTOKINES LEVEL IN PATIENTS WITH POLYALLERGY

Akhmaltdinova L. L. Avdienko O. V. Sorokin M. A.

*Karaganda State Medical University*

The aim of study was to study multiplex cytokines level with polyallergy by immunofluorescence xMap multiplex determination in beads. 59 patient were examined in the control group, 49 patients with clinically significant sensitization to one allergen and 53 patients with clinically – significant polisensibilization. The diagnosis was confirmed by history, skin tests, allergen-specific IgE and total IgE. In patients with mono- sensibilization detected increase of interleukin-13. In patient with polisensibilization observed with increasing levels of Th2- response interleukins: IL –8, IL –9, increased levels of proinflammatory cytokines IL –17, TNF- $\alpha$ .

*Keywords: cytokine, polyvalent allergy, IL-17, IL-9*

## УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АЛЛЕРГИЕЙ К КЛЕЩАМ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ

Ахмалтдинова Л. Л., Газалиева М. А.,

*Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан*

Целью исследования стало изучение расширенного цитокинового статуса у лиц с клинически-значимой аллергией к клещам домашней пыли. Опытную группу составили 42 человека с клиническими проявлениями аллергической реакции на домашнюю пыль. Контрольная группа составила 41 человек с отсутствием клинических проявлений аллергии. Диагноз подтверждали анамнезом, уровнем аллерген-специфического IgE, общим IgE. Для определения уровня цитокинов была использована мультиплексная иммунофлуоресцентная технология BioPlex. Исследование выявило значимое повышение уровня цитокинов Т-хелперов 2 типа и хемокинов: эотаксина, фактора роста фибробластов, ИЛ-9 и RANTES у пациентов с клинически значимой сенсибилизацией к клещам домашней пыли в период ремиссии, по сравнению с группой без аллергии.

*Ключевые слова:* цитокины, клещи домашней пыли, ИЛ-9, ИЛ-8, эотаксин, rantes.

**Введение.** Значительное увеличение частоты развития аллергических заболеваний делает изучение механизмов ее развития крайне актуальной проблемой. Механизмы повышенной чув-

ствительности отдельных индивидов остаются недостаточно изученными. Несомненную роль в этом играют особенности функционирования звеньев иммунного ответа и взаимодействия

как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, что и стало целью данного проекта. Цитокины – многочисленная, неоднородная, универсальная группа биологически активных пептидных веществ, которые выступают в качестве внутриклеточных гормонов и регуляторов, главным образом, в иммунной системе. Именно коктейль из цитокинов, синтезированный активированными отдельными клетками разных популяций, создает микроокружение и суммарную индивидуальную реакцию иммунной системы на то или иное воздействие. На данный момент не описаны все мишени и все эффекты каждого из изученных цитокинов в развитии разных патологических состояний [1].

**Целью** исследования стало изучение расширенного цитокинового статуса у лиц с клинически-значимой аллергией к клещам домашней пыли. Опытную группу составили

42 человека (средний возраст 26,5 лет) с клиническими проявлениями аллергической реакции домашнюю пыль (атопический дерматит, конъюнктивит, ринит) и уровнем аллерген-специфического иммуноглобулина Е к миксту аллергенов «Клещи домашней пыли» выше 0,35МЕ/л, средний уровень общего иммуноглобулина Е 123±14,0 МЕ/л. Кровь была забрана в период ремиссии. Контрольная группа составила 41 человек (средний возраст 29,6 лет) с отсутствием клинических проявлений аллергии, уровнем общего иммуноглобулина Е менее 100 МЕ/л (средний уровень составил 59,3±12,7МЕ/л), и уровнем аллерген-специфического иммуноглобулина Е к аллергенам микста «Клещи домашней пыли» ниже уровня чувствительности метода. Уровень общего и аллерген-специфического иммуноглобулина определяли методом хромогенного ИФА (наборы произ-

Таблица 1. Интерлейкиновый статус у пациентов с моноаллергией и полиаллергией

Цитокины, пг/мл	Контрольная группа, М±m	Аллергия к домашней пыли. М±m
Эотаксин	23,39±14,2	37,65±11,3*
FGF	7,01±1,8	9,02±2,9*
G-CSF	5,70±1,9	5,65±2,3
GM-CSF	6,07±2,4	6,85±2,6
ИФН	70,86±36,5	70,42±45,2
ИЛ-12	4,95±1,0	7,06±1,6
ИЛ-13	3,42±2,6	3,19±2,10
ИЛ-15	0,19±1,3	0,46±0,98
ИЛ-17	3,42±9,2	5,03±7,4
ИЛ-2	3,54±3,1	3,51±2,6
ИЛ-4	0,52±0,58	0,67±0,46
ИЛ-5	1,05±0,88	1,95±0,91
ИЛ-6	5,61±2,12	3,75±2,10
ИЛ-7	22,39±8,0	28,57±5,1
ИЛ-8	322,28±152,1	540,86±211,9
ИЛ-9	3,49±3,6	6,03±3,0*
ИЛ-1	1,39±3,0	1,88±1,92
ИЛ-1Ra	13,95±11,3	17,47±12,4
IP-10	1128,71±1005,2	1039,43±895,25
ИЛ-10	254,00±110,1	237,58±98,62
MCP-1	10,57±8,2	8,96±8,6
MIP-1a	14,47±8,2	12,44±8,9
MIP-1b	69,19±67,4	71,14±52,9
PDGF	8653,76±3210,4	8307,55±2500,4
RANTES	12666,32±6520,4	16198,15±4200,6*
ФНО	12,96±8,2	13,74±5,6
VEGF	50,41±36,4	47,52±41,3

\* p<0.05, критерий Стьюдента

водства Вектор-Бест) Для определения уровня цитокинов была использована мультиплексная иммунофлуоресцентная технология Bioplex xMap с использованием наборов Био-рад [2]. В данное исследование вошло мультиплексное исследование следующих показателей Эотаксин, FGF, G-CSF, GM-CSF, ИФН, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-17, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-В, ИЛ-R, IP-10, ИЛ-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF, RANTEC, ФНО, VEGF. Использован параметрический критерий Стьюдента.

Результаты расширенного спектра цитокинов у пациентов с аллергией к клещам домашней пыли, по сравнению с контрольной группой представлены в таблице 1.

Исследование выявило значимое повышение уровня цитокинов Т-хелперов 2 типа и хемокинов: эотаксина, фактора роста фибробластов, ИЛ-9 и RANTEC у пациентов с клинически значимой сенсibilизацией к клещам домашней пыли в период ремиссии, по сравнению с группой без аллергии. Эотаксин человека – хемокин полипептидной природы, селективный для эозинофилов. Эотаксин играет важную роль в стимуляции локального рекрутинга эозинофилов из кровеносных микрососудов в участки аллергического воспаления ткани [3]. RANTEC (CCL5) отнесен к хемокинам. Является хемотаксичным фактором для активации созревания, миграции, рекрутинга и хоуминга, привлечения лейкоцитов в очаг локального воспаления, специфичен для привлечения Т-лимфоцитов, базофилов, эозинофилов. Тем самым принимает участие в развитии острого и хронического аллергического воспаления, в том числе при астме. Есть данные о связи полиморфизма CCL5 и риска развития аллергии в разных популяциях [4]. FGF -Фактор роста фибробластов. Секретируется эндотелием и субэндотелиальным матриксом сосудов. Поддерживает ангиогенез, ремоделирование тканей после повреждения или ишемии. Фактор роста

фибробластов действует синергично с эотаксином и может принимать участие в патогенезе атопии у пациентов с астмой и дерматитом [5]. Интерлейкин-9 стимулирует Th9, а так же стимулирует пролиферацию тучных клеток, бокаловидных клеток и муцин-продуцирующих клеток дыхательных путей. ИЛ-9 относят к цитокинам Th2-ответа. Его синтез активируется под действие ИЛ-4, и супрессируется под действием IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ . ИЛ-9 является важнейшим цитокином, участвующим в аллергическом иммунном ответе. Так в частности им опосредовано изменение эпителия дыхательных путей при атопии и астме, гиперплазия муцин-образующих клеток, изменения свойства слизи, эозинофильная инфильтрация дыхательных путей [6].

Таким образом, расширенное скринирование фонового цитокинового статуса у пациентов с бытовой аллергией может помочь раскрыть особенности формирования аллергического воспаления при разных видах сенсibilизации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2008, 552с.
2. Houser B. Bio-Rad's Bio-Plex<sup>®</sup> suspension array system, xMAP technology overview Arch Physiol Biochem, 2012, V. 118 (4), P.192-196.
3. Erin E. M., Williams T. J., Barnes P. J., Hansel T. T. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease Curr Drug Targets Inflamm, Allergy, 2002, Vol.1 (2), P.201-214.
4. Marques R. E., Guabiraba R., Russo R. C., Teixeira M. M.. Targeting CCL5 in inflammation Expert Opin Ther Targets, 2013, Vol. 3, P.1-22.
5. Airway angiogenesis in patients with rhinitis and controlled asthma Kristan S. S., Malovrh M. M., Silar M., Kern I., et al. Clin Exp Allergy, 2009, Vol.39 (3), P.354-360.
6. Zhao P., Xiao X., Ghobrial R. M., Li X. C. IL-9 and Th9 cells: progress and challenges Int Immunol 2013, – Vol.25 (10), P.547-551.

#### CYTOKINE LEVELS IN PATIENTS WITH ALLERGY TO HOUSE DUST MITES

Akhmaltdinova L. L. Gazalievа M. A.,

Karaganda State Medical University

Aim of this study was to investigate levels cytokines in patients with house dust mites allergy. Experimental group consisted of 42 people with clinical manifestations of allergic reaction house dust. The control group consisted of 41 people with the absence of clinical manifestations of allergy. The diagnosis was confirmed by history, the level of allergen-specific IgE, total IgE. Was used multiplex immunofluorescence technology xMap on Bioplex. The study revealed a significant increase in the level of cytokines by T -helper type 2 and chemokines: eotaxin, FGF, IL- 9 and RANTEC in patients with house dust mites allergy in remission.

*Keywords: cytokine, pincers of a house dust, IL-9, IL-8, эотаксин, rantec.*

## ВЛИЯНИЕ ИММУНОКОРРЕКЦИИ БЕТАЛЕЙКИНОМ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ СЛЮНЫ У ПАЦИЕНТОВ С ОСЛОЖНЕННЫМИ ПЕРЕЛОМАМИ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ

Бережная Е. С., Латюшина Л. С., Долгушин И. И.

ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава РФ, Челябинск, Россия

Обследовано 114 пациентов с осложненными переломами нижней челюсти, проведена оценка функциональной активности нейтрофилов слюны и выявлен ряд особенностей, в зависимости от схем иммунокорректирующей терапии. Ключевые слова: перелом нижней челюсти, нейтрофилы, фагоцитоз, иммунокоррекция.

*Ключевые слова:* перелом нижней челюсти, нейтрофилы, фагоцитоз, иммунокоррекция.

**Введение.** В структуре общей заболеваемости челюстно-лицевой области, травмы занимают одно из первых мест и составляют по данным различных авторов от 21% до 40%. К сожалению, сохраняется тенденция к росту травматизма. **Одновременно с ростом числа травм, отмечается увеличение количества тяжелых повреждений, числа осложнений и неблагоприятных исходов лечения.** Наиболее часто встречаются переломы нижней челюсти – свыше 80% от всех переломов лицевого скелета [1]. При традиционных методах лечения практически в 30% случаев развиваются различные посттравматические, чаще всего воспалительного характера осложнения, которые приводят к длительной нетрудоспособности, а иногда к инвалидности [2]. Одним из перспективных методов изучения данной проблемы является исследование локального иммунитета полости рта и способов коррекции выявленных нарушений.

**Цель исследования.** Изучить показатели функциональной активности нейтрофилов слюны у пациентов с осложненными переломами нижней челюсти и оценить влияние на них различных схем иммунотерапии бета-лейкином в процессе комплексного лечения.

**Материалы и методы.** В период с 2010 г. по 2013 г. проводилось краткосрочное, проспективное сравнительное, «простое слепое» рандомизированное исследование на базе отделения челюстно-лицевой хирургии ГБУЗ «Областная клиническая больница № 1» г. Челябинска. 114 пациента с осложненными пе-

реломами нижней челюсти были разделены на три группы в зависимости от схем лечения по принципу динамической рандомизации: группа сравнения (n=35; мужчин – 32, женщин – 3; средний возраст 30 [26;36] лет); 1-я основная группа (n=35; мужчин – 33, женщин – 2; средний возраст 26 [22;32] лет); 2-я основная группа (n=34; мужчин – 34, женщин – 0; средний возраст 24 [21;30] года). Критерии отбора пациентов: наличие одиночного либо двойного перелома нижней челюсти, с локализацией в пределах зубного ряда (ангулярный отдел, ментальный отдел, тело нижней челюсти), осложненного нагноением костной раны; возраст от 18 до 74 лет; информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения из исследования: наличие тяжелой соматической патологии; онкологические заболевания; аутоиммунные заболевания; гормональные нарушения; беременность и лактация; отказ пациента от участия в исследовании. Диагноз ставился в соответствии с международной статистической классификацией болезней (МКБ-10, 1995). Иммобилизация отломков проводилась хирургическими (n=29) (металлостеосинтез с использованием титановых мини-пластин) или ортопедическими (n=75) методами (шинирование с применением стандартных ленточных шин Васильева либо бимаксиллярных проволочных шин Тигерштедта). В каждой из 3-х групп больных были выделены подгруппы, в зависимости от способа иммобилизации отломков: группа сравнения – n=25 с ортопе-

дическими методами фиксации и  $n=10$  с хирургическими; соответственно в 1-й основной группе –  $n=25$  и  $n=10$  и во 2-й основной группе –  $n=25$  и  $n=9$ . Больные в группах были сопоставимы по полу, возрасту, локализации перелома и способу иммобилизации. Пациенты всех групп получали базовый комплекс лечебных мероприятий [3]. При лечении пациентов группы сравнения применялся традиционный базовый комплекс лечебных мероприятий; больным 1-й основной группы, помимо базовой терапии, местно применяли препарат «Колетекс-бета» (гель с рекомбинантным ИЛ-1 $\beta$ , регистрационное удостоверение № ФСР 2011/12044 от 30.09.2011 г., ООО «Колетекс», Москва); пациентам 2-й основной группы базовое лечение дополнялось парентеральным введением беталейкина (препарат рекомбинантного ИЛ-1 $\beta$  человека производства ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, СПб., регистрационный номер 97/51/6) [4]. В группу контроля ( $n=14$ ) вошли клинически здоровые, с санированной полостью рта добровольцы, сопоставимые по полу и возрасту с пациентами. Исследование функциональной активности нейтрофилов слюны проводилось у пациентов с ортопедическими методами иммобилизации. Для изучения показателей функциональной активности нейтрофилов полости рта, производили забор секрета ротовой полости на 2-е сутки и на 10-12 сутки. Сбор слюны (3–5 мл) проводили в течение 10 минут через 1 час после еды и после предварительного полоскания полости рта водой. Полученную пробу центрифугировали при 1500g в течение 20 минут для удаления посторонних включений [5]. Оценивали фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов полости рта, их внутриклеточный кислород-зависимый метаболизм и лизосомальную активность. Изучение способности нейтрофилов к захвату частиц проводили по методу Фрейдлин И. С. [6]. Исследование внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов осуществляли при помощи НСТ-теста, который проводили в двух вариантах – спонтанном и индуцированном (стимулированном). Постановку метода осуществляли в модификации А. Н. Маянского и М. Е. Виксмана (1979) [7]. Так же рассчитывали функциональный резерв нейтрофилов (ФР), который определяли как соотношение между коэффициентами интенсивности реак-

ции НСТ – индуцированного и НСТ – спонтанного тестов. Данные, обработанные методами вариационной статистики, выражали в виде медианы и процентилей ( $M [Q1; Q2]$ ),  $n$  – количество наблюдений в выборке. О достоверности различий судили при помощи непараметрических критериев Вилкоксона, Манна-Уитни. Данные считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Результаты исследования обрабатывались на ПЭВМ с использованием пакета прикладных программ «BioStat».

**Результаты и обсуждение.** Результаты изучения функциональной активности нейтрофилов полости рта у пациентов с осложненными переломами нижней челюсти представлены в таблице 1. Анализ полученных данных выявил, что исходно у всех пациентов было зарегистрировано повышенное содержание жизнеспособных лейкоцитов и в динамике различных схем лечения, статистически значимо с контролем, этот показатель сохранялся у больных, получавших местную иммунотерапию рекомбинантным ИЛ-1 $\beta$ . Известно, что введение данного иммунопрепарата сопровождается признаками активации иммунной системы на системном и местном уровнях. Иммунный ответ реализуется через повышение системной продукции ИЛ-8 и местной ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-8, активацию клеточных и гуморальных факторов в очаге воспаления и проявляется в виде кратковременного обострения воспалительного процесса, о чем, вероятно, и может свидетельствовать высокий показатель уровня лейкоцитов у пациентов, получавших беталейкин. Изучение показателей фагоцитарной активности, интенсивности и фагоцитарного числа нейтрофилов слюны не выявило статистически значимых различий с контролем в различные сроки лечения. Однако отмечена тенденция к увеличению данных показателей в группе с парентерально вводимым беталейкином. Наиболее значимые сдвиги в изучаемых показателях были определены при исследовании кислород-зависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов полости рта. У всех больных исходно высокие значения активности и интенсивности НСТ-спонтанной реакции в динамике различных схем лечения снижались к контролю. Однако, интенсивность НСТ-индуцированного теста нейтрофильных лейкоцитов у больных, местно пролеченных беталейкином, в динамике лечения была ста-

стически выше, чем у пациентов 2-й основной группы, что может свидетельствовать о более высоком биоцидном потенциале изучаемых клеток, а значит возможности к значительной генерации активных форм кислорода и перекисей, что способствует деконтаминации в зоне перелома нижней челюсти. У пациентов всех групп на 2-е сутки лечения был отмечен низкий показатель функционального резерва нейтрофилов, что может свидетельствовать об исходной гипореактивности бактерицидной системы. Отсутствие статистически значимого роста данного показателя на фоне традиционного лечения осложненных переломов нижней челюсти у больных группы сравнения, вероятно, говорит о низкой способности нейтрофильных лейкоцитов отвечать на дополнительную стимуляцию усилением процессов дыхания и образования бактерицидных ферментов и, в свою очередь, создаются предпосылки для сохранения бактериальной флоры в зоне перелома и трансформации нагноения

костной раны в травматический остеомиелит. У пациентов же основных групп отмечено повышение функционального резерва в процессе лечения, что демонстрирует адекватность резервных возможностей нейтрофилов локального очага после проведенной иммунотропной терапии беталейкином.

**Выводы.** Проведенное исследование выявило изменения в показателях функциональной активности нейтрофилов полости рта у пациентов с осложненными переломами нижней челюсти. В процессе комплексного лечения с включением различных схем иммунотерапии беталейкином отмечалось восстановление ряда изучаемых показателей.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шаргородский А. Г. Травмы мягких тканей и костей лица. «ГЭОТАР-МЕД», Москва 2004, 207.
2. Тельных Р. Ю. Использование биологически активных препаратов в профилактике осложнений при лечении больных с открытыми травматиче-

Таблица 1. Функциональная активность нейтрофилов слюны у пациентов с осложненными переломами нижней челюсти

Показатели местного иммунитета	Группа сравнения n = 25		1-я основная группа n = 25		2-я основная группа n = 25		Группа контроля n = 14
	2 сутки	10-12 сутки	2 сутки	10-12 сутки	2 сутки	10-12 сутки	
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	18,95 [11,8;32,8] # p=0,01	13,8 [9,6;20,9]	20,25 [13,1;32,8] # p=0,002	17,75 [10,4;35,9] # p=0,01	19,75 [16,2;28,7] # p=0,002	10,75 [5,7;18,5]	13,6 [4,7;15,6]
ФАН, %	42 [31;52]	44 [38;56]	40 [31;52]	43 [32;56]	42 [34;58]	50 [44;54]	44 [40;50]
ИФН, у.е.	1,11 [0,79;1,62]	1,2 [0,96;1,57]	1,07 [0,69;1,62]	1,13 [0,99;1,79]	1,2 [0,86;1,77]	1,4 [1,11;1,72]	1,23 [0,99;1,56]
ФЧ, %	2,7 [2,3;3,2]	2,65 [2,4;3]	2,65 [2,3;3,2]	2,7 [2,2;3,6]	2,7 [2,3;3,4]	3,05 [2,6;3,2]	2,8 [2,6;3,1]
НСТ спонт. акт., %	22 [16;35] # p=0,0006	14 [8;20] * p=0,01	22 [16;34] # p=0,004	14 [10;24] * p=0,02	22 [16;34] # p=0,0005	13 [8;17] * p=0,002	12 [10;18]
НСТ спонт. интенсив., у.е.	0,23 [0,16;0,4] # p=0,03	0,17 [0,08;0,22]	0,23 [0,18;0,4] # p=0,03	0,15 [0,12;0,26]	0,25 [0,18;0,5] # p=0,01	0,14 [0,08;0,18] * p=0,001	0,12 [0,1;0,22]
НСТ индуцир. акт., %	25 [16;40]	24 [12;34]	25 [16;32]	28,5 [20;36]	28 [12;40]	22 [16;30]	22 [14;28,5]
НСТ индуцир. интенсив., у.е.	0,32 [0,16;0,44]	0,26 [0,14;0,4]	0,32 [0,16;0,42]	0,36 [0,22;0,48] ^ p=0,03	0,36 [0,14;0,52]	0,23 [0,16;0,34] * p=0,04	0,24 [0,16;0,31]
ФР, у.е.	1,2 [1,03;1,6] # p=0,0025	1,49 [1,19;2,25]	1,1 [1;1,57] # p=0,0004	1,8 [1,2;2,3] * p=0,01	1,2 [1;1,7] # p=0,001	1,9 [1,3;2,5] * p=0,007	1,6 [1,5;1,8]

Примечание: непараметрические критерии Вилкоксона, Манна-Уитни;

\* – статистическая значимость различий внутри группы (по срокам лечения),

# – статистическая значимость различий с группой контроля,

^ – статистическая значимость различий между группами 1-й и 2-й основной, сроки соответствуют.

- скими переломами нижней челюсти. Стоматология 2008, 4, 56-58.
3. Безруков В. М., Робустова Т. Г. Руководство по хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Медицина, Москва 2000, Т. 1, 776.
  4. Мезенцева Е. А. Состояние иммунной системы и влияние на неё бета-лейкина у больных с переломами трубчатых костей в начальных периодах травматической болезни. Автореферат диссертации кандидат. мед. наук. Челябинск 2001, 23.
  5. Долгушин И. И. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. РАМН, Москва 2009, 124.
  6. Фрейдлин. И. С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека. Наука, Ленинград 1986, 37.
  7. Маянский, А. Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: методические рекомендации. Казань 1979, 11.

### THE INFLUENCE OF IMMUNOCORRECTION BETALEUKIN ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS SALIVA OF PATIENTS WITH COMPLICATED MANDIBULAR FRACTURES.

Berezhnaya E. S., Latyushina L. S., Dolgushin I. I.

The study involved 114 patients with complicated mandibular fractures, the estimation of functional activity of neutrophils saliva and identified a set of features, depending on the schemes of immunocorrective therapy. Key words: mandibular fracture, neutrophils, phagocytosis, immunocorrection.

*Key words: mandibular fracture, neutrophils, phagocytosis, immunocorrection.*

### ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДА ГМ-КСФ ПРИ РЕПАРАТИВНО-ПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ШЕЙКИ МАТКИ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Гольцова И. А., Зуева Е. Б., Зурочка А. В.

*Лаборатория иммунологии воспаления ФБГУН института Иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия*

Были изучены эффекты синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на цитологию мазков цервикального канала и бактериальное обсеменение влагалища и шейки матки в течение репаративно-пластических процессов шейки матки после проведения петлевой электроэксцизионной процедуры-иссечения аномальной ткани шейки у женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN1, CIN2). Исследования показали, что при назначении 40 мкг/мл синтетический пептид оказывал выраженное репаративное действие на эпителий шейки матки после проведенной электроэксцизии, при этом значительно улучшалась цитологическая картина и снижалась обсемененность влагалища и шейки матки патогенными и условно патогенными микроорганизмами. Применение препарата ускоряли процессы заживления примерно в 2 раза (к 10 суткам, в контроле 20-22 сутки), при этом было отмечено отсутствие таких осложнений, как кровотечение, стеноз цервикального канала и снижение количества отделяемого с раневой поверхности.

*Ключевые слова:* Синтетический пептид, ГМ-КСФ, электроэксцизия, шейка матки, репарация.

**Введение.** Ежегодно в мире определяется более 450000 новых случаев заболевания раком шейки матки, причем четко прослеживается рост заболеваемости среди женщин в возрасте от 29 до 40 лет.

В настоящее время рак шейки матки занимает первое место среди гинекологического рака и второе после рака молочных желез, как по частоте, так и по смертности у женщин в возрасте до 50 лет. Проведенные эпидемио-

логические исследования свидетельствуют о том, что каждая четвертая женщина имеет патологию шейки матки, причем у 20% небеременных и у 40% беременных диагностируется предраковое состояние – дисплазия шейки матки (CIN1 и CIN2).

В тоже время рак шейки матки – заболевание, не возникающее просто так, на фоне общего благополучия, а начинается с развития предраковых состояний которые, в свою очередь, развиваются на фоне таких заболеваний, как эрозия шейки матки или CIN1.

Цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN), является одним из самых распространенных предраковых заболеваний женской репродуктивной системы. CIN не имеет характерной клинической картины. Основным методом диагностики остаётся гистологическое исследование шейки матки. CIN1 и CIN2 в основном наблюдаются у женщин в возрасте 24-27 лет, CIN3-35-42 лет. У молодых женщин диспластические изменения эпителия располагаются преимущественно на экзоцервиксе, в зоне трансформации, после 40 лет – в нижней трети цервикального канала, при этом патологический процесс может быть изолированным или с одновременным поражением и влагалищной части шейки матки.

Цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN) этот термин применяется с 1975 года, ранее называлась дисплазия. Данное состояние является предраковым процессом. Дисплазия – это морфологическое понятие и представляет собой атипию (нарушение дифференцировки клеток и структурных особенностей эпителиального пласта, пролиферация клеточных элементов, утрата полярности) клеток среднего и базального слоя эпителия шейки матки. При этом не наблюдаются изменения в поверхностном слое и строме, однако нарушается слоистость. Диагноз может быть поставлен только при цитологическом или гистологическом исследовании. Под неоплазией понимается рост морфологически ненормальных клеток, характеризующихся более коротким жизненным циклом, быстрее делящихся. Эти клетки и являются основой роста будущей опухоли.

Чаще всего эти состояния вызывают вирусы высокого онкогенного риска, одним из которых является ВПЧ. Временной интервал трансформации ВПЧ в (CIN) и инвазивный рак шейки матки составляет около 10 лет.

Распространение генитальной папилломавирусной инфекции, происходит из-за изменения стереотипа сексуального поведения женщин, отсутствия культуры здорового образа жизни (раннее начало половой жизни, ранние первые роды, частая смена половых партнеров, венерические заболевания). Важными моментами, способствующими инфицированию, являются урогенитальная инфекция, злоупотребление алкоголем, курение, иммунодефициты [1, 2].

Накопленные экспериментальные, эпидемиологические и клинические данные свидетельствуют о том, что рак шейки матки (РШМ) – первый выявленный тип рака, ассоциированный с ВПЧ, и профилактика его базируется на своевременном обнаружении и лечении предраковых патологических процессов.

Многообразие используемых методов лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) каждый раз ставит перед гинекологом проблему оптимального выбора, основанного на данных клинических, кольпоскопических и морфологических исследований, с учетом возраста пациентки, состояния ее менструальной и генеративной функций, показаний и противопоказаний при назначении каждого метода, его эффективности и атравматичности.

На сегодняшний день все методы лечения (CIN), согласно Я. В. Бохману [3], можно условно разделить на два вида: деструктивные, т.е. разрушающие патологическую ткань шейки матки (диатермокоагуляция, криодеструкция, лазерная вапоризация), и хирургические, удаляющие патологическую ткань шейки матки (ножевая, лазерная, электрическая и радиоволновая эксцизия). Побочными эффектами этих видов лечения являются кровотечения, эндометриоз, травматизация подлежащих тканей с образованием грубых рубцов, стенозов и стриктур цервикального канала.

Лечение дисплазии, как и любого другого заболевания ШМ, должно быть комплексным и включать в себя как хирургическое, так и лекарственное воздействие на организм.

Лечебные мероприятия должны планироваться индивидуально и быть направлены на ликвидацию воспалительного процесса ШМ и влагалища, удаление патологически измененной ткани, стимуляцию регенерации многослойного плоского эпителия и восстановление местного иммунного статуса.

Наиболее широко применяемой методикой ведения женщин с дисплазией ШМ является петлевая электроэксцизионная процедура-иссечение аномальной ткани шейки матки электропетлей.

Главным достоинством данной методики является возможность тотальной гистологической оценки всего удаленного фрагмента шейки матки, но у этого метода есть и недостатки описанные ранее.

Процедура эксцизии в зависимости от объема удаленной части шейки может оказывать влияние на репродуктивную функцию, что немаловажно при лечении женщин репродуктивного возраста.

Все это и послужило основанием для поиска других, более щадящих методов ведения пациентов в постоперационном периоде.

Одним из таких подходов может быть применение новых препаратов, обладающих одновременно иммуностимулирующими, антибактериальными и репаративными свойствами, как недавно открытый синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ [4, 5, 6, 7].

В исследование были включены 47 женщин с дисплазией шейки матки 1, 2 и 3 ст. в возрасте от 21 до 44 лет, которым было показано хирургическое лечение.

Хирургическое лечение проводилось с использованием высокочастотного радиохирургического прибора «Сургитрон» (производство USA). Для лечения всех пациенток был выбран метод петлевой эксцизии объемом в пределах здоровых тканей.

Перед проведением хирургического лечения – радиоволновой эксцизии ШМ – все пациентки прошли обследование: сбор инфекционного, гинекологического и аллергического анамнеза, а так же было поведено бактериоскопическое, онкоцитологическое, кольпоско-

пическое, молекулярно-биологическое (ПЦР на ВПЧ, хламидии, уреоплазму и микоплазму) исследование.

После местного применения раствора синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ в разведении 40 мкг/мл в послеоперационном периоде у 15 женщин с CIN1 (60%) и у 10 с CIN2 (40%) были проведены исследование обзорный мазок на 7 сутки и бак.посев на 30 сутки и при этом были получены следующие результаты. Группа контроля состояла из 16 женщин с CIN1 (53,3%) и 14 женщин с диагнозом CIN2 (46,6%).

Как видно из таблицы 1 у женщин с CIN1 и CIN2 после лечения синтетическим пептидом активного центра ГМ-КСФ в разведении 40 мкг/мл при микроскопии было отмечено изменения следующих показателей: снижение количества слущенного эпителия, снижение эритроцитов и уменьшалось количество слизи. Все это отмечалось при значительном увеличении количества лейкоцитов (преимущественно нейтрофилов).

Проведенное бактериологическое исследование показало (таблица 2), что на 30 сутки после операционного воздействия и лечения препаратом отмечается значительные изменения вагинальной микрофлоры у женщин с CIN1 и CIN2. После лечения пептидом у женщин практически до нормы восстанавливалась нормальная микрофлора (лактобактерии, бифидобактерии, бактероиды) и значительно уменьшалась обсемененность условно-патогенной микрофлорой в первую очередь кокковой флоры, гарднерелл, микоплазм и клостридий по сравнению с группой находящейся на традиционном лечении. Возможно, такая нормализация микрофлоры связана с одной стороны с антибактериальными эффектами пептида, а с другой усилен-

Таблица 1. Изменение показателей в обзорном мазке у женщин после применения синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ в разведении 40 мкг/мл.

Наименование	Лечение традиционное (n=30)	Лечение с применением синтетического пептида (n=25)
Плоский эпителий к-во.в п/з	25-35	12-15
Эритроциты к-во в п/з	10-12	3-5
Лейкоциты к-во в п/з	24-35	10-20
Флора	Смешанная, обильная, преимущественно кокки (+)	Смешанная, умеренная, палочка Дедерляйна
Слизь	++	+

Таблица 2. Изменение показателей в бакпосеве у женщин после применения синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ в разведении 40 мкг/мл.

Микроорганизмы	Норма	Лечение традиционное (n=30)	Лечение с применением синтетического пептида (n=25)
Лактобактерии	10 <sup>9</sup>	2,2±0,12x10 <sup>6</sup>	*3,4±0,16x10 <sup>9</sup>
Бифидобактерии	10 <sup>7</sup>	1,6±0,09x10 <sup>5</sup>	*2,4±0,12x10 <sup>8</sup>
Бактероиды	10 <sup>5</sup>	1,4±0,08x10 <sup>4</sup>	*1,3±0,07x10 <sup>5</sup>
Грибы рода Кандида	10 <sup>4</sup>	1,6±0,09x10 <sup>5</sup>	*1,6±0,08x10 <sup>3</sup>
Энтерококки	10 <sup>5</sup>	1,3±0,07x10 <sup>6</sup>	*1,9±0,08x10 <sup>4</sup>
Коринебактерии	10 <sup>7</sup>	2,3±0,09x10 <sup>7</sup>	1,4±0,09x10 <sup>7</sup>
Кишечная палочка (эшерихия)	10 <sup>4</sup>	2,2±0,12x10 <sup>5</sup>	*2,4±0,11x10 <sup>4</sup>
Клостридии	10 <sup>2</sup>	1,6±0,09x10 <sup>4</sup>	*1,4±0,14x10 <sup>2</sup>
Фузобактерии	10 <sup>3</sup>	1,8±0,08x10 <sup>4</sup>	*2,8±0,11x10 <sup>3</sup>
Гарднереллы	10 <sup>5</sup>	1,2±0,06x10 <sup>7</sup>	*3,2±0,12x10 <sup>4</sup>
Мобилинкус	10 <sup>2</sup>	2,4±0,13x10 <sup>4</sup>	*2,2±0,11x10 <sup>2</sup>
Микоплазма	10 <sup>3</sup>	1,3±0,07x10 <sup>4</sup>	*1,1±0,05x10 <sup>2</sup>
Пептострептококки	10 <sup>4</sup>	1,4±0,12x10 <sup>7</sup>	*1,2±0,07x10 <sup>3</sup>
Стафилококки	10 <sup>4</sup>	2,2±0,09x10 <sup>6</sup>	*1,6±0,08x10 <sup>3</sup>
Стрептококки	10 <sup>5</sup>	1,4±0,06x10 <sup>5</sup>	*1,4±0,08x10 <sup>4</sup>

Примечание \*p<0,05 при сравнении групп с лечением и без лечения

ной рекрутацией гранулоцитов, обладающих высоким антибактериальным потенциалом и в первую очередь в отношении кокковой и условно-патогенной грамотрицательной флоры. Такое комбинированное воздействие способствует более быстрому очищению эпитопа от патогенной и условно-патогенной флоры, которая увеличивается в постоперационном периоде у женщин после электроэксцизии шейки матки, находящихся на традиционной терапии.

Таким образом, сочетание ранее используемых методов и новых подходов в ведении постоперационного периода дает возможность снизить бактериальные осложнения, так часто встречающихся при проведении петлевой электроэксцизии. При новом подходе ведение пациентов отсутствует формирования рубцовой ткани, был получен более короткий период репаративных процессов (7–10 дней), сохранение анатомической целостности шейки матки, менструальной и репродуктивной функции у женщин молодого возраста. Все это определяет целесообразность использования синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ в практическом здравоохранении при лечении больных CIN1, CIN2.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубинский В.В. // Рос. журн. кожных и венерических болезней.– 2000.–№ 5.– С. 50-55.
2. Castle P.E. et al. // J. Natl. Cancer Inst.–2002.– Vol. 94, N 18.– P. 1406-1414.
3. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии.– Л.: Медицина, 1989.
4. Жемчугов В.Е., Зурочка А.В., Румянцев Н.Г. Стимулятор роста костномозговых клеток человека. Патент № 2136308 от 10.09.1999.
5. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г. Иммунологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. Цитокины и воспаление.– 2010.– Т. 9.– № 3.– С.53
6. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Костоломова Е.Г., Добрынина М.А., Суховой Ю.Г., Гриценко В.А. Симбирцев А.С. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств различных синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и веществ, полученных из супернатантов CD34<sup>+</sup>45<sup>dim</sup> клеток предшественников гемопоэза. Цитокины и воспаление.– С.– Петербург, 2012, Т. 11.–№ 2-С.96-99
7. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Сравнительные эффекты клеток фенотипа CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> и синтетических пептидов активного центра GM-CSF на процессы репарации кожной раны в эксперименте. Цитокины и воспаление.– С.– Петербург, 2012, Т. 11.–№ 4-С.21-25

**RESEARCH OF CYTOLOGIC AND ANTIBACTERIAL EFFECTS  
OF SYNTHETIC PEPTIDE OF THE KSF GM-ACTIVE CENTER DURING  
REPARATION AND PLASTIC PROCESSES OF A NECK OF A UTERUS  
AFTER CARRYING OUT LOOPBACK ELEKTROEKSTSIZIONNY PROCEDURE-ISSECHENIYA OF ABNORMAL TISSUE OF A NECK AT WOMEN  
WITH A TSERVIKALNY INRAEPITELIALNY NEOPLASIA**

**Goltsova I. A. Zuyeva E. B. Zurochka A. V.**

Effects of synthetic peptide of the KSF GM-active center a tsitoliya of dabs of the tservikalny channel and bacterial obsemeneny vaginas and uterus necks during reparation and plastic processes of a neck of a uterus after carrying out loopback elektroekstsizionny procedure-issecheniya of abnormal tissue of a neck at women with a tservikalny inraepitelialny neoplasia were studied (CIN1, CIN2). Researches showed that at purpose of 40 mkg/ml synthetic peptide had the expressed reparation effect on an epithelium of a neck of a uterus after the carried-out elektroekstsiziya, thus the cytologic picture considerably improved and the obsemenennost of a vagina and a uterus neck pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms decreased. Application of a preparation was accelerated by healing processes approximately twice (by 10 days, in control 20-22 days), were thus celebrated lack of such complications, as bleeding, a stenosis of the tservikalny channel and decrease in quantity separated from a wound surface.

---

---

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-1  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ИНФАРКТМ  
МИОКАРДА ДО И ПОСЛЕ ПЕРВИЧНОГО ЧРЕСКОЖНОГО  
КОРОНАРНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА**

**Грачев Н. И., Семенихин А. А., Гущина А. О., Гришкина Э. Е.**

*ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрова  
России», Владивосток, Россия*

Выполнена оценка сывороточного уровня металлопротеиназы-1 (ММП-1) у 20 больных острым инфарктом миокарда обоого пола от 45 до 74 лет до и после первичного чрескожного коронарного вмешательства. Группы пациентов формировали в зависимости от степени поражения коронарного русла, а также по времени от начала острого инфаркта миокарда (ОИМ). Забор крови производился до операции стентирования, на 1-е и 7-е сутки после операции. Выявлены достоверно высокие значения ММП-1 у больных ОИМ по сравнению с контрольной группой, а также более высокий уровень ММП-1 у пациентов с односудистым поражением и меньшим временем от начала ОИМ.

*Ключевые слова:* матриксная металлопротеиназа-1, инфаркт миокарда, стентирование коронарных артерий.

**Введение.** Болезни системы кровообращения, первое место в структуре которых составляет ишемическая болезнь сердца, является основной причиной смертности в большинстве развитых стран мира [6]. Согласно данным зарубежных исследований ишемическая болезнь сердца стала причиной

смерти 7 249 000 человек на момент 2008 года, из них 659 000 в Российской Федерации [8]. По данным отечественных исследований на протяжении 25 лет общий показатель заболеваемости инфарктом миокарда составил около трех случаев на тысячу человек, при этом отметилась тенденция роста заболеваемости

мости [4]. В исследованиях также был показан рост частоты инфаркта миокарда у молодых лиц (средний возраст 36,4), который превалирует у мужчин [10].

О роли воспалительных процессов, сопровождающих формирование острого инфаркта миокарда, стало известно еще в 40-50 годы, речь шла о повышенном уровне скорости седиментации эритроцитов, С-реактивном белке [7]. Воспаление также играет важную роль в развитии нестабильности бляшки, а значит и в развитии острого коронарного синдрома [9, 12].

Согласно рекомендациям Европейского общества кардиологов применение чрескожного коронарного вмешательства, а не тромболитика при остром инфаркте миокарда (ОИМ) оправдано при наличии технического оборудования и возможности кардиолога выполнить процедуру. Однако, стентирование способно стимулировать воспалительный процесс, который в свою очередь определяет риск последующего рестеноза [2].

Изучается роль металлопротеиназ в развитии ОИМ. Матриксные металлопротеиназы (ММП) это семейство структурно родственных ферментов, содержащих в своем составе цинк, которые расщепляют внеклеточный матрикс и соединительнотканые белки [11, 14]. Источниками ММП являются многие клетки, включая фибробласты, макрофаги, гладкомышечные клетки сосудистой стенки, нейтрофилы [1]. Протеолитический эффект ММП играет важную роль в сосудистом ремоделировании, клеточной миграции, обработке молекул клеточной адгезии и белков внеклеточного матрикса [15]. Все больше научных работ описывают дополнительные эффекты ММП на другие типы сосудистых клеток, таких как эндотелиоциты и гладкомышечные клетки, что может играть роль на ранних стадиях сосудистого ремоделирования. При нормальных физиологических условиях, работа ММП регулируется активностью транскрипции, активацией предшественников зимогенов и взаимодействием между специфическими компонентами внеклеточного матрикса. Также, эндогенные тканевые ингибиторы ММП (ТИМП) создают необходимый баланс для предотвращения избыточной деградации внеклеточного матрикса. Несоответствие между ММП и ТИМП может привести к чрезмерной активности ММП, и следовательно, к пато-

логическим изменениям в сосудистой стенке [13]. Экспрессия ММП в сосудистой стенке и миокарде реализуется в патогенезе нескольких состояний, включая атеросклеротическое поражение сосудов, формирование аневризмы, рестеноза коронарных артерий после проведения ангиопластики и/или стентирования, а так же прогрессировании сердечной недостаточности [3]. Особого внимания заслуживает ММП-1 (также известная как интестинальная коллагеназа), которая синтезируется фибробластами, хондроцитами, макрофагами, кератиноцитами, эндотелиальными клетками и остеобластами. По последним данным ММП-1 участвует в дестабилизации атеросклеротических бляшек и может быть предиктором тяжести поражения коронарного русла [5]. В реакцию на ишемию миокарда вовлечены различные семейства металлопротеиназ, ряд из них (ММП-9, ММП-2) более изучены, чем ММП-1, тем не менее, значительная часть этих факторов может иметь прогностическую или терапевтическую ценность при ишемических поражениях, в частности инфаркте миокарда. Следует отметить, что данные мировой литературы по изучению ММП-1 и влиянии ее на прогноз больных инфарктом миокарда носят экспериментальный характер и недостаточно изучены.

**Цель исследования.** Оценить содержание ММП-1 в сыворотке крови у больных острым инфарктом миокарда до и после первичного чрескожного коронарного вмешательства.

**Материал и методы исследования.** В исследование вошли 20 пациентов обоего пола от 45 до 74 лет с острым инфарктом миокарда, подвергшиеся стентированию коронарных артерий. Группы пациентов формировали в зависимости от степени поражения коронарного русла (однососудистое и многососудистое поражение), а также по времени от начала ОИМ (менее 12 часов от ОИМ, более 12 часов от ОИМ). Контролем служили сыворотка крови 10 практически здоровых лиц. Забор крови производился до операции стентирования, на 1-е и 7-е сутки после операции. Определение ММП-1 в сыворотке крови производили методом твердофазного ИФА с использованием реактивов «R&D Diagnostics Inc.», USA. Результаты выражали в нг/мл. Для математической обработки полученных данных использовали программу StatPlus 2009 и непараметрический U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Ста-

статистически достоверным считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Нами выявлены достоверно высокие значения ММП-1 у больных с ОИМ (2,43 (1,52–4,23) нг/л) по сравнению с контрольной группой здоровых лиц (0,56 (0,33–0,89) нг/л,  $p < 0,01$ ). Так же отмечалась тенденция повышения экспрессии ММП-1 через сутки после операции (2,83 (2,22–3,98) нг/л), к 7 суткам ее уровень остается повышенным (2,83 (1,24–3,1) нг/л), что связано с имплантацией стента и усилением воспалительной реакции в интима артерий ( $p > 0,05$ ).

Анализ уровня ММП-1 в сыворотке крови в зависимости от степени поражения коронарного русла позволил установить, что у больных с однососудистым поражением значения ММП-1 выше, чем при многососудистом процессе до операции (3,38 (1,65–4,78) нг/мл против 2,18 (1,45–3,44) нг/мл), через сутки (3,16 (3,02–4,05) нг/мл против 2,6 (2,09–3,7) нг/мл) и на 7 сутки после вмешательства (3,02 (2,5–5,82) нг/мл против 1,33 (0,49–2,96) нг/мл), однако достоверных различий выявлено не было ( $p \geq 0,05$ ). Более высокие значения ММП-1 у пациентов с однососудистым поражением, по всей видимости, связаны с тем, что эти больные зачастую не имеют ишемического анамнеза, до инфаркта в коронарных артериях не было гемодинамически значимых стенозов, не сформировались коллатерали в коронарном русле. Это способствует большей площади инфаркта миокарда. Напротив, у больных с многососудистым атеросклеротическим поражением, при тотальной окклюзии коронарной артерии, в ней уже сформированы коллатерали из других артерий, что способствует замедлению ишемического повреждения.

Определение сывороточного уровня ММП-1 у больных после стентирования в зависимости от длительности ОИМ выявило более высокие значения ММП-1 до операции у пациентов с ИМ менее 12 часов (3,3 (2,03–3,38) нг/мл против 1,7 (0,99–4,64) нг/мл при  $p < 0,05$ ). Это, вероятно, отражает более выраженное повреждение клеток в острейший период инфаркта миокарда. На 1 сутки после операции уровень ММП-1 выравнивался у обеих групп, что, вероятно, связано с ревазуляризацией миокарда и воспалительной реакцией в ин-

тима артерии при имплантации стента (2,95 (2,53–3,34) нг/мл против 3,19 (1,85–4,11) нг/мл при  $p \geq 0,05$ ). К 7-м суткам сывороточный уровень ММП-1 приходит к уровню, близкому со значениями ММП-1 до операции в обеих группах (3,02 (1,98–3,18) нг/мл против 1,8 (0,65–2,74) нг/мл при  $p \geq 0,05$ ).

**Выводы.** Таким образом, повышенное значение матриксной металлопротеиназы-1 у больных ОИМ по сравнению со здоровыми лицами, возможно, сможет служить предиктором тяжести состояния больных, степени ишемического повреждения миокарда, а также иметь прогностическую ценность при ОИМ в целом, что требует проведение дальнейших исследований с отдаленными результатами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахмедов В. А., Долгих В. Т., Наумов Д. В., Нечипоренко Н. А. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – № 2. – С. 77-79.
2. Беленькова Ю. А., Кашталап В. В. // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. – 2012. – № 29. – С. 51-58.
3. Гайковая Л. Б., Кухарчик Г. А., Нестерова Н. Н. // Вестник аритмологии. – 2009. – № 58. – С. 52-59.
4. Гарганеева А. А., Округин С. А., Зяблов Ю. И. // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – Т. 25, № 2 (вып.1). – С. 44-48.
5. Рагино Ю. И. // Кардиология. – 2007. – Т. 47, № 9. – С. 62-66.
6. Шальнова С. В., Деев А. Д. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2011. – Т. 10, № 6. – С. 5-10.
7. Boltax A. J., Fischel E. E. // Am J Med. – 1956. – Vol. 20, № 3. – P. 418-27.
8. Finegold J. A., Asaria P., Francis D. P. // Int J Cardiol. – 2013. – Vol. 168, № 2. – P. 934-45.
9. Hansson G. K. // N Engl J Med. – 2005. – Vol. 352, № 16. – P. 1685-95.
10. Jamil G., Jamil M., Alkhazraji H. et al. // Am J Cardiovasc Dis. – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 170-4.
11. Klein T., Bischoff R. // Amino Acids. – 2011. – Vol. 41, № 2. – P. 271-290.
12. Lee K. W., Lip G. Y., Tayebjee M., Foster W., Blann A. D. // Blood. – 2005. – Vol. 105, № 2. – P. 526-32.
13. Malemud C. J. // Front Biosci. – 2006. – № 11. – P. 1696-1701.
14. Nagase H., Visse R. // Cardiovasc Res. – 2006. – Vol. 69, № 3. – P. 562-573.
15. Tallant C., Marrero A. // Biochim Biophys Acta. – 2010. – Vol. 1803, № 1. – P. 20-28.

## RESEARCH OF METALLOPROTEINASE-1 IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION BEFORE AND AFTER PRIMARY PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION

Grachev N. I., Semenikhin A. A., Gushchina A. O., Grishkina E. E.

*GBOU VPO Pacific state medical university of the Ministry of health of Russia, Vladivostok*

Assessment of value of MMP-1 in 20 patients of both sexes from 45 to 74 years before and after primary percutaneous coronary intervention. Patient groups are formed depending on degree of coronary lesion and duration of myocardial infarction. Blood sampling was carried out for the day before PCI, in the first and seventh day after the operation. There were significantly higher values of MMP-1 in patients with AMI compared with the control group and higher levels of MMP-1 in patients with single-vessel lesion and shorter duration of AMI. Key words: matrix metalloproteinase-1, myocardial infarction, coronary artery stenting.

## ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Гусева О. А.<sup>1</sup>, Борисов В. А.<sup>2</sup>, Хайдуков С. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», Минздрава России, <sup>2</sup>Центр Избирательной Хронофототерапии, Реабилитации и Иммунокоррекции, <sup>3</sup>ФГБУН Институт Биоорганической Химии им. Акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Предложенный алгоритм проведения иммунологического исследования с использованием проточной цитометрии при вторичном иммунодефицитном состоянии (ВИДС) у пациентов с онкодиагнозом (ОД), может стать отправной точкой в разработке тактики иммунореабилитационных мероприятий.

**Введение.** Скомпенсировать сниженную иммунологическую реактивность организма, возникающую на фоне ВИДС при радио- и химиотерапии позволяют методы иммунореабилитации, направленные на восстановление определенных звеньев иммунитета. Однако успех от проведения подобных мероприятий зависит от состояния иммунной системы пациента, его способности к формированию адекватных иммунных реакций. Таким образом, возникает потребность в надежных тестах, позволяющих оценить потенциальные возможности организма к активации защитных механизмов.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке алгоритма проведения иммунологического обследования пациентов с ОД, позволяющего дать характеристику общей иммунологической картины пациента и спрогнозировать дальнейшее течение заболевания после применения иммунореабилитационных

мероприятий. Для того, чтобы продемонстрировать целесообразность применения данного алгоритма в онкологической практике, аналогичное исследование проводили у пациентов с ВИДС, не имевших в анамнезе ОД.

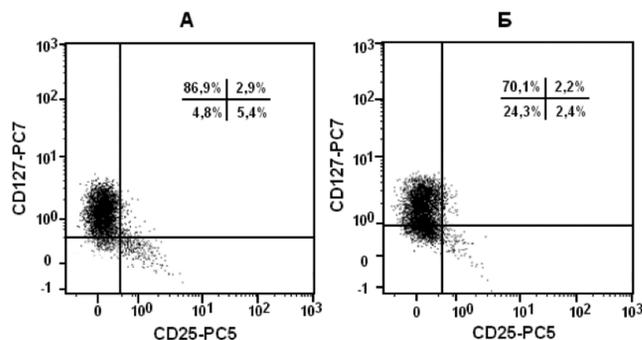
**Материалы и методы.** Обследовано 8 человек с ОД и 9 человек с ВИДС. Материалом исследования являлась венозная кровь. Для окрашивания клеток были использованы мАТ: CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD23, CD25, CD27, CD38, CD45RA, CD45R0, CD56, CD127, CCR7 (CD197) (все Beckman Coulter, США), меченые различными флуорохромами: FITC, PE, ECD, PC5.5, PC7, APC. Окрашенные клетки анализировали на проточном цитофлуориметре Navios (США) как описано в [3].

Анализировали следующие субпопуляции лимфоцитов: общие Т-лимфоциты, Th, Tc, T<sub>reg</sub>, Th<sub>naev</sub>, Th-эффекторы/памяти, В1 клетки, В2 клетки, НК-клетки, НКТ-клетки, НК-

цитолитические, NK-цитокинпродуцирующие. Гематологические показатели определяли на гематологическом анализаторе UniCel® DxH™ 800 (Beckman Coulter, США). Математическую обработку данных проводили при помощи программы Kaluza v. 1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Statistica 6.1 (StatSoft).

**Результаты.** В ходе проведения исследования были выявлены существенные отличия показателей клеточного иммунитета у пациентов с ОД и с ВИДС, как от нормативных значений, так и в сравнении между собой (табл. 1).

У пациентов с ОД отмечалось увеличение общего содержания Т-клеток, за счет Тс. При этом соотношение Th/Tc было значимо снижено по отношению к физиологической норме (ФН). У пациентов с ВИДС статистически достоверных патологических изменений состояния Т-клеточного звена иммунитета выявлено не было. У пациентов с ОД наблюдалось снижение общих В-лимфоцитов по сравнению с пациентами с ВИДС и нормативными показателями. В то же время у пациентов с ВИДС выявлялись достоверные отличия в популяции NK-клеток от ФН, тогда как у пациентов с ОД эти изменения были незначительные. При исследовании малых субпопуляций лимфоцитов было выявлено, что количество NK-клеток, с фенотипом CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> у пациентов, как с ОД, так и с ВИДС в 3,7 раза превышало



**Рисунок 1.** Гистограммы распределения Treg у больного с ВИДС (А) и больного с ОД (Б). Показаны результаты двух типичных исследований.

нормативное значение. Содержание цитокинпродуцирующих NK-клеток у пациентов с ОД в 1,5 раза было ниже ФН, наоборот, у пациентов с ВИДС в 4,8 раза превышало таковой. Количество цитолитических NK-клеток у всех обследованных пациентов практически не отличалось от ФН. Отмечены высокие показатели уровня НКТ-клеток (особенно у пациентов с ОД). У пациентов с ОД количество В1-клеток в 2 раза превышало ФН, тогда как уровень В2-клеток был значительно ниже таковой. У пациентов с ВИДС так же наблюдалось повышение уровня В1-клеток (в 1,6 раза) и снижение количества В2-клеток. Но эти изменения имели менее выраженный характер (табл. 1).

При анализе субпопуляций Т-лимфоцитов значимое снижение CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> -клеток от-

**Таблица 1.** Показатели основных и малых субпопуляций лимфоцитов у пациентов с ОД и с ВИДС.

Популяции клеток	Норма	ОД,%	ВИДС,%
Т-клетки общие (CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> ),%	73,0 ± 12,0	78,2 ± 8,7*	76,2 ± 10,1
Т-хелперы (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ),%	45,0 ± 10,0	40,4 ± 10,2	48,2 ± 8,1
Т-цитотоксические (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ),%	27,0 ± 8,0	36,2 ± 11,9	27,0 ± 6,3
В1-клетки (CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> )	1,3 ± 0,8	2,3 ± 2,3	2,1 ± 1,0
В2-клетки (CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> )	10,7 ± 4,2	7,3 ± 4,3*	8,2 ± 3,7
NK-клетки (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ),%	12,5 ± 4,5	13,2 ± 6,2	16,5 ± 10,2*
NK цитолитические (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>dim</sup> ),%	12,4 ± 4,6	12,7 ± 6,1	13,4 ± 7,2
NK цитокинпродуцирующие (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>bright</sup> ),%	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,1	2,9 ± 5,9*
NK-клетки (CD3 <sup>-</sup> C8 <sup>+</sup> ),%	2,8 ± 2,3	4,8 ± 2,9*	6,5 ± 4,1*
Т-активированные (CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ),%	3,3 ± 2,8	2,0 ± 1,0*	3,4 ± 1,4
NKT-клетки (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ),%	3,3 ± 2,8	10,0 ± 4,7*	7,9 ± 4,2*
Индекс соотношения (Тх/Тц)	2,05 ± 0,55	1,3 ± 0,6*	1,9 ± 0,6

Примечание: \* – статистически достоверные отличия от физиологической нормы при p<0.05.

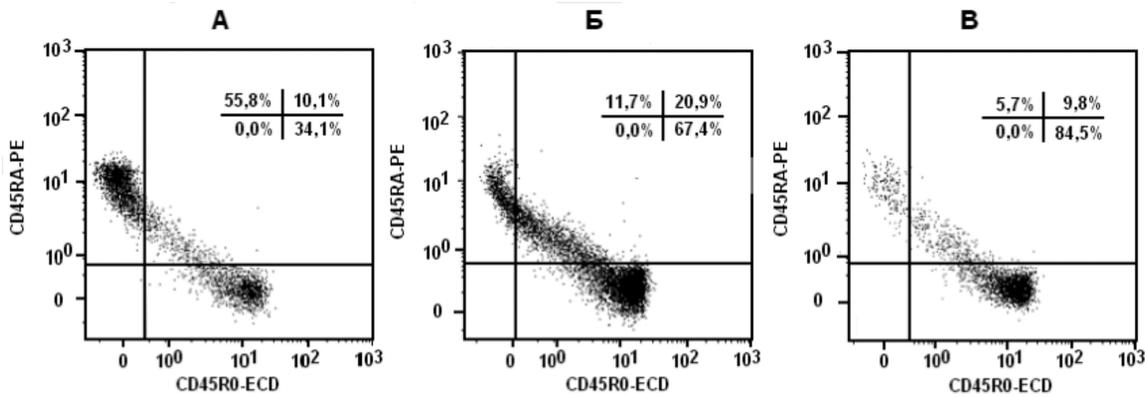


Рисунок 2. Гистограмма распределения CD45RA и CD45RO на Т-хелперах здорового донора (А), больного с диагнозом ВИДС (Б) и больного с ОД (В). Показаны результаты трех типичных исследований.

мечалось лишь у пациентов ОД (1,5 раза). У пациентов с ВИДС отмечено выраженное повышение (2,7 раза) уровня  $T_{reg}$ , тогда как у пациентов с ОД наблюдалась лишь тенденция к его повышению (рис. 1).

Как показано на рис. 2, наиболее выраженные изменения в сторону увеличения  $T_H$ -эффекторы/памяти (84,53%) зарегистрированы у пациентов с ОД (В, G4) по сравнению со здоровыми донорами (34,10%) (А, M4). Менее значительное повышение уровня  $T_H$ -эффекторы/памяти, (67,42%) отмечалось у пациентов с ВИДС (Б, N4). При этом содержание  $T_{H_{naev}}$  как у пациентов с ВИДС, так и у пациентов с ОД было значительно ниже (в 5,5 и 10,5 раза соответственно) по сравнению с таковым у здоровых лиц. (Б, N1; В, G1 и А, M1 соответственно).

**Обсуждение результатов.** Иммунологическая недостаточность наблюдается при многих патологических состояниях и проявляется нарушениями в различных звеньях иммунитета [1]. Неадекватность иммунных реакций часто провоцирует опухолевый рост [1]. Исследование основных субпопуляций лимфоцитов при опухолях различной локализации позволило предположить, что при клеточно-опосредованном иммунном ответе при онкогенных заболеваниях основная роль принадлежит  $T_s$  и НК-клеткам [2]. Однако, в реализации иммунного ответа при различных патологиях участвуют так же активированные лимфоциты, регуляторные Т-клетки, субпопуляции В- и НК-клеток [3]. Исходя из этого, в настоящем исследовании анализировали как основные, так и малые субпопуляции лимфоцитов. Было показано, что у пациентов с ОД значительно возрастает количество  $T_s$ , тогда как у пациентов с ВИДС – уровень  $T_H$ . Вероятно, в первом

случае, количество CD8-положительных клеток увеличивается не за счет Т-лимфоцитов, а за счет особой субпопуляции НК-клеток, экспрессирующих  $\alpha\alpha$ -гомономер CD8 ( $CD3^-CD8^+$ ). При этом достоверно значимых патологических изменений в популяции НК-клеток выявлено не было. По клиническим наблюдениям, у пациентов с ОД с высоким уровнем  $T_s$  и  $CD8^+$ НК-клеток отмечалось более благоприятное течение заболевания, чем у аналогичных пациентов с нормальным или сниженным содержанием этих клеток. У пациентов с ВИДС отмечался высокий уровень НК-клеток, гл. образом цитокинпродуцирующих. Кроме того, этих пациентов содержание  $T_{reg}$ , в отличие от пациентов с ОД, было достаточно высоким.

Было замечено, что у пациентов с ОД, в отличие от таковых с ВИДС количество В-лимфоцитов в крови снижалось, по-видимому, за счет популяции В2-клеток. Вероятно, это связано с миграцией антителообразующих клеток в очаг опухолевого воспаления.

Таким образом, иммунологическая недостаточность при злокачественных опухолях проявляется нарушениями в иммунной системе, в большинстве степени отличающимися от таковых, наблюдаемых при ВИДС не онкогенной природы.

**Выводы.** Предложенный в настоящем исследовании алгоритм проведения иммунологического исследования может стать отправной точкой в разработке тактики иммунореабилитационных мероприятий, направленных на компенсацию недостаточной иммунореактивности и адекватное восстановление клеточного звена иммунитета не только у пациентов с ОД, но с ВИДС различного происхождения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ярилин А. А. Иммунология. // М: ГЭОТАР-Медиа.– 2010.– 752 С.
2. Гусева О. А., Борисов В. А., Григорян С. С. Изменение показателей иммунного статуса у больных с онкологическими заболеваниями после проведения избирательной хронофототерапии (ИХФТ). // Российский Аллергологический Журнал.– 2008 – № 1.– Приложение 1.– С. 74-76.
3. Хайдуков С. В., Зурочка А. В., Тотолян Арег А., Черешнев В. А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). // Медицинская Иммунология.– 2009.– Т. 11.– № 2–3.– С. 227-238.

## FLOW CYTOMETRY ANALYSIS AND ALGORITHM OF IMMUNOLOGICAL RESEARCH FOR CANCER PATIENTS

Guseva O. A., Borisov V. A., Khaidukov S. V.

Abstract. The proposed algorithm of immunological studies of secondary immunodeficiency for patients with cancer by using flow cytometry can be the starting point for the development of tactics immunorehabilitation.

## ВЛИЯНИЕ АНТИАСТЕНИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ЛАДАСТЕН НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФАГОЦИТОВ У ВЕТЕРАНОВ АФГАНИСТАНА С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

Давыдова Е. В., Альтман Д.Ш.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Челябинск, Россия

Изучено влияние антиастенического препарата Ладастен на функциональную активность мононуклеаров периферической крови у ветеранов Афганистана с начальными проявлениями недостаточности кровоснабжения мозга. Получены данные о способности препарата снижать адгезивную способность моноцитов, показатели кислородзависимых процессов в клетке, а также повышать пролиферативный потенциал мононуклеаров, что может лежать в основе актопротекторного эффекта и препятствовать развитию атерогенеза.

*Ключевые слова:* астения, Ладастен, фагоциты, адгезия, пролиферация.

**Введение.** Сосудистые заболевания головного мозга являются лидирующими по частоте причин смертности и инвалидизации в России и в мире. В основе развития дезадаптационных психосоматических расстройств у участников боевых действий после возвращения их к мирной жизни, к которым можно отнести и ранние проявления хронической ишемии мозга, лежит специфическая стрессиндуцированная организация эмоциогенных структур лимбико-ретикулярной системы. С позиций интенсивно развивающейся в настоящее время области иммунологии – нейро-

иммунологии, к основным регуляторным системам относятся не только общепризнанные нервная и эндокринная система, но и иммунная, важнейшей функцией которой является обеспечение иммунного гомеостаза [1]. Медикаментозное воздействие на одну из составляющих систем, влечет закономерные изменения остальных функциональных модулей, что находит отражение в изменении активности отдельных показателей.

Ранние формы хронической ишемии мозга включают начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга (НПНКМ)

и дисциркуляторную энцефалопатию 1 стадии (ДЭП-1). Астенический синдром более чем в 70% случаев сопровождается клиническую картину НПНКМ и проявляется спонтанной слабостью, возникающей без нагрузки, длительно продолжающейся и не проходящей после отдыха, раздражительностью, пониженным настроением, гиперестезией, головной болью, бессонницей, повышенной утомляемостью. С целью коррекции астении применяется ряд современных препаратов, одним из которых является производное адамантана N-(2-адамантил)-N-(парабромфенил)-амин (препарат Ладастен®), обладающий сочетанным психостимулирующим, актопротекторным, анксиолитическим, а также иммуномодулирующим действием. Механизм антиастенического действия Ладастена связан с усилением биосинтеза и выброса допамина из пресинаптических окончаний нейронов, блокадой его обратного захвата и влиянием на ГАВА-бензодиазепиновый-хлорионоформный рецепторный комплекс. В ряде работ показаны иммуномодулирующие свойства Ладастена, его влияние на процессы апоптоза лимфоцитов [2], пролиферативную способность [3].

**Целью** исследования явилось изучение изменений функционального состояния моноцитов, кислородозависимых механизмов бактерицидности, пролиферативной активности клеток под действием препарата Ладастен, применяемого в коррекции астенических расстройств у ветеранов Афганистана с начальными проявлениями недостаточности кровоснабжения мозга.

**Материалы и методы.** Работа проводилась на базе ГБУЗ Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь для ветеранов войн. В исследование включено 34 участника войны в Афганистане с НПНКМ (средний возраст  $46,99 \pm 2,48$ ). Верификация диагноза НПНКМ проведена в соответствии с классификацией Шмидта Е.В. (1985) [4]. Астенические расстройства наблюдались у всех пациентов основной группы с НПНКМ и составляли характерную клиническую картину. На протяжении 14 дней все пациенты с НПНКМ, включенные в исследование, получали монотерапию препаратом Ладастен в дозе 50 мг, 2 раза в день. Курсовая доза 1,4 г. Забор венозной крови для исследования проводили до начала терапии Ладастеном (1 группа) и на 14 сутки приема препарата

(2 группа). Контрольная группа (3) состояла из 24 мужчин того же возраста, условно здоровых, без проявлений НПНКМ (средний возраст  $43 \pm 1,6$  года).

**Выделение мононуклеаров.** Для изучения фракции мононуклеаров кровь стабилизировали гепарином из расчета 10 ЕД/мл. Клетки выделяли на фиколл-верографин-градиенте плотностью 1,077 г/мл при центрифугировании (400 g 45 минут). Отмытые и ресуспендированные клетки доводили до концентрации  $1 \times 10^7$  кл /мл. Жизнеспособность лимфоцитов оценивали путем окраски их 0,2% трипановым синим, она составила не менее 98%.

**Оценка адгезии мононуклеаров.** Адгезивную способность мононуклеаров определяли путем их адгезии на пластик, подсчет (%) производили в камере Горяева. Параллельно применялся спектрофотометрический метод определения адгезии мононуклеаров на пластик, фиксированный монослой клеток окрашивали по Романовскому-Гимзе, результат учитывали на спектрофотометре «Multiscan Plus».

**Оценка механизмов бактерицидности.** Определение спонтанного и индуцированного НСТ и МТТ- тестов проводили спектрофотометрическим методом. МТТ- тест основан на восстановлении бесцветной соли тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, количество которого измеряется спектрофотометрически, после растворения кристаллов в ДМСО. Мононуклеары инкубировали в 96-луночном плоскодонном планшете (200 мкл клеточной суспензии мононуклеаров, в концентрации  $2 \times 10^6$  кл/мл в полной среде RPMI-1640) 44 ч с добавлением 50 мкл ЛПС *S. typhi* для стимуляции моноцитов, после чего в лунки вносили 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ-краситель) инкубировали 4 часа и оценивали спектрофотометрически. НСТ-тест оценивали путем добавления 10 мкл нитросинего тетразолия к культивируемым 44 часа клеткам, инкубировали 30 минут при 37°C, с последующим трехкратным промыванием и растворением в ДМСО. Результат учитывали на спектрофотометре «Multiscan Plus» при длине волны 560 нм. Индекс стимуляции рассчитывали по формуле ОП опыта /ОП контроля.

**Оценка пролиферации фагоцитов.** Пролиферативную активность мононуклеаров с флуориметрической оценкой результатов проводили в стерильных условиях, используя ламинарный бокс. В 96-луночные планшеты вносили по 200 мкл ресуспендированных в культуральной среде (RPMI 1640 «Sigma» с 10% фетальной телячьей сывороткой, 2мМ L-глутамин «Sigma» и 40 мкг/мл гентамицина сульфата (АО «Биомедпрепараты»), клетки инкубировали 4 суток при 37° С, 5% CO<sub>2</sub>. Далее к суспензии клеток добавляли витальный краситель AlamarBlue® (Invitrogen, USA) в количестве 20 мкл (10%). Флуоресценцию измеряли через 4 часа на флуориметре VersaFluor (BioRad) при длине волны возбуждения 390 нм, эмиссии 620 нм и выражали в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ, Relative Fluorescent units, RFU).

**Результаты и обсуждение.** При изучении изменений функционального состояния мононуклеаров периферической крови, кислородзависимых механизмов бактерицидности, пролиферативной активности клеток до и по-

сле применения Ладастена установлен ряд достоверных изменений, представленных в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, в группе пациентов с НПНКМ, как до лечения Ладастеном, так и после, относительное и абсолютное количество моноцитов крови достоверно отличалось от контрольной группы. Показатель адгезии мононуклеаров на пластик у пациентов с НПНКМ в 1 и 2 группах был повышен лишь на уровне тенденции, не достигающей степени статистической достоверности, в сравнении с контрольной группой. Однако, при спектрофотометрическом варианте оценки этого теста показатели оптической плотности во 2 группе, после лечения оказались достоверно более низкими в сравнении с 1 группой до лечения и значимо не отличались от контрольной группы, что свидетельствует о нормализующем воздействии препарата на функцию адгезии моноцитов.

Для оценки влияния Ладастена на процессы кислородзависимого киллинга нами, изучена НСТ и МТТ- активность монону-

Таблица 1. Функциональная характеристика мононуклеаров крови после лечения Ладастеном

Показатели	Группа 1 До лечения Ладастеном n=34	Группа 2 После лечения Ладастеном n=34	Группа 3 Контрольная n=24	p
	M±m	M±m	M±m	
Моноциты%	8,56 ± 0,40	8,43±0,2	6,08 ± 0,23	0,02 <sub>1-3</sub> 0,03 <sub>2-3</sub>
Моноциты 10 <sup>9</sup> /л	0,55 ± 0,02	0,43±0,4	0,39 ± 0,23	0,025 <sub>1-3</sub> 0,01 <sub>2-3</sub>
% адгезии на пластик (визуальная оценка)	67,3 ± 1,79	63,4±0,3	59,8 ± 3,11	
Адгезия (спектрофотометрическая оценка), в единицах оптической плотности	0,381 ± 0,04	0,202±0,05	0,197±0,03	0,027 <sub>1-3</sub> 0,01 <sub>1-2</sub>
Спонтанная НСТ-активность	0,04 ± 0,003	0,05±0,005	0,01 ± 0,003	0,003 <sub>1-3</sub> 0,02 <sub>2-3</sub>
Стимулиров. ЛПС S.typhi	0,05 ± 0,003	0,057±0,01	0,06 ± 0,007	0,002 <sub>1-3</sub>
Индекс стимуляции НСТ	1,26 ± 0,16	2,13±0,21	5,6 ± 0,84	0,012 <sub>1-3</sub>
Спонтанная МТТ активность	0,12± 0,02	0,03± 0,02	0,026± 0,04	0,01 <sub>1-3</sub> 0,01 <sub>1-2</sub>
Стимулированная МТТ-активность	0,356± 0,06	0,18±0,02	0,14± 0,04	0,004 <sub>1-3</sub> 0,02 <sub>1-2</sub>
Индекс стимуляции МТТ	2,8± 0,07	3,3± 0,05	5,27± 0,03	0,003 <sub>1-3</sub>
Пролиферативная активность мононуклеаров, RFU	49,9 ± 2,9	72,9 ± 3,8	56,4 ± 2,7	0,001 <sub>1-2</sub> 0,002 <sub>2-3</sub>

Примечание: достоверность различий по группам получена с помощью U- критерия Mann-Whitney (<0,05)

клеаров. Наши исследования показали, что моноциты больных с НПНКМ, как в спонтанной, так и в меньшей степени в индуцированной ЛПС *S.typhi* НСТ пробе до и после лечения характеризуются достоверным увеличением показателей в сравнении с контрольной группой, что отражает рост внутриклеточной продукции активных форм кислорода при развитии начальных проявлений недостаточности мозгового кровотока. Однако, спонтанная и индуцированная МТТ активность фагоцитов на фоне приема Ладастена достоверно снизилась в сравнении с показателями до лечения и приблизилась к показателям контрольной группы, что отражает иммуномодулирующее, нормализующее действие Ладастена на параметры кислородзависимой активности моноцитов. Индексы стимуляции НСТ и МТТ-теста достоверно отличались только от контрольной группы. Изучение пролиферативной активности мононуклеаров после приема Ладастена показало достоверное увеличение пролиферативной активности мононуклеаров, что может лежать в основе иммунопротекторного эффекта препарата. В работе [2] показано, что Ладастен также проявляет комитогенный эффект при TCR-опосредованной стимуляции Т-лимфоцитов, что сопровождается увеличением концентрации митогенактивируемых киназ.

Таким образом, полученные данные указывают на иммуномодулирующее действие антиастенического препарата Ладастена в отношении мононуклеаров крови, проявляющееся в снижении адгезивной способности моноцитов, нормализации показателей МТТ активности и повышении пролиферативного потенциала мононуклеаров, что лежит в основе актопротекторного эффекта Ладастена и может препятствовать развитию инициальных событий атерогенеза.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Felten D., Maida M. E. Psychoneuroimmunology // in book: Encyclopedia of the human brain. Ed.-in-chief V.S. Ramachandran.- 2002.- Academic Press.- Vol. 4.- P.103-127.
2. Вахитова Ю. В. Влияние ладастена на пролиферативную активность и апоптоз Т-лимфоцитов периферической крови / Сибиряк С. В., Курчатова Н. Н., Середенин С. Б. // Эксперим. и клинич. фармакология.- 2002.- Т. 65, № 6.- С. 49-52.
3. Давыдова Е. В. Характеристика гомеостатических систем при хронической ишемии мозга у ветеранов Афганистана / Альтман Д. Ш. // Рос. иммунол. Журнал.-2012.- Т. 6 (14), № 3 (1).- С.44-46
4. Шмидт Е. В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга //Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова.- 1985.- № 9.- С.1281-1288.

### INFLUENCE OF ANTI-ASTHENIC PREPARATION LADASTEN ON THE FUNCTIONAL CONDITION OF PHAGOCYTES AT VETERANS OF AFGHANISTAN WITH EARLY FORMS OF CHRONIC ISCHEMIA OF THE BRAIN

Davidova E. V., Altman D. S.

The effect of the drug antiasthenicheskogo Ladasten on the functional activity of peripheral blood mononuclear Afghanistan veterans with initial manifestations of insufficient blood supply of the brain. Obtained data on the drug's ability to reduce the adhesive ability of monocytes, oxygen-performance processes in the cell, as well as increase the proliferative potential of mononuclear cells that may underlie aktiprotektornogo effect and inhibit the development of atherogenesis.

*Keywords: asthenia, Ladasten, phagocytes, adhesion, proliferation.*

## РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ПАТОГЕНЕЗЕ РАННИХ ФОРМ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У ВЕТЕРАНОВ АФГАНИСТАНА

Давыдова Е. В., Альтман Д. Ш.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Челябинск, Россия

Проведено определение процессов свободно-радикального окисления, состояние антиоксидантной защиты клеток, нитроксидергической системы у ветеранов Афганистана и гражданских лиц с ранними формами хронической ишемии мозга. Получены данные об усилении процессов липопероксидации, активности антиоксидантной и нитроксидергической систем, более выраженных при дисциркуляторной энцефалопатии 1 стадии, что отражает нарастание гипоксических изменений в тканях мозга при прогрессии хронической ишемии.

*Ключевые слова:* ветераны Афганистана, хроническая ишемия мозга, оксидативный стресс.

**Введение.** Рост церебральной сосудистой патологии и расстройств адаптации у ветеранов современных войн связан с участием в пролонгированных травматических событиях, к которым относится война. Постстрессовые расстройства, типичные для лиц, перенесших «стресс войны», сопровождаются нарушением баланса регуляции обменных процессов, изменением церебрального кровотока, ранней клинической манифестацией и прогрессивным течением хронической ишемии мозга. Известно, что острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), являются одной из ведущих причин смертности трудоспособного населения в современных условиях и занимают второе ранговое место после сердечно-сосудистых катастроф [1]. Острая сосудистая патология чаще формируется в условиях уже существующей хронической церебральной болезни. Хроническая гипоперфузия сопровождается гипоксией нейронов головного мозга с последовательными изменениями митохондриального ферментного комплекса. Нарастание гипоксии сопровождается усилением процессов свободнорадикального окисления в клетках, истощением антиоксидантной защиты, активацией глутамат-кальциевого каскада и органическими изменениями тканей мозга, клинически проявляющимися прогрессией ХИМ [2]. В связи с этим, изучение

механизмов патогенеза начальных форм хронической ишемии мозга на сегодняшний день является актуальной задачей.

Согласно клинической классификации сосудистых поражений головного мозга [3], хронические формы цереброваскулярных заболеваний (ХЦВЗ) включают (1) начальные проявления нарушений кровоснабжения мозга (НПНКМ), (2) дисциркуляторную энцефалопатию (ДЭП) 1, 2, 3 стадии. К ранним формам ХЦВЗ относятся НПНКМ и ДЭП 1 стадии.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение показателей липопероксидации, антиоксидантной защиты и уровней метаболитов оксида азота у ветеранов Афганистана и гражданских лиц с диагнозами НПНКМ и ДЭП 1 стадии.

**Материалы и методы.** Работа проведена на базе отделения неврологии ГБУЗ Челябинского областного клинического терапевтического госпиталя для ветеранов войн. В исследование было включено 82 ветерана Афганистана, из них с начальными проявлениями недостаточности кровоснабжения мозга (НПНКМ) было 29 человек – 1 группа (средний возраст  $39,1 \pm 1,2$  года), 53 человека (2 группа) с диагнозом дисциркуляторная энцефалопатия – 1 стадии (ДЭП-1) средний возраст –  $42,3 \pm 2,4$  года, в группы сравнения

вошли гражданские лица, не участвовавшие в военных действиях – 20 чел. (3 группа) с НПНКМ (средний возраст  $38,2 \pm 1,23$  года) и 18 чел (4 группа) имеющие ДЭП-1 (средний возраст  $41,7 \pm 1,9$  лет), группу контроля (5 группа) составили 25 здоровых мужчин без субъективных и объективных проявлений цереброваскулярной патологии (средний возраст  $38,96 \pm 1,14$  лет). Диагнозы НПНКМ и ДЭП-1 были установлены в соответствии с клинической классификацией сосудистых поражений головного мозга, на основании клинических симптомов заболевания и данных инструментального обследования методами ультразвуковой доплерографии магистральных сосудов, транскраниальной доплерографии и электроэнцефалографии.

Венозную кровь забирали утром, натощак из локтевой вены.

**Оценка процессов перекисидации липидов.** Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли экстракционно-спектрофотометрическим методом [4,5]. Экстракцию перекисидованных ацилов из фосфолипидов осуществляли изопропанолом, в экстракте определяли: содержание диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов с сопряженными триеновыми (КД и СТ) и общих полиеновых (ОП). Результаты выражали в единицах индекса окисления.  $E_{232}/E_{220}$  – содержание ДК и  $E_{278}/E_{220}$  – содержание КД с СТ. Для определения общего содержания продуктов ПОЛ в сыворотке крови определяли содержание ТБК-активных продуктов.

**Определение конечных стабильных метаболитов оксида азота** проводили по содержанию конечных метаболитов оксида азота нитритов ( $\text{NO}_2$ ), нитратов ( $\text{NO}_3$ ) и их суммарных продуктов ( $\text{NO}_x$ ) [6]. Уровень стабильного конечного продукта окисления пероксинитрита-нитротирозина (нМ) с помощью тест-системы для ИФА (Nitrotyrosine, НВТ).

**Оценка антиоксидантной системы.** Активность каталазы оценивали по способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный продукт; пероксидазы – на основе фотометрической регистрации снижения концентрации индигокармина, окисляемого перекисью водорода в присутствии пероксидазы; церулоплазмина – в реакции окисления р-фенилендиамина при участии церулоплазмина. Результаты реакции измеряли

на спектрофотометре – СФ46 при соответствующей длине волны.

**Статистическая обработка материала.** Применяли пакет прикладных программ Statistica for Windows vers. 6.0. фирмы StatSoft Inc. (США), проводилось определение среднего значения ( $M$ ) и стандартного отклонения ( $\sigma$ ), сравнение групп производили с помощью критерия Манна-Уитни.

**Результаты и обсуждение.** Гипоксически – ишемические изменения в тканях головного мозга уже на ранних стадиях нарушений мозгового кровотока приводят к усилению процессов свободно-радикального окисления. Нервные клетки отличаются повышенным содержанием липидов, при этом, каждая третья жирная кислота, входящая в состав фосфолипидов нервной ткани, относится к группе полиненасыщенных жирных кислот, активно участвующих в процессах перекисидации. Содержание первичных продуктов ПОЛ (ДК  $E_{232}$ ) у ветеранов Афганистана, как с НПНКМ, так и с ДЭП-1 стадии, оказалось достоверно выше, чем в контрольной группе ( $2,55 \pm 0,17$  против  $1,78 \pm 0,11$  соответственно). У гражданских лиц также отмечен рост уровня первичных продуктов ПОЛ ( $E_{232}/E_{220}$ ) с  $0,56 \pm 0,02$  в контроле до  $0,62 \pm 0,02$  при НПНКМ. Увеличение первичных продуктов ПОЛ может свидетельствовать об активации НАДФ-Н – зависимой системы перекисного окисления фосфолипидов, которая ингибирует активность микросомальной гидроксилирующей системы и подавляет катаболизм холестерина. Продукты липоперекисидации участвуют в процессах первичного повреждения сосудистой стенки.

Количество вторичных продуктов ПОЛ (КД, СТ) и ТБК между группами ветеранов и гражданских лиц, а также в сравнении с контрольной группой не имело достоверных различий. Не было обнаружено достоверных различий по активности внутриклеточных антиоксидантов каталазы и пероксидазы. Вместе с тем, у ветеранов с НПНКМ (1 группа) отмечалась тенденция к более высокому уровню каталазной активности, напротив, у ветеранов с ДЭП-1 к повышению пероксидазной активности. Содержание ЦП у ветеранов с ДЭП-1 (2 группа) и гражданских лиц с такой же патологией (4 группа) было достоверно выше, чем у больных 1 и 3 групп (ветеранов и гражданских лиц с НПНКМ ( $266,6 \pm 7,42$  и  $273,0 \pm 9,58$

против  $239,4 \pm 7,35$  и  $233,8 \pm 10,22$  соответственно). Таким образом, при прогрессии хронических форм ишемии мозга в условиях нарастания гипоксических повреждений имеет место усиление антиоксидантной защиты нейронов, более выраженное при ДЭП-1 стадии. Кроме того, низкий уровень вторичных продуктов ПОЛ может зависеть от повышенного содержания естественных антиоксидантов церулоплазмина и холестерина. Повышение в крови первичных продуктов ПОЛ при отсутствии роста вторичных продуктов ПОЛ у больных с ДЭП-I (2 и 4 группа) свидетельствует, что процесс СРО у них все же активирован и при вторичной атаке кислорода гидроперекиси полиеновых ЖК (ДК) претерпевают окислительную деструкцию с образованием вторичных продуктов ПОЛ (КД с СТ и МДА), способных легко взаимодействовать с аминогруппами аминокислот и белков.

Определенный вклад в баланс появляющихся в крови свободных радикалов вносят эндотелиальные клетки, постоянно продуцирующие оксид азота, экспрессия которого зависит от концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Продукты липопероксидации способны активировать индуцибельную форму NO-синтазы, выбрасывающей в кровоток избыточное количество оксида азота. Последний, превращаясь в пероксинитрит, способен окислять липиды даже в присутствии высоких концентраций антиоксидантов и тем самым нарушать неустойчивое равновесие между про- и антиоксидантами крови [7]. Концентрация в плазме нитротирозина – стабильного конечного продукта нитрирования ароматического кольца тирозина пероксинитритом, у ветеранов с ХИМ (при ДЭП-1 стадии составила  $4,6 \pm 0,03$  нМ, у лиц с НПНКМ  $3,2 \pm 0,02$  нМ) достоверно превышала значения контрольной группы ( $0,97 \pm 0,003$  нМ). У гражданских лиц уровень нитротирозина при НПНКМ составил  $3,4 \pm 0,01$  нМ, при ДЭП-1 стадии  $5,3 \pm 0,04$  нМ, что не имело достоверных различий с группами ветеранов. Очевидно, что высокие концентрации нитротирозина плазмы на ранних стадиях ХИМ свидетельствуют о наличии оксидативного стресса. Следствием окисления пероксинитритом NH- и SH-групп белков является инактивация Mn-, Fe-супероксиддисмутаза, глутатиона, тканевых ингибиторов металлопротеиназ, в частности MMP-9,  $\alpha 1$ -нигибатора протеиназ, что может

сопровождаться снижением антиоксидантного потенциала клеток. Во всех обследованных группах (1,2,3,4) пациентов уровни нитратов и нитритов в сыворотке крови были достоверно выше ( $17,55 \pm 1,24$ ;  $17,54 \pm 1,79$ ;  $17,05 \pm 1,83$  и  $16,70 \pm 0,89$  Мкмоль/л, соответственно), чем в контрольной группе ( $14,32 \pm 1,37$ ), практически не отличаясь в пределах групп больных. Суммарное количество нитроксид-ионов у ветеранов с ДЭП-1 было максимальным  $55,9 \pm 4,96$  Мкмоль/л, однако уровень NOx достоверно не отличался от такового в группе гражданских лиц с ДЭП-1 ( $50,9 \pm 6,36$  Мкмоль/л). Пациенты с начальными проявлениями хронической ишемии мозга имели более низкие параметры NOx в сыворотке крови в сравнении с таковыми при ДЭП-1 стадии, что может отражать более выраженные гипоксические изменения при прогрессии ХИМ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что сосудистые изменения при ранних формах хронической ишемии мозга сопровождаются отчетливыми признаками оксидативного стресса, в виде усиления процессов свободно-радикального окисления, накопления продуктов ПОЛ и метаболитов оксида азота. Активация антиоксидантной системы, наблюдаемая при повреждении клеточных структур более выражена при ДЭП 1 стадии у ветеранов, что отражает нарастание гипоксических процессов нейронов головного мозга в условиях прогрессирующей цереброваскулярной недостаточности и пост-стрессовых расстройств.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Харченко В. И. Смертность от основных болезней системы кровообращения в России (Аналитический обзор официальных данных Госкомстата Минздрава России, ВОЗ и экспертных оценок по проблеме) / Харченко В. И., Какорина Е. П., Корякин М. В. и др. // Российский кардиологический журнал. – 2005, № 1 (51) – С. 5–15.
2. Гусев Е. И. Эпидемиология инсульта в России / Гусев Е. И., Скворцова В. И., Стаховская Л. В., Килюковский В. В., Айриян Н. Ю., // Consilium medicum. Журн. доказательной медицины для практикующих врачей. – 2003. – Том 5, № 5. – С. 1–6
3. Шмидт Е. В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга / Е. В. Шмидт // Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова. – 1985. – № 9. – С. 1281–1288.
4. Волчегорский И. А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного

- окисления липидов в гаптен-изопропанольных экстрактов крови/ Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. // Вопросы мед. химии. –1989, № 1с. 127-131
5. Плацер З. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / Плацер З., Видлакова М., Кужела Л. // Чехословацкое мед. обозрение. – 1970. – т. 16, № 1. С.30-41
  6. Емченко Н.Л. Универсальный метод определения нитратов в биосредах организма / Емченко Н.Л., Цыганенко О.И., Ковалевская Т.В. // Клин. лаб. диагностика. –1994. – № 6. С.19-20
  7. Волин М. С. Механизм передачи сигнала оксида азота в сосудистой ткани/ Волин М. С.,
  8. Дэвидсон К.А., Калинин П.М. //Биохимия. – 1998. – т. 63, вып.7. – С.958-965

## DEFINITION OF PROCESSES CARRIED OUT FREE-RADICAL OXIDATION STATE OF ANTIOXIDANT PROTECTION OF CELLS, NITRERGIC SYSTEM IN AFGHANISTAN VETERANS AND CIVILIANS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA

Davidova E. V., Altman D. S.

Obtained evidence of increased lipid peroxidation, antioxidant activity and nitrokidergicheskoysts systems, more severe vascular encephalopathy in stage 1, which reflects the growth of hypoxic changes in brain tissues during the progression of chronic ischemia.

*Key words: Afghanistan veterans, chronic cerebral ischemia, oxidative stress.*

## ОСОБЕННОСТИ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ КОНТАМИНАЦИИ ФЕНОЛАМИ

Долгих О. В.<sup>1,2</sup>, Предеина Р. А.<sup>1</sup>, Вайсман Я. И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», <sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Проведена оценка влияния фенолов на иммунную регуляцию у детей. Выявлено, что фенол вызывает нарушения со стороны иммунной системы, характеризующиеся повышением специфической чувствительности к фенолу, угнетением клеточного звена иммунитета, нарушением регуляции запрограммированной гибели клеток и цитокинпродуцирующей активности иммуноцитов.

*Ключевые слова:* иммунорегуляция, апоптоз, клеточные маркеры, цитокины, эксперимент *ex vivo*.

**Введение.** Перспективным направлением в исследовании токсического воздействия химических факторов окружающей среды на здоровье населения является изучение функционального состояния иммунной системы [5]. Иммунная система является одной из важнейших гомеостатических систем организма и во многом определяет степень здоровья человека и его адаптационные возможности. Известно, что воздействие техногенных факторов может привести к наруше-

ниям защитной функции иммунной системы и, прежде всего, иммунорегуляторных процессов в организме человека, на уровне нарушений которых возможно установление начальных механизмов возникновения патологий, приводящих к развитию серьезных заболеваний [1, 2]. В рамках этого актуальной является оценка влияния фенолов, как одних из приоритетных загрязнений окружающей среды Пермского края, на иммунную регуляцию.

**Цель** исследования – изучение особенностей иммунной регуляции у детей в условиях повышенной контаминации биосред фенолами.

**Материалы и методы.** Всего обследовано 339 детей в возрасте от 5 до 7 лет. Группу наблюдения составили 265 детей, проживающих в г. Перми в условиях хронического аэрогенного воздействия фенолов. Для проведения сравнительного анализа обследована группа из 74 детей, проживающих на территории пос. Сылва и Большая Соснова Пермского края, характеризующейся удовлетворительной санитарно-гигиенической ситуацией (группа сравнения). Для проведения экспериментального исследования *ex vivo* использовали биосреды (кровь) 85 детей из группы наблюдения и 30 детей из группы сравнения.

Исследование крови детей на содержание фенолов проводили методом капиллярной газовой хроматографии в соответствии с МУК 4.1.2108-06 [3]. В качестве критериев оценки содержания фенолов в крови использованы региональные фоновые уровни.

Оценку функционального состояния иммунной системы детского населения проводили с использованием комплекса иммунологических методов диагностики. Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитофлюориметре FACSCalibur («Becton Dickinson» («BD»), США) с использованием универсальной программы CellQuestPro. Определение популяций и субпопуляций лимфоцитов ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD16^+56^+$ ,  $CD25^+$ ,  $CD95^+$ ,  $CD127^-$ ), уровня экспрессии рецептора к ФНО $\alpha$  (TNFR1 – tumor necrosis factor receptor I), проводили методом мембранной иммуофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител (МКАТ) к мембранным CD-рецепторам («BD», «Beckman Coulter» («BC»), США). Регистрацию апоптоза лимфоцитов проводили методом, основанным на определении экспрессии фосфатидилсерина с помощью аннексина V, конъюгированного с FITC («BC», США). Внутриклеточный транскрипционный фактор p53 и внутриклеточный антиапоптотический фактор bcl-2 определяли с помощью соответствующих МКАТ («BD», США, «DakoCytomation», Дания).

Специфический к фенолу IgG определяли методом модифицированного конкурентного иммуноферментного анализа на анализаторе «Elx808IU» (США) согласно МР 111-14/55-04-02 [4].

С целью выявления непосредственного влияния фенола на регуляцию иммунной системы оценивали экспрессию выработки цитокинов в условиях эксперимента *ex vivo*. Исследовали уровни спонтанной и индуцированной фенолом ( $0,05 \text{ мг/дм}^3$ ) продукции цитокинов в супернатантах цельной периферической крови детей методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Вектор-Бест» (Россия) на анализаторе «Elx808IU» (США). Влияние фенола на фагоцитарную активность определяли в условиях эксперимента путем добавления фенола ( $0,05 \text{ мг/дм}^3$ ) в кровь перед инкубацией с формализированными эритроцитами барана. Рабочую концентрацию фенола подбирали опытным путем (исследовали влияние на клетки трех концентраций фенола:  $0,01$ ;  $0,05$  и  $0,1 \text{ мг/дм}^3$ ) таким образом, чтобы отсутствовали агломерация и лизис микробов, и не утрачивалась способность нейтрофилов к фагоцитозу.

Для статистической обработки результатов исследования применяли методы математической статистики с использованием программы Microsoft® Office Excel 2003 и пакета статистического анализа Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для оценки уровня достоверности полученных результатов использовали параметрический критерий Стьюдента. Различия полученных результатов являлись достоверными при  $p < 0,05$ . Причинно-следственные связи между воздействием загрязняющего вещества и ответной реакцией организма описывали с использованием метода регрессионного анализа.

**Результаты.** Химико-аналитическое исследование крови на содержание фенолов показало превышение их региональных фоновых уровней у детей группы наблюдения в 5,3 раза. При этом содержание крезолов также отличалось от фоновой концентрации, соответствующей нулевому значению. Уровни фенола, о-крезола и п-, м-крезола в крови детей группы наблюдения достоверно ( $p < 0,05$ ) превышали аналогичные показатели группы сравнения в 4,0; 21,4 и 4,9 раз, соответственно.

Из показателей CD-иммунограммы у детей группы наблюдения обнаружено достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение относительного числа  $CD4^+$ - и  $CD25^+$ -лимфоцитов в 1,1 и 1,2 раз, соответственно, по отношению к аналогичным показателям группы сравнения. Сравнительная оценка регуляторных лимфоцитов ( $CD4^+25^+127^-$ ) у детей группы наблюдения с показателями груп-

пы сравнения выявила достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение их абсолютного и относительного содержания в 4,5 и 4,9 раз, соответственно. Относительное содержание клеток, вступивших в стадию апоптоза (AnnexinV-FITC<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>), уровень экспрессии рецептора TNFR1 – маркера, определяющего клеточную гибель, и содержание внутриклеточного транскрипционного фактора p53 у детей группы наблюдения были достоверно ( $p < 0,05$ ) в 1,3; 1,4 и 1,4 раз, соответственно, ниже, чем у детей группы сравнения. Наряду с полученными результатами обнаружено повышение в 1,4 раза содержания внутриклеточного антиапоптотического белкового фактора bcl-2 у детей группы наблюдения по отношению к группе сравнения при  $p < 0,05$ .

О влиянии фенолов на угнетение клеточного иммунитета может свидетельствовать статистически значимая зависимость снижения абсолютного числа CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов от повышенной концентрации п-, м-крезола ( $R^2=0,70$ ;  $p=0,0005$ ) в крови и выявленная тенденция снижения числа CD4<sup>+</sup>- и CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов от повышенного содержания п-, м-крезола и фенола в крови, адекватность которой подтверждается значением критерия Фишера ( $F=30,27-56,35$ ) и достоверностью коэффициентов регрессии ( $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о существовании хронической антигенной супрессии у детей, проживающих в условиях хронического аэрогенного воздействия фенолов, способствующей угнетению клеточного звена иммунитета и нарушением регуляции апоптоза.

Установлен достоверно повышенный по сравнению с физиологической нормой уровень специфической сенсибилизации к фенолу по критерию специфического IgG у детей группы наблюдения ( $0,250 \pm 0,027$  у.е. при региональной физиологической норме  $< 0,13$ ). Содержание специфических антител к фенолу у этих детей достоверно ( $p < 0,05$ ) превышало аналогичный уровень группы сравнения в 1,3 раза, что подтверждает влияние фенола на баланс медиаторов иммунорегуляции.

Оценка спонтанной продукции цитокинов клетками периферической крови обследуемых детей, характеризующей текущую активацию клеток иммунной системы, в эксперименте *ex vivo* показала достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8 в 3,4; 4,1 и 5,8 раз, соответственно, у детей группы наблюдения по отношению к аналогичным показателям группы сравнения. При этом у детей группы наблю-

дения обнаружено достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение спонтанной продукции ИЛ-17, ФНО $\alpha$  и ИФН $\gamma$  в 2,8; 1,9 и 2,6 раз, соответственно, по отношению к группе сравнения.

В рамках эксперимента установлены особенности механизма действия фенолов на иммунную регуляцию у детей. Выявлено цитокинстимулирующее влияние фенола в отношении как про-, так и противовоспалительных цитокинов. При этом установлено, что фенол обладает более существенной способностью активировать синтез цитокинов при взаимодействии с клетками крови детей, проживающих в условиях хронического аэрогенного воздействия фенолов. Так, в крови детей группы наблюдения достоверно ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе сравнения повышалась фенол-индуцированная продукция ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИЛ-8, в 4,1; 5,1 и 21,7 раз, соответственно. При этом обнаружено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение стимулированной фенолом продукции ИЛ-17, ИФН $\gamma$  в 3,6 и 2,6 раз, соответственно, и не обнаружено достоверных изменений синтеза ФНО $\alpha$ .

Исследование фагоцитарного звена иммунитета у детей группы наблюдения в условиях эксперимента выявило достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса при экспериментальной экспозиции фенолом по сравнению с контрольными показателями. Не обнаружено достоверно значимых различий между показателями фагоцитоза в условиях эксперимента и контрольными показателями у детей группы сравнения.

Таким образом, у детей, проживающих в условиях хронической экспозиции фенолами, наблюдаются следующие особенности иммунорегуляции: повышение специфической чувствительности к фенолу; угнетение клеточного звена иммунитета, нарушение регуляции запрограммированной гибели клеток и цитокин-продуцирующей активности иммуноцитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иммунитет у детей в условиях воздействия техногенных химических факторов / О.В. Долгих [и др.] // Здоровье семьи – 21 век. – 2010. – № 1.
2. Кудрин А.В., Громова О.А. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 544 с.
3. Определение массовой концентрации фенола в биосредах (кровь) газохроматографическим методом. МУК 4.1.2108-06 / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2006.

4. Способы диагностики сенсибилизации к низкомолекулярным химическим соединениям: МР 111-14/55-04-02.- Москва-Пермь, 2002.- 29 с.
5. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system / E. Gleichmann [et. al.] // Arch. Toxicology.- 1989.- № 63.- P. 257-273.

## FEATURES OF IMMUNE REGULATION IN CHILDREN EXPOSED TO PHENOL

<sup>1,2</sup>Dolgikh O. V., <sup>1</sup>Predeina R. A., <sup>2</sup>Vaisman Y. I.

<sup>1</sup>FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies",  
<sup>2</sup>Perm State National Research Polytechnical University

In this study, we assessed the impact of phenol on immune regulation in children. Based on the study results we have found changes in the immune system caused by phenol, such as high specific sensitivity to phenol, suppression of cellular immunity, dysregulation of apoptosis and change in cytokine production.

*Keywords: immunoregulation, apoptosis, cell markers, cytokines, experiment ex vivo.*

---

---

## ОСОБЕННОСТИ АПОПТОЗА У ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ ЭКСПОНИРОВАННОГО ХЛОРОФОРМОМ

Долгих О. В.<sup>1,2</sup>, Зайцева Н. В.<sup>1</sup>, Дианова Д. Г.<sup>1,3</sup>, Вайсман Я. И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», <sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет, <sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Пермская фармацевтическая академия», Пермь, Россия

Цель работы – оценить особенности апоптоза у детей, употребляющих, гиперхлорированную питьевую воду. С использованием метода проточной цитофлуориметрии установлено, что у детей, употребляющих гиперхлорированную питьевую воду, отмечается угнетение апоптоза. Хлороформ, идентифицированный в крови детей, проживающих в условиях хронического перорального поступления хлорсодержащих соединений, ингибирует клеточную гибель, причем, с возрастанием концентрации хлороформа в биосредах супрессирующий эффект на гибель клетки по типу апоптоза возрастает.

*Ключевые слова:* иммунная система, апоптоз, цитохром, хлороформ, проточная цитометрия, генотипирование.

Состояние здоровья детского населения во многом зависит от неблагоприятного воздействия химических факторов внешней среды, что способствует модификации иммунного ответа и может проявляться в позитивной или негативной активации лимфоцитов [2]. В связи с этим, актуальным является выявление особенностей апоптоза у детей, проживающих в условиях экспозиции антропогенных химических факторов [3].

Цель работы – оценить особенности апоптоза у детей, употребляющих гиперхлорированную питьевую воду.

**Материалы и методы.** Обследовано 285 детей, проживающих в различных условиях среды обитания. Группа наблюдения – 66 детей употребляющих гиперхлорированную питьевую воду. Группа контроля – 119 детей проживающие на территории, где в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения используются подземные воды. Хлороформ в биосредах (кровь) определяли с использованием капиллярного газового хроматографа «Кристалл 5000» (Россия) в соответствии с МУК 4.1.2102-4.1.2116-06. Детекцию апоптоза проводили на проточном цитометре

FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» («BD», USA). Для установления диапазонов ответных реакций иммунной системы на воздействие, дети, употребляющие гиперхлорированную питьевую воду, были поделены на подгруппы (I и II) с учетом содержания анализируемого компонента в образцах крови. Забор материала для ПЦР проводили методом взятия мазков со слизистой оболочки ротоглотки [4]. Для определения генотипов использовали вариант ПЦР в режиме реального времени и метод аллельной дискриминации. Идентифицировался ген цитохрома P-450 (CYP1A1). Обработка данных проводилась в пакете статистического анализа Statistica 6.0 и специально разработанных программных продуктах, сопряженных с приложениями MS-Office. В случае отклонения от нормального распределения, для сравнения данных использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При соответствии данных нормальному распределению использовали t-критерий Стьюдента. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости ( $p$ ), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05. Обработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт», служащей для расчета статистических параметров для исследований «случай-контроль», использующих SNP.

**Результаты и обсуждение.** При исследовании детей, потребляющих питьевую воду с хлорорганическими соединениями, в крови идентифицирован хлороформ ( $0,0113 \pm 0,0024$  мг/дм<sup>3</sup>). В крови детей контрольной группы хлороформ не обнаружен. Анализ результатов показал, что у детей с повышенным содержанием в крови анализируемого компонента статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижен уровень Annexin V-FITC<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> клеток ( $1,35 \pm 0,08\%$ ) относительно величин, зафиксированных у детей контрольной группы ( $1,96 \pm 0,09\%$ ). Идентификация диа-

пазонов ответных реакций иммунной системы на воздействие показала, что у обследуемых детей II подгруппы на фоне статистически значимого ( $p < 0,05$ ) повышения в биосредах средней концентрации хлороформа статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижается количество Annexin V-FITC<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> лимфоцитов относительно значений, полученных у детей I подгруппы (табл. 1).

Метаболизм хлороформа (CHCl<sub>3</sub>) осуществляется системой энзимов цитохрома P-450 в микросомах с образованием фосгена, который затем конъюгирует с двумя молекулами глутатиона (GSH). Реакцию метаболитов хлороформа с глутатионом следует рассматривать в качестве основного механизма детоксикации [6]. Хлорсодержащие соединения разрушаются при участии оксидаз смешанной функции в печени, легких, тонком кишечнике [1] и ядерных структурах [5].

Проведено генотипирование распространенности в изучаемой детской популяции аллелей гена цитохрома 1A1

Полиморфизм гена детоксикации CYP1A1 характеризует специфические различия между анализируемыми группами детей. Распространенность патологического аллеля CYP1A1 (ген цитохрома), отвечающего за I фазу детоксикации органических токсикантов у детей группы наблюдения превышает контрольную в 3,5 раза за счет вариантного аллеля по гетерозиготному типу.

Регуляция (активация или ингибирование) апоптоза является процессом существенно зависимым от функциональной специфики ферментов метаболизма органических соединений в митохондриях и ядре клетки, изменяющихся при воздействии хлороформа.

Очевидно, хлороформ, идентифицированный в крови детей, проживающих в условиях хронического перорального поступления хлорсодержащих соединений, ингибирует клеточную гибель, причем, с возрастанием концентрации хлороформа в биосредах супрес-

Таблица 1. Диапазон значений маркера экспозиции хлороформом и сопутствующие им диапазоны маркеров апоптоза обследуемых детей ( $M \pm m$ )

Показатели	I группа (n=26)	II группа (n=40)	p межгрупповое
Концентрация хлороформа в крови			
Диапазон концентрации, мг/дм <sup>3</sup>	0–0,0032	0,0033–0,0420	
Среднее значение, мг/дм <sup>3</sup>	$0,0018 \pm 0,0003$	$0,0100 \pm 0,0014$	0,001
Характеристика биомаркеров апоптоза с учетом уровня хлороформа в крови			
Annexin V-FITC <sup>+</sup> PI <sup>-</sup> , %	$1,25 \pm 0,09$	$0,93 \pm 0,06$	0,020

сирующий эффект на гибель клетки по типу апоптоза возрастает.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бова А. А. Военная токсикология и токсикология экстремальных ситуаций: Учебник. БГМУ, Минск 2005, 662 с.
2. Долгих О. В. Иммунные и ДНК-маркеры воздействия техногенной нагрузки / О. В. Долгих, А. В. Кривцов, Р. А. Харахорина и др. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4. – С. 240-241.
3. Зайцева Н. В., Долгих О. В., Дианова Д. Г. Особенности клеточного звена иммунитета у детей в условиях внешнесредовой экспозиции толуолом, формальдегидом, фенолом // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14. – № 5 (2). – С. 341-343.
4. Перечень маркеров генного полиморфизма, отвечающих за особенности мутагенной активности техногенных химических факторов / Методические рекомендации МР 4.2.0075-13 от 20.08.2013. Москва. – 2013. – 18 с.
5. Hall A. G. European J. of Clinical Investigations 1999, 29, P. 238-245.
6. Toxicological profile for chloroform. U.S. department of health and human services public health service. Agency for toxic substances and disease registry. 1997, 320 p.

### PECULIARITIES OF APOPTOSIS IN CHILD POPULATION EXPOSED TO CHLOROFORM

Dolgikh O. V.<sup>1,2</sup>, Zaitseva N. V.<sup>1</sup>, Dianova D. G.<sup>1,3</sup>, Vaisman Y.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", <sup>2</sup>Perm State National Research Polytechnical University, <sup>3</sup>SBEI of HPE "Perm Pharmaceutical Academy"

The purpose is to evaluate the peculiarities of apoptosis in children consuming hyperchlorinated drinking water. Using the flow cytometry method it was revealed that in children, consuming hyperchlorinated drinking water, there is apoptosis inhibition. Chloroform, identified in the blood of children, living in conditions of chronic ingestion of chlorinated compounds, inhibits cell death, and, with increasing concentrations of chloroform in biological media, the suppressive effect on cell death by apoptosis type increases.

*Keywords: immune system, apoptosis, cytochrome, chloroform, flow cytometry, genotyping.*

---

---

### ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ COLURIA GEOIDES (ROSACEAE) НА КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ

Дутова С. В.<sup>1</sup>, Карпова М. Р.<sup>2</sup>, Мяделец М. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», Абакан, <sup>2</sup>ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, <sup>3</sup>ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия

На мышах линии СВА/СаЛас исследовано влияние препаратов из травы и подземных органов эфиромасличного растения семейства *Rosaceae* – *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. на различные стадии клеточного иммунного ответа в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Установлено стимулирующее действие препаратов С-1 и С-2 (полученных методом перколяции с помощью 40%-ного и 70%-ного этанола) на способность антигенспецифических Т-лимфоцитов при встрече с антигеном продуцировать провоспалительные цитокины, что согласуется с ранее проведенными *in vitro* исследованиями. Выявленное иммуностимулирующее действие превосходило эффект препарата сравнения (официальной настойки эхинацеи). На модели экспериментального иммунодефицита установлено достоверное снижение индекса воспаления на стадии разрешения ГЗТ при введении животным препарата С-1.

*Ключевые слова:* клеточный иммунитет, лекарственные растения, иммунотропное действие.

Важной задачей современной экспериментальной фармакологии является расширение ассортимента эффективных и безопасных отечественных препаратов. Эфиромасличное растение сибирской флоры *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*) – является перспективным источником биологически активных веществ с противомикробной, иммуностимулирующей и иммунокорректирующей активностью, протективным действием при стафилококковой инфекции [1–2, 4–5]. Важным аспектом иммунотропного действия препаратов является их влияние на клеточно-опосредованный иммунный ответ, что позволяет использовать их в терапии вирусных заболеваний и инфекций, вызванных внутриклеточными паразитами [6, 8]. Цель настоящего исследования – оценить влияние препаратов *C. geoides* на различные стадии клеточного иммунного ответа, в том числе при экспериментальном иммунодефиците.

Исследование выполнено на 145 мышках линии СВА/СaЛас массой 18–20 г в возрасте 2–2,5 месяцев, полученных из отдела экспериментального биомедицинского моделирования ФГБУ «НИИ фармакологии им. Е. Д. Гольдберга» СО РАМН (г. Томск). Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией (Страсбург, 1986), из эксперимента животных выводили дислокацией шейных позвонков под легким эфирным наркозом. Исследуемые препараты получали из сырья

(травы и корневищ с корнями) *Coluria geoides* (*Rosaceae*), собранного в естественных степных фитоценозах в стадии вегетации после плодоношения, методом перколяции с помощью 40%-ного (препарат С-1) и 70%-ного (препарат С-2) этанола, высушивали до постоянной массы и стандартизировали по сухому остатку [3].

Влияние препаратов на клеточный иммунный ответ изучали при постановке реакции гиперчувствительности замедленного типа [7]. Для этого мышей иммунизировали суспензией эритроцитов барана (далее ЭБ)  $1 \times 10^7$  в объеме 100 мкл (сенсibilизирующая доза). На 5 день после сенсibilизации под апоневротическую пластинку правой задней конечности вводили 20 мкл суспензии ЭБ  $1 \times 10^8$  (разрешающая доза), в контрлатеральную лапу – 20 мкл физиологического раствора. Учет интенсивности воспалительной реакции проводили через 24 часа, животных забивали, обе лапки отрезали на уровне голеностопного сустава и взвешивали на торсионных весах ВТ-500. Индекс воспаления (ИВ) определяли по разнице массы опытной (О) и контрольной (К) лапки индивидуально для каждого животного по формуле:  $ИВ (\%) = (О - К) / К \times 100\%$ . Оценивали влияние исследуемых препаратов на клеточный иммунный ответ на стадии сенсibilизации и на стадии разрешения. Исследуемые препараты вводили по двум схемам: до введения сенсibilизирующей дозы (1-я схема введения) и перед введением раз-

Таблица 1 – Влияние препаратов *C. geoides* на клеточный иммунный ответ при постановке реакции ГЗТ

Условия стимуляции	Индекс воспаления в реакции ГЗТ, % (Медиана (25%÷75% квантили), n=8–10)	
	в обычных условиях	в условиях экспериментального иммунодефицита
1 схема ГЗТ (введение препаратов до сенсibilизирующей дозы антигена)		
Без стимуляции (контроль)	6,07 (2,58÷6,70)	1,86 (1,24÷4,17)
НЭ	6,32 (5,17÷8,00)	1,69 (0,86÷2,70)
С-1	2,71 (2,05÷7,14)	1,88 (1,74÷2,76)
С-2	3,54 (2,27÷7,20)	3,18 (1,83÷6,36)
2 схема ГЗТ (введение препаратов до разрешающей дозы антигена)		
Без стимуляции (контроль)	7,03 (4,29÷10,28)	2,99 (2,65÷3,84)
НЭ	3,53 (2,20÷5,78)	3,27 (1,42÷7,27)
С-1	13,21 (9,56÷18,82) *#	2,08 (1,67÷2,60) *
С-2	12,07 (7,82÷19,54) *#	2,49 (2,16÷5,03)

Примечание: различие достоверно при  $p \leq 0,05$  для показателей \* – контрольных и экспериментальных групп, # – групп животных, получавших исследуемые препараты и препарат сравнения.

решающей дозы (2-я схема введения) в течение 5-ти дней внутрь желудка в дозе 50 мг/кг в виде раствора в дистиллированной воде. Кроме того, у части животных моделировали вторичный иммунодефицит однократным внутрибрюшинным введением циклофосфана (ОАО «Биохимик», г. Саранск, разрешен к применению на территории России, рег. № 001579/01) за 5 дней до введения сенсибилизирующей дозы антигена (далее ЦФ) в максимальной переносимой дозе (250 мг/кг). В качестве препарата сравнения использовали официальную настойку эхинацеи пурпурной (ООО «Ватхэм-Фармация», г. Рязань, разрешена к применению на территории России, рег. № 000167.01–2000), далее НЭ. Животные контрольных групп получали вместо препарата растворитель в соответствующем объеме.

Полученные в ходе исследования результаты обрабатывали с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 19, представляли в виде медианы с 25% и 75% квартилями. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, различия между выборками считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

В результате проведенных исследований было выявлено, что препараты *C. geoides* оказывают влияние на развитие ГЗТ, наиболее выраженное на стадии разрешения (табл. 1).

На стадии сенсибилизации введение животным исследуемых препаратов не привело к достоверному изменению индекса воспаления как в обычных условиях, так и на фоне экспериментального иммунодефицита. Использование препарата сравнения (НЭ) также не влияло на процесс формирование клона антигенспецифических Т-лимфоцитов.

Введение препаратов С-1 и С-2 на стадии разрешения приводило к стимуляции воспалительной реакции: ИВ увеличился в 1,9 и 1,7 раза соответственно (табл. 1), что согласуется с результатами ранее проведенных исследований [1]. Препарат сравнения (НЭ) на способность антигенспецифических Т-лимфоцитов при встрече с антигеном продуцировать провоспалительные цитокины не оказывал влияния.

При экспериментальном иммунодефиците у животных контрольных групп происходило заметное угнетение клеточного иммунного ответа: ИВ снизился в 3,26 (1-я схема ГЗТ) и в 2,35 (2-я схема ГЗТ) раза. Исследуемые препараты и препарат сравнения не оказыва-

ли влияния на пролиферацию антигенспецифических Т-лимфоцитов. На продукцию провоспалительных цитокинов оказало влияние только введение препарата С-1, ИВ реакции ГЗТ был достоверно ниже показателя животных контрольной группы. Препарат С-2 и препарат сравнения на этой стадии на реализацию клеточного иммунного ответа влияния не оказывали.

Таким образом, препараты *C. geoides* оказывают влияние на клеточно-опосредованный иммунный ответ, стимулируя синтез провоспалительных цитокинов цитотоксическими Т-лимфоцитами. В условиях иммунодефицита иммунокорректирующими свойствами не обладают.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водолазова С. В., Агеева Е. С., Саранчина Ю. В. Влияние препаратов колюрии гравилатовидной на фагоцитарную активность и цитокинпродуцирующую способность лейкоцитов периферической крови. Дни иммунологии в Сибири: мат-лы Всероссийской научно-практ. конф. с межд. участием (Абакан, 26–27 апреля 2011 г.), 192–194.
2. Водолазова С. В., Мяделец М. А., Карпова М. Р., Саранчина Ю. В. Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из лекарственных растений Хакасии. Сибирский медицинский журнал 2011, 2, 54–58.
3. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып. 2. Медицина, Москва 1990, 160.
4. Дутова С. В., Карпова М. Р., Мяделец М. А. Иммунокорректирующее действие препаратов колюрии гравилатовидной при цитостатической болезни. Дни иммунологии в Сибири: мат. Всероссий. научно-практ. конф. (г. Кызыл, 20–21 июня 2013 г.), 54–56.
5. Дутова С. В., Неделькина Н. П., Карпова М. Р., Чумаков В. Ю. Протективное действие настойки *Coluria geoides* (Rosaceae) на модели генерализованной стафилококковой инфекции. Российский иммунологический журнал 2012, 3, 74–75.
6. Караулов А. В., Сокуренок С. И., Бармотин Г. В. Принципы иммунопрофилактики и иммунотерапии рецидивирующих респираторных заболеваний. Иммунопатология 2000, 1, 42–48.
7. Хаитов Р. М., Гущин И. С., Пинегин Б. В., Зебров А. И. Методические указания по изучению иммуотропной активности фармакологических веществ. В кн: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Медицина, Москва 2005, 505–506.
8. Цинзерлинг А. В. Современные инфекции. Патологическая анатомия и вопросы патогенеза. СПб 1993, 290.

## THE INFLUENCE OF DRUGS COLURIA GEOIDES (ROSACEAE) ON CELLULAR IMMUNITY

<sup>1</sup>Dutova C. V., <sup>2</sup>Karpov M. R., <sup>3</sup>Myadelets M. A.

<sup>1</sup>FGBOU VPO «Khakass state University n.a. N. F. Katanov», Abakan, <sup>2</sup>GBOU VPO Siberian state medical University of the Ministry of health of Russia, Tomsk, <sup>3</sup>FGBUN Central Siberian botanical garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

On mice line CBA/CaLac was investigated influence of drugs from the grass and underground bodies of oil-bearing plants of the family *Rosaceae* – *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. at various stages of the cellular immune response in the delayed-type hypersensitivity (DTH). The stimulating effect of the drugs C-1 and C-2 (obtained by the method of percolation with 40% and 70% ethanol) on the ability of antigen specific T-lymphocytes at the meeting with the antigen to produce Pro-inflammatory cytokines, which is consistent with previously conducted in vitro studies. Identified immunostimulating effect exceeded the effect of the drug comparison (of tincture of *Echinacea purpurea*). In experimental immunodeficiency statistically significant decreasing of index of inflammation on the stage of resolution DTH with the introduction of animal drug C-1.

*Key words: cellular immunity, medicinal plants, immunotropic effect.*

## ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ПОЛЛИНОЗА, ВЫЗВАННОГО ПЫЛЬЦОЙ ДЕРЕВЬЕВ, У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Емелина Ю. Н., Вахлова И. В.

Уральский государственный медицинский университет, Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург, Россия

Целью данного исследования было выявить особенности клинического течения поллиноза, вызванного пыльцой деревьев, оценить спектр сенсibilизации и иммунологические показатели у детей, проживающих на территории Свердловской области, для выбора адекватной терапии и оптимизации дальнейшего динамического наблюдения. Выявлена ранняя манифестация клинических проявлений пыльцевой аллергии, преобладание среднетяжелого и тяжелого течения АР, высокая распространенность сочетанных форм АЗ. У детей с поллинозом отмечена поливалентная сенсibilизация к различным группам аллергенов и дисбаланс в системе цитокинов с повышением выработки ИЛ-4 и ИФН $\gamma$ .

*Ключевые слова:* поллиноз, ИЛ-4, ИФН-гамма.

**Введение.** Распространенность симптомов аллергического ринита и бронхиальной астмы в Екатеринбурге составляет 47,1% и 38% соответственно (Бельтюков Е. К., Братухин К. П., Бирон А. К., 2011 г.). Развитие поллинозов вызвано сенсibilизацией к пыльце растений с последующей индукцией Th-2 лимфоцитов, активацией синтеза провоспалительных цитокинов (ИЛ-4 и др.), гиперпродукцией общего и специфических иммуноглобулинов E (IgE) и развитием аллергического воспаления на слизистой дыхательных путей и глаз [1]. Многие исследователи уделяют большое внимание изучению цитокинового профиля при аллергических заболеваниях (АЗ), а особен-

но – дисбалансу цитокинов Th-1 (ИФН $\gamma$  и др.) и Th-2 (ИЛ-4 и др.) лимфоцитов. [2, 3, 4].

Основным принципом на современном этапе развития медицины является персонализированный подход с учетом индивидуальных особенностей каждого конкретного пациента. Для разработки персонализированных диагностических и лечебных мероприятий необходимо иметь представление об особенностях формирования и течения патологии у населения, проживающего на определенной территории. Проживание детей в условиях воздействия неблагоприятных факторов, действующих на территории многих промышленных городов Свердловской области, ведет

к формированию болезней кожи и дыхательной системы, характеризующихся ранним дебютом и наличием поливалентной сенсибилизации [5, 6]. Изучение особенностей течения респираторной аллергии к пыльце растений у детей, проживающих на территории Свердловской области, является одним из этапов разработки персонализированных лечебных мероприятий при лечении поллиноза.

**Целью** данного исследования явилось проанализировать особенности течения поллиноза, вызванного пыльцой деревьев у детей, проживающих на территории Свердловской области.

**Материалы и методы.** Обследовано 63 человека в возрасте 5–17 лет, имеющих ежегодные аллергические проявления в апреле-мае на протяжении 2–13 сезонов цветения.

Спектр сенсибилизации исследовали с помощью скарификационных кожных проб (СКП) с водно-солевыми растворами пыльцевых, пищевых, бытовых и эпидермальных аллергенов производства Ставропольского института вакцин и сывороток. Иммунологическое обследование проводилось в периоде ремиссии и включало определение уровня общего и специфических иммуноглобулинов E (IgE) к пыльцевым и перекрестным аллергенам, определение цитокинов (ЦК) – интерлейкина 4 (IL-4) и интерферона-гамма (IFN-g) в сыворотке крови. Содержание общего IgE (МЕ/мл) определяли методом твердофазного ИФА с использованием наборов реагентов фирмы ООО «Хема-Медика» (Москва). Для определения уровня специфических IgE к миксту пыльцы деревьев, пыльце березы, яблоку и моркови использовали метод ИФА с реагентами фирмы Dr. Fooke Laboratorien GmbH, для определения IL-4 и IFN-g использовали тест-системы ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Статистическая обработка данных проводилась параметрическими методами с использованием пакета прикладных программ STATISTICA-6.

**Результаты и обсуждение.** Средний возраст составил  $9,7 \pm 0,4$  лет. Гендерная характеристика свидетельствовала о преобладании мальчиков среди обследуемых детей: 71,4% и 28,6% соответственно.

Первые высыпания на коже отмечались в возрасте  $4,9 \pm 4,9$  мес., первые проявления риноконъюнктивального синдрома (РКС) – в  $5,0 \pm 4,8$  лет, дебют бронхообструктивного синдрома (БОС) – в возрасте  $5,1 \pm 2,6$  лет, стаж

поллиноза до начала наблюдения составил  $5,0 \pm 0$  лет. У 100% обследуемых детей к началу наблюдения имелись сезонные проявления аллергического конъюнктивита (АК) и аллергического ринита (АР). Изолированные проявления со стороны слизистой глаз и носа отмечались только у 11,1% детей. У 88,9% ( $n=56$ ) отмечалось сочетание АРК с поражением нижних отделов дыхательной системы: у 22,2% – в виде гиперреактивности дыхательных путей (ГРДП) и у 66,7% – в виде БА. У 57,1% детей, имеющих проявления БА, диагноз был установлен впервые. У 20,6% детей респираторная аллергия сочеталась с проявлениями АД. Выявлено преобладание среднетяжелого персистирующего течения АР – 60,3%. Отмечена довольно высокая частота тяжелого течения АР – у 1/5 части детей (19,1%). При анализе степени тяжести БА выявлено преобладание легкого интермиттирующего и легкого персистирующего течения – 27,0% и 33,3% соответственно. У 20,6% детей ( $n=13$ ) имелся оральная аллергия, проявляющийся в виде отека или зуда в полости рта при употреблении в пищу перекрестных аллергенов косточковых фруктов и моркови. Из сопутствующей патологии неаллергического генеза преобладали заболевания ЖКТ, которые имели место у 36,5% детей и проявлялись в виде неуточненных функциональных кишечных нарушений 20,6% ( $n=13$ ), хронического гастрита 7,9% ( $n=5$ ) и ДЖВП 6,3% ( $n=4$ ).

При исследовании сенсибилизации по результатам волдырной реакции при проведении СКП выявлено, что сенсибилизация к пыльце деревьев имеется у 100%, причем моновалентная сенсибилизация к пыльце деревьев – только у 3,5% обследованных детей. У большинства детей (61,2%) отмечена скрытая сенсибилизация к пыльце луговых и сорных трав при отсутствии клинических проявлений в период цветения трав. При анализе спектра сенсибилизации обратило внимание, что практически половина детей (48,2%) сенсибилизирована к 4 группам аллергенов: пыльцевым, бытовым, эпидермальным и пищевым аллергенам, 16,5% – к пыльцевым, бытовым и пищевым аллергенам, 10,6% – к пыльцевым, бытовым и эпидермальным аллергенам и 12,9% – к пыльцевым и пищевым аллергенам.

При исследовании содержания общего IgE было отмечено значительное превышение нормативных значений и большой разброс

индивидуальных показателей у обследуемых детей – 365,8 МЕ/мл [160,0; 911,3]. Повышение содержания указанного Ig выявлено у 92,1% детей. У 100% детей наблюдалось повышение уровней специфических IgE к пыльце деревьев и березы, сывороточная концентрация которых была значительно выше нормы и также отличалась значительным разбросом индивидуальных значений: 10,3 МЕ/мл [2,7;16,4] и 10,5 МЕ/мл [2,3; 17,0] соответственно. У половины обследуемых детей (54,7%) было отмечено повышение специфического IgE к яблоку в сыворотке крови, средний уровень данного показателя составил 0,5 МЕ/мл [0;1,5]. Повышение уровня специфического IgE к моркови было менее отчетливым 0,4±0,3 МЕ/мл и отмечено только у 6,3% обследуемых детей. При исследовании ЦК в сыворотке крови выявлено повышение выработки IL-4 и IFN-g, являющихся главными функциональными медиаторами Th2- и Th1-лимфоцитов: 10,7 пг/мл [0;46,9] и 1000,0 пг/мл [677,3;1000,0] соответственно. У обследованных детей повышение уровня IFN-g отмечалось гораздо чаще, чем повышение концентрации IL-4, – 98,4% и 64,5% соответственно.

**Заключение.** 1. Выявлена ранняя манифестация пыльцевой аллергии к пыльце деревьев.

2. Отмечена высокая частота сочетанных форм аллергической патологии, что определяет тяжесть течения аллергического процесса.

3. Дети с проявлениями поллиноза имеют высокую частоту сопутствующей патологии в виде АЗ кожи и заболеваний ЖКТ. Это требует привлечения специалистов соответствующего профиля при динамическом наблюдении, заслуживает внимания при выборе метода лечебного воздействия и пути введения препаратов.

4. Показана высокая частота поливалентной сенсибилизации, что требует особого внимания при разработке индивидуальных планов наблюдения за детьми с поллинозом при проведении иммунотерапии для профилактики

снижения эффективности и учащения побочных реакций от проводимой терапии.

5. Дети с проявлениями респираторной пыльцевой аллергии имеют выраженные иммунологические нарушения в виде значительного повышения уровней общего и специфических IgE, а также нарушений баланса в системе цитокинов, регулирующих функциональную активность Th2- и Th1-лимфоцитов, с повышением выработки IL-4 и IFNγ. Оценка уровней IgE, IL-4 и IFNγ в динамике может быть использована для оценки эффективности лечебных мероприятий.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Детская аллергология/под ред. А.А. Баранова, И.И. Балаболкина. – М.: Гэотар-Медиа, 2006, 687 с.
2. Рябова Л.В., Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Черешнев В.А. Особенности иммунологических показателей в зависимости от фазы аллергического ринита// Аллергология и иммунология. 2009. Том 10. № 4. С. 469-473.
3. Манжос М.В., Феденко Е.С., Мягкова М.А., Молотилев Б.А., Шкадов С.А., Петроченко С.Н., Киселева Р.Ю. Диагностика состояния общего и местного гуморального иммунитета у больных поллинозом при сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии// Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. 2009. № 3. С. 27-31.
4. Contreras J. P., Ly N. P., Gold D. R., He H., Wand M., Weiss S. T., Perkins D. L., Platts-Mills T. A., Finn P. W. Allergen-induced cytokine production, atopic disease, IgE, and wheeze in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. Vol. 112. P. 1072-1077.
5. Плотникова И. А. Клинические маркеры отклонений в состоянии здоровья детей, обусловленные воздействием свинца// Уральский медицинский журнал. 2009. № 7 (61). С. 67-71.
6. Плотникова И. А., Ковтун О. П., Анохина Л. А. Токсические эффекты металлов, связанные с нарушением иммунного профиля у детей из районов с повышенной техногенной нагрузкой Свердловской области// Уральский медицинский журнал. 2009. № 7 (61). С. 60-66.

## FEATURES OF CURRENT HAY FEVER CAUSED BY POLLEN FROM TREES, AMONG CHILDREN LIVING IN THE SVERDLOVSK REGION

Emelina J., Vahlova I.

*Ural State Medical University, Regional Children's Clinical Hospital № 1, Ekaterinburg*

Children living in the Sverdlovsk region, revealed earliest manifestation of pollen allergy to pollen of trees, the high frequency of combined forms of allergic disease. Polyvalent sensitization was noted among the majority of the children surveyed. Was found a significant increase in the level of total and specific IgE, IL-4 and IFN-gamma in blood serum of children with hay fever in remission.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ С Treg-АССОЦИИРОВАННЫМИ ФЕНОТИПАМИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Жулай Г. А.<sup>1</sup>, Олейник Е. К.<sup>1</sup>, Головин А. В.<sup>2</sup>, Чуров А. В.<sup>1</sup>,  
Кравченко П. Н.<sup>1</sup>, Олейник В. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ ИБ КарНЦ РАН, <sup>2</sup>ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», Республика Карелия, Петрозаводск, Россия

Было исследовано содержание лимфоцитов с некоторыми фенотипами регуляторных Т-клеток (Treg) в периферической крови больных колоректальным раком (ККР, n=17) и здоровых доноров (n=13, контроль). Экспрессия молекул лимфоцитами оценивалась методом проточной цитометрии. В результате было обнаружено, что количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> Т-клеток у больных ККР не отличалось от контроля, тогда как содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Т-клеток было увеличено (p<0,05). Причем более существенные различия были получены для популяции CD8<sup>+</sup>Treg.

*Ключевые слова:* Treg-клетки, колоректальный рак, FOXP3, CD8.

Одной из наиболее актуальных проблем в онкоиммунологии является неясность природы резистентности опухолевых клеток к механизмам иммунологической защиты организма. В настоящее время в качестве способов «уклонения» опухоли от иммунологического надзора рассматриваются различные механизмы, такие как нарушение антигенной презентации (в частности отсутствие молекул МНС-I на поверхности опухолевых клеток), усиление оксидативного стресса, секреция супрессорных и проапоптотических факторов и ряд других [1]. В качестве одного из наиболее значимых механизмов рассматривается индукция иммунной супрессии при участии регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) [2].

Известно, что у онкологических больных происходит накопление субпопуляций Treg-клеток как в местах локализации опухоли и опухолевой ткани, так и в периферической крови, регионарных лимфатических узлах [2]. Было показано, что после хирургического удаления опухоли содержание Treg-клеток у больных значительно снижается, достигая уровня нормы, и увеличивается вновь при рецидиве заболевания. Отмечается, что увеличение числа Treg-клеток коррелирует со стадией рака, его гистологическим типом, а также выживаемостью

пациентов [2]. Все это свидетельствует об активной роли Treg-клеток в развитии опухоли и позволяет рассматривать их как прогностический фактор.

При колоректальном раке (ККР) также наблюдается увеличение числа Treg-клеток [3, 4]. Однако анализ их содержания, а также определение связи с выживаемостью больных в основном проводится среди опухолинфильтрирующих лимфоцитов, и сведения о FOXP3<sup>+</sup> Treg-клетках получены в большинстве случаев в результате применения иммуногистохимического анализа. Исследование популяции Treg-клеток в периферической крови больных колоректальным раком может стать более удобным прогностическим показателем. Однако популяция Treg-лимфоцитов весьма гетерогенна, и в настоящее время для определения этих клеток используют различные маркеры, самым надежным из которых является транскрипционный фактор FOXP3 (forkhead box P3). Экспрессия этого гена определяет супрессорную активность Treg-клеток и их развитие. Отличительной особенностью этих клеток является высокая конститутивная экспрессия α-цепи рецептора к интерлейкину (IL)-2 (CD25). Также для идентификации Treg-клеток может применяться мембранный мар-

кер CD127 (IL-7R $\alpha$ ), экспрессия которого находится в обратной зависимости от экспрессии FOXP3 [5]. В связи с этим целью исследования являлось изучение содержания некоторых популяций Treg-клеток в периферической крови больных ККР.

**Материалы и методы.** В работе были обследованы образцы периферической крови 17 больных ККР (I–IV стадии) средний возраст которых составил 68,8 $\pm$ 9,7 лет (от 44 до 90 лет). Контрольную группу составили 13 здоровых доноров в возрасте 42,0 $\pm$ 13,5 лет (от 25 до 65 лет). Анализ лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500, с применением программного обеспечения СХР 2.0 («Beckman Coulter», США). Для определения Treg-клеток были использованы моноклональные антитела: CD4-FITC, CD8-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7 («Beckman Coulter», Франция), FOXP3-PE (eBioscience, США). Фиксацию и пермеабиллизацию лимфоцитов выполняли с помощью набора для детекции FOXP3 (eBioscience, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0», достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна-Уитни при уровне значимости  $p < 0,05$ , для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде  $M \pm SD$ .

**Результаты и обсуждение.** В работе была проведена оценка относительного содержания лимфоцитов с основными Treg-ассоциированными фенотипами CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, а также клеток с фенотипом CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> в крови больных ККР, результаты которой представлены в таблице 1.

В ходе анализа было показано, что существует положительная корреляция между содержанием в крови больных ККР CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg-клеток и клеток с фенотипами CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> ( $r=0,76$ ,  $p < 0,001$ )

и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> ( $r=0,76$ ,  $p < 0,001$ ). Количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> Treg-клеток в периферической крови больных ККР не отличалось от контроля. С другой стороны содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg-клеток у больных ККР было достоверно выше, чем у здоровых доноров (табл. 1). Ряд авторов подчеркивает, что число Treg-клеток у больных раком, в том числе и ККР, увеличено в опухолевой ткани по сравнению с периферической кровью [2, 3, 4]. Предполагается, что опухолевые клетки могут использовать определенные механизмы для привлечения и накопления Treg-клеток в своем микроокружении. К ним относятся, например, экспрессия хемокинов (CCL22, CCL5, CXCL12), стимуляция экспансии, а также *de novo* генерация Treg-клеток из наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-клеток [2, 6]. Так Curiel и соавт. у больных раком яичников показали роль экспрессии клетками опухолевого микроокружения хемокина CCL22, который обуславливает направленную миграцию Treg клеток, экспрессирующих рецептор CCR4 к этому хемокину [7]. Мы оценили экспрессию CCR4 в популяции периферических Treg-клеток больных ККР. Оказалось, что уровень экспрессии этой молекулы CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> T-клетками у больных ККР составил 89,87 $\pm$ 8,7% и 86,53 $\pm$ 9,5% от CD4<sup>+</sup> T-клеток и был выше по сравнению с контролем (74,79 $\pm$ 9,1% и 72,95 $\pm$ 13,4% от CD4<sup>+</sup> T-клеток, соответственно,  $p < 0,01$ ). Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения, что при развитии опухоли происходит перераспределение популяции Treg-клеток и их активная миграция в опухолевое микроокружение.

В отношении субпопуляции CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg-клеток, супрессорная активность которой была продемонстрирована как при ККР [8], так и при других солидных опухолях [2, 9], нами были получены интересные результаты. Было показано, что у обследованных больных ККР содержание этих клеток в 4 раза превы-

**Таблица 1.** Относительное содержание субпопуляций Treg-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных ККР

	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> , % от CD4 <sup>+</sup> T-клеток	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>lo</sup> , % от CD4 <sup>+</sup> T-клеток	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> , % от CD4 <sup>+</sup> T-клеток	CD8 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> , % от CD8 <sup>+</sup> T-клеток
контроль, n=13	4,03 $\pm$ 1,7	3,30 $\pm$ 0,8	3,41 $\pm$ 0,7	0,50 $\pm$ 0,5
ККР, n=17	3,83 $\pm$ 0,8	3,32 $\pm$ 0,8	4,68 $\pm$ 1,7*	2,04 $\pm$ 0,6*

Примечание. \* – различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$

шалось количество CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg-клеток у здоровых доноров ( $p < 0,001$ , табл. 1). Чапут и соавт. также показали, что у больных ККР происходит накопление CD8<sup>+</sup> T-клеток, экспрессирующих FOXP3, не только в периферической крови, но и в опухолевой ткани больных по сравнению с нормальной аутологичной тканью кишечника [8].

Исследование популяций лимфоцитов у больных ККР носит особый интерес, поскольку именно для этой локализации опухоли доказана связь прогрессии опухоли с недостаточной иммунной реакцией [4]. Одним из прогностических маркеров для ККР были предложены опухоль-инфильтрирующие CD8<sup>+</sup> T-лимфоциты, цитотоксическая активность которых играет важную роль в противоопухолевом иммунном ответе. Кроме того, показано, что более информативным является применение соотношения опухоль-инфильтрирующих CD8<sup>+</sup> T-клеток и FOXP3<sup>+</sup> T-клеток [4]. В работе мы оценили баланс этих клеток в периферической крови больных ККР и здоровых доноров. В результате анализа соотношения CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-клеток было выявлено, что у больных ККР ( $5,75 \pm 1,8$ ) это значение снижено по сравнению с контролем ( $7,81 \pm 2,5$ ,  $p < 0,05$ ). Более существенные различия были получены при оценке соотношения CD8<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. У больных ККР этот показатель составил  $13,99 \pm 6,6$ , что почти в 5 раз меньше, чем в контроле ( $75,45 \pm 52,32$ ,  $p < 0,001$ ).

**Заключение.** В результате анализа лимфоцитов по нескольким фенотипам, ассоциированным с супрессорной активностью, в пе-

риферической крови больных и здоровых лиц мы наблюдали достоверное повышение Treg-клеток у больных ККР только при использовании маркера FOXP3. При этом наибольшее различие с контролем было показано для CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg клеток. Вероятно, для разработки прогностических факторов, определяемых в периферической крови больных ККР, использование этой популяции будет более показательным.

Исследование выполнено с применением приборов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН (ЦКП НО ИБ КарНЦ РАН) и при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-98826).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rabinovich G. A., Gabrilovich, D., Sotomayor E. M. Annu. Rev. Immunol. 2007, 25, 267-296.
2. Mougiakakos D., Choudhury A., Lladser A., Kiessling R., Johansson C. C. Advances in Cancer Research. 2010, 107, 57-117.
3. Deng L., Zhang H., Luan Y., Zhang J., Xing Q. et al. Clin Cancer Res. 2010, 16, 4105-4112
4. Ling K. L., Pratap S. E., Bates G. J., Singh B., Mortensen N. J. et al. Cancer Immun. 2007, 7, 7
5. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., Zaunders J., Sasson S. et al. J. Exp. Med. 2006, 203, 1693-1700
6. Qin F. X. – F. Cell Mol Immunol. 2009, 6, 3-13.
7. Curiel T. J., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P. et al. Nat Med. 2004, 10, 942-949.
8. Chaput N., Louafi S., Bardier A., Charlotte F., Vailant J. C. et al. Gut. 2009, 58, 520-529.
9. Kiniwa Y., Miyahara Y., Wang H. Y., Peng W., Peng G. Et al. Clin Cancer Res. 2007, 13, 6947-6958.

### THE DEFINITION OF LYMPHOCYTES WITH TREG-RELATED PHENOTYPES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Zhulai G. A., Oleinik E. K., Golovin A. V., Churov A. V., Kravchenko P. N., Oleinik V. M.

Lymphocytes with regulatory T cell (Treg) phenotypes was examined in peripheral blood of patients with colorectal cancer (CRC,  $n = 17$ ) and healthy donors ( $n = 13$ , controls). Expression of molecules was assessed by flow cytometry. As a result, it was found that the amount of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> T cells in patients with CRC was not different from control, whereas the content of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells was increased ( $p < 0,05$ ). And more significant differences were obtained for the population CD8<sup>+</sup> Treg.

## МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ДИАГНОСТИКЕ НАРУШЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

Зайцева Н. В.<sup>1</sup>, Дианова Д. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» <sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Пермская фармацевтическая академия»

**Резюме.** Методом проточной цитофлуориметрии изучены изменения показателей иммунной системы детей, проживающих в условиях повышенной техногенной химической нагрузки. Установлено, что у обследуемых детей в условиях экспозиции стронцием статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижена экспрессии ранних (CD25<sup>+</sup>) и поздних (CD95<sup>+</sup>) активационных антигенов на иммунокомпетентных клетках. Таким образом, CD-типирование при помощи проточной цитометрии позволяет идентифицировать ранние нарушения иммунного статуса в условиях техногенной экспозиции.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, иммунная система, CD, стронций.

**Введение:** Проточная цитометрия является интегральным инструментом изучения различных биологических систем с помощью регистрации флуоресценции и использования флуоресцентных красителей, способных связываться с различными компонентами клетки и, несомненно, имеет важное значение для оценки иммунного статуса в лечебно-диагностической деятельности врача [6]. Однако спектр используемых критериев не всегда отвечает требованиям современной медицины и запросам практикующих врачей. В частности, констатируется ограниченность методов иммунофенотипирования в трактовке клинической картины конкретного пациента, проживающего на техногенно-нагруженных территориях [4].

**Цель работы** – оценить особенности отдельных показателей клеточного звена иммунной системы у детей, экспонированных стронцием с использованием проточной цитометрии.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на примере детского населения, проживающего в различных условиях среды обитания. Биомедицинские диагностические исследования у детей выполнены в соответствии с обязательным соблюдением этических принципов медико-биологических исследований, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 года с дополнениями 1983 года. Критерии

включения в исследование: возраст детей от 4 до 7 лет, проживание на исследуемых территориях. Критерии исключения: невозможность или нежелание родителей обследуемых детей дать информационное согласие на участие в исследовании, участие обследуемых детей в другом исследовании. Все родители (опекуны) подписали информированное согласие на участие в исследовании и использовании персональных данных. Группу наблюдения составили 113 детей постоянно проживающие на территории, где в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения выступают воды с низким качеством питьевой воды по санитарно-химическим показателям (территория наблюдения). Группу контроля составили 100 детей, проживающие на территории относительного санитарно-гигиенического благополучия, где в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения используются подземные грунтовые воды (контрольная территория). Группа наблюдения и контрольная группа были сопоставимы по возрастному и гендерному составу. Выборка обследуемых была достаточна для достоверного определения межгрупповых отличий.

Исследование биосред (кровь) на содержание металлов (стронций) выполнено на атомно-абсорбционном спектрофотометре

фирмы «Perkin Elmer 3110» (США) в соответствии МУК МЗ РФ № 763–99–4.1.779-99. Определение популяций лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>) проводили методом мембранной иммуофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител к мембранным CD-рецепторам «Becton Dickinson» («BD», США).

Для выбора критериев оценки значимости межгрупповых различий средних проверяли соответствие формы выборочных распределений нормальному, используя критерий  $\chi^2$ , а также контролировали равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. В случае отклонения от нормального распределения, для сравнения данных использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При соответствии данных нормальному распределению использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты исследования представлены в виде среднего значения (*M*) и ошибки средней (*m*) изученных показателей. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (*p*), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05 [2, 8].

**Результаты исследования.** По результатам химико-аналитических исследований установлено, что в образцах крови детей группы наблюдения статистически значимо ( $p < 0,05$ ) в 2,9 раза повышено содержание стронция

относительно среднегруппового содержания анализируемого компонента в биосредах детей контрольной группы (табл. 1). Оценка иммунного статуса всех обследуемых выявила, что у детей, проживающих в условиях внешнесредового воздействия стронция, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижено количество CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов и CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов (по относительной и абсолютной величине) по отношению к результатам, полученным у детей, проживающих на территории относительного санитарно-гигиенического благополучия.

Одним из перспективных направлений изучения иммунного статуса является анализ активационного профиля субпопуляций лимфоцитов. Определение экспрессии на поверхности лимфоцитов CD25-, CD95-молекул является наиболее простым и эффективным способом оценки активационных процессов в иммунной системе [7]. На сегодняшний день известно большое количество активационных молекул экспрессирующихся на мембране лимфоцитов. CD25, CD95 активационные антигены дифференцировочного характера [9]. CD25 рассматривают как ранний активационный маркер, а CD95 – как поздний активационный маркер [1, 7].

Экспрессия CD25 является обязательным этапом активации иммунной системы и признаком готовности лимфоцитов к вступлению в пролиферацию и дифференцировку. В качестве одного из апоптотических мар-

Таблица 1. Маркеры экспозиции и маркеры эффекта иммунной системы у детей, проживающих в зоне внешнесредового воздействия стронция (*M*±*m*)

Показатели	Контрольная группа ( <i>n</i> =100)	Группа наблюдения ( <i>n</i> =113)
Стронций, мг/дм <sup>3</sup>	0,0442±0,00424	0,11055±0,01111 <sup>p</sup>
CD3 <sup>+</sup> , %	72,58±0,74	68,471±2,513
CD3 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	1,83±0,06	2,296±0,296
CD4 <sup>+</sup> , %	40,60±0,99	37,765±2,509
CD4 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	1,02±0,04	1,251±0,152
CD8 <sup>+</sup> , %	25,94±0,77	24,882±2,211
CD8 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,66±0,03	0,845±0,142
CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> , %	11,56±0,75	10,471±1,657
CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /л	0,29±0,02	0,356±0,076
CD25 <sup>+</sup> , %	6,29±0,30	4,70±0,53 <sup>p</sup>
CD25 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> / дм <sup>3</sup>	0,16±0,01	0,15±0,02 <sup>p</sup>
CD95 <sup>+</sup> , %	27,13±1,05	15,82±1,60 <sup>p</sup>
CD95 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> / дм <sup>3</sup>	0,67±0,03	0,52±0,08 <sup>p</sup>

Примечание: <sup>p</sup> – различие между группой наблюдения и контрольной группой по средним величинам  $p < 0,05$ .

керов, позволяющих судить о степени негативной активации иммунокомпетентных клеток, используют CD95-маркер, экспрессируемый мембранами активируемых мононуклеаров. Fas-антиген – при взаимодействии с Fas-лигандом запускает процессы апоптоза в клетке после ее активации и выполнения возложенной на нее функции, позволяет выявить способность иммуноцитов к иммунному ответу. В настоящее время модуляция апоптоза иммунокомпетентных клеток рассматривается как возможный подход к терапии ряда заболеваний иммунной системы [3, 5], однако не всегда при иммунодиагностике оценивают основные маркеры апоптоза. Очевидно, существует необходимость включения в иммунограмму определение ранних (CD25<sup>+</sup>) и поздних (CD95<sup>+</sup>) маркеров активации, участвующих в протективном ответе и в патологии, для своевременной и эффективной диагностики, а также для создания новых мер профилактики и терапии аутоиммунных и пролиферативных заболеваний [4].

**Выводы.** Таким образом, у детей, проживающих в условиях хронического внешнесредового воздействия стронция, отмечается изменение активационных маркеров клеточного иммунитета, что может являться одним из патогенетических механизмов развития дисфункции иммунной системы. Установлено, что у обследуемых детей в условиях экспозиции стронцием достоверное ( $p < 0,05$ ) изменение иммунного ответа сопряжено со снижением экспрессии ранних (CD25<sup>+</sup>) и поздних (CD95<sup>+</sup>) активационных антигенов на иммунокомпетентных клетках. Использо-

вание лазерной проточной цитофлуорометрии дает возможность получить важнейшие характеристики иммунного статуса, что позволяет уточнить особенности ответной реакции экспонированного химическим фактором организма.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булгакова В. А. Педиатрия 2009, 8 (2), 12-18.
2. Гланц С: Медико-биологическая статистика; [под редакцией Н. Е. Бузикашвили]. Практика, Москва 1998, 459.
3. Дианова Д. Г., Зайцева Н. В., Долгих О. В. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» Москва 2014, II, 377-379.
4. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г., Лыхина Т. С., А. В. Кривцов и др. Биологические мембраны 2012, 29 (5), 349-353.
5. Миннебаев М. М., Бойчук С. В. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и патологии. КГМУ, Казань 2002, 34.
6. Петров Р. В., Лопухин Ю. М., Череев А. Н., Ковальчук Л. В., Лебедев К. А.. Оценка иммунного статуса человека: Методические рекомендации. Молодая гвардия, Москва 1984, 101.
7. Порядин Г. В. Молекулярные и клеточные механизмы иммунопатологии (Состояние и перспективы развития исследований): Актовая речь. РГМУ, Москва 2008, 48.
8. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины. Медиа Сфера, Москва 1998, 352.
9. Хаитов Р. М., Пинегин В., Истамов Х. И. Экологическая иммунология. Изд-во ВНИРО, Москва 1995, 225.

## METHOD OF FLOW CYTOMETRY IN THE DIAGNOSTICS OF IMMUNE SYSTEM DISORDERS IN CHILDREN LIVING IN CONDITIONS OF ANTHROPOGENIC IMPACT

<sup>1</sup>Zaitseva N. V., <sup>1,3</sup>Dianova D. G.

<sup>1</sup>FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies",  
<sup>2</sup>SBEI of HPE "Perm Pharmaceutical Academy"

By means of flow cytometry method the changes of immune system indicators in children living in conditions of increased anthropogenic chemical load have been studied. It was defined that in the examined children, exposed to strontium, the expression of early (CD25<sup>+</sup>) and late (CD95<sup>+</sup>) activation antigens in immunocompetent cells is reduced significantly ( $p < 0.05$ ). Thus, CD- typing by flow cytometry allows us to identify early disorders of immune status in terms of anthropogenic exposure.

*Keywords: flow cytometry, immune system, CD, strontium.*

## СИСТЕМАТИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К ИЗУЧЕНИЮ СПЕКТРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ

Зурочка А. В.<sup>1</sup>, Зурочка В. А.<sup>1</sup>, Добрынина М. А.<sup>1</sup>, Зуева Е. Б.<sup>1</sup>,  
Гольцова И. А.<sup>1</sup>, Гриценко В. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБГУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, <sup>2</sup>ФБГУН  
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Выявлен спектр биологической активности синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ, включающий антибактериальную, иммуностимулирующую и репаративную активность. Это позволило сформировать новые подходы к изучению и систематизации механизмов действия данного соединения на различные ткани и биологические объекты. Было выявлено, что пептид обладает не только прямым бактерицидным действием, но и снижает биопленкообразование у широкого спектра грамотрицательных и грамположительных бактерий. Пептид, так же оказывает выраженное репаративное действие на кожные покровы и восстанавливает раневые дефекты слизистых оболочек, при этом скорость их заживления увеличивается примерно в 2 раза и способствует восстановлению нормального биоценоза влагалища.

*Ключевые слова:* Синтетический пептид, ГМ-КСФ, антибактериальная, иммуностимулирующая, репаративная активность.

**Введение.** Известно, что различные иммуностимулирующие пептиды, в том числе активные центры цитокинов обладают широким спектром активности, свидетельствующей о плейотропных механизмах их действия. Наиболее перспективными из них являются синтетические аналоги активного центра ГМ-КСФ [1, 2, 3, 4]. Так, авторами были получены первые данные о наличии у этих препаратов иммуностимулирующей (помимо стимуляции костномозгового кроветворения) активности, такой как, стимуляции реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) [2], активности созревания гранулоцитов в культуре стволовых клеток [1, 2]; антибактериальной активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий [3, 4, 5]. На модели кожной раны были получены данные о выраженном стимулирующем и репаративном эффекте с восстановлением волосяного покрова без образования рубца. Все эти данные были подтверждены гистологически [6]. При исследовании влияния пептида при радиационном поражении в эксперименте было показано высокая эффективность данного препарата на восстановление и функциональную

активность гранулоцитарного звена иммунитета [7].

Все это определило формирование новых подходов к дальнейшему исследованию и систематизации подходов к изучению спектра биологической активности перспективного препарата обладающего комбинированным воздействием на различные системы организма и бактерии.

**Целью** настоящего исследования явилось систематизация исследований по изучению механизмов антибактериального и репаративного действия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на различных биологических моделях.

**Материалы и методы.** Изучали активность и доза-зависимые эффекты пептида ZP 2 (химическая формула - THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO). Синтез пептида проводился твердофазным способом на синтезаторе «Applied Biosystems 430A» по методу *in situ* с использованием N $\alpha$ -Boc-защищенных производных аминокислот. Для блокирования боковых цепей трифункциональных аминокислотных остатков использованы защитные группы бензильного и уретанового типов.

Присоединение аминокислотных остатков проводили методом 1-гидроксibenзотриазоловых эфиров, используя 5 кратные избытки реагентов. По завершении сборки полипептидной цепи пептидил полимер обрабатывали жидким фтористым водородом по Sn1/Sn2 механизмам в присутствии скавенджеров. Продукт высаживали диэтиловым эфиром и очищали методом препаративной обращенно-фазовой хроматографии до гомогенного состояния. Конечные продукты охарактеризованы данными аминокислотного и масс-спектрального анализов и аналитической ОФ ВЭЖХ. Аминокислотный состав и молекулярный вес полученных соединений соответствовал теоретическим. Чистота соединений по данным аналитической ОФ ВЭЖХ была не менее 95% [5].

Была изучена антибактериальная активность пептида в бульонной культуре бактерий, в концентрации от 100 мг/мл до 10 мкг/мл в качестве тест штаммов были использованы бактерии семейств *Staphylococcus*, *E.coli*, *Micrococcus*. В каждом семействе было протестировано по 10 штаммов бактерий, а так же было исследовано действие различных концентраций пептида на рост и размножение бактерий в бульонной культуре в течение 24 часов. Одновременно были изучены комбинации пептида в различных дозировках и тромбоцитарного катионного белка, лизоцима и вещества из супернатанта клеток CD34<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> в тех же концентрациях на рост и размножение бактерий. В последующем на этих же штаммах микроорганизмов было изучено влияние пептида и его комбинаций с другими веществами на биопленкообразование бактерий [8]. Следующим этапом исследований было изучение дозозависимых эффектов синтетического пептида ГМ-КСФ на репарацию слизистых после проведения хирургического лечения – радиоволновой эксцизии цервикальной дисплазии шейки матки. В исследование были включены 47 женщин с дисплазией шейки матки 1, 2 и 3 ст. в возрасте от 21 до 44 лет, которым было показано хирургическое лечение.

Хирургическое лечение проводилось с использованием высокочастотного радиохирургического прибора «Сургитрон» (производство USA). Для лечения всех пациенток был выбран метод петлевой эксцизии объемом в пределах здоровых тканей.

Перед проведением хирургического лечения – радиоволновой эксцизии ШМ- все паци-

ентки прошли обследование: сбор инфекционного, гинекологического и аллергического анамнеза, а так же было поведено бактериоскопическое, онкоцитологическое, кольпоскопическое, молекулярно-биологическое (ПЦР на ВПЧ, хламидии, уреаплазму, микоплазму) исследование.

Для определения эффективности местного применения раствора пептида в послеоперационном периоде и для выявления и его оптимальной концентрации, пациентки были разделены на 5 групп: 1 – контрольная – без применения пептида – 10 чел., 2 – с применением 10 мкг/мл р-ра пептида – 8 чел., 3 – с применением 20 мкг/мл р-ра пептида – 9 чел., 4 – с применением 40 мкг/мл р-ра пептида – 11 чел., 5 – с применением 80 мкг/мл р-ра пептида – 9 чел.

После проведения радиоволновой эксцизии шейки матки по поводу CIN, пациентки использовали раствор пептида в виде вагинального спрея в течение 5 дней по 3 впрыскивания во влагалище 2 раза в день, что составило примерно 1 мл раствора активного вещества соответственно в каждой группе (концентрации указаны выше).

В послеоперационный период женщины находились под наблюдением 22 дня: осмотр проводили на 2–3 день, на 5–7 день, на 10–12 день и на 20–22 день.

Критериями эффективности лечения явились динамические изменения клинических симптомов: толщина струпа на послеоперационной ране, скорость его отторжения, площадь эпителизации, количественное и качественное состояние отделяемого из раны, изучение цитологических мазков отделяемого цервикального канала, влагалища, и проводилось бактериологическое исследование влагалища.

**Результаты и обсуждение.** Исследования показали, что пептид в широком диапазоне доз обладает бактерицидной активностью, влияя на рост и размножение бактерий в бульонной культуре. Отмечено, что при различных комбинациях с препаратами, такими как тромбоцитарный катионный белок, лизоцим, вещество из супернатантов клеток CD34<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> выявлялось потенцирование действия комбинированных препаратов в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, при этом для достижения одинакового эффекта необходимы меньшие концентрации препаратов. Как сам пептид,

так и его комбинации с вышеуказанными препаратами снижал биопленкообразование бактерий, при этом комбинации препаратов была более эффективна, чем каждый препарат в отдельности и антибиопленкообразование усиливалось при меньших дозах препаратов. Учитывая, что все препараты относятся к веществам, полученным с биологических объектов, не исключено, что в организме способны работать их комбинации потенцируя и усиливая действие пептида активного центра ГМ-КСФ и наоборот пептид способен усиливать действие этих веществ в организме, что расширяет возможности применения данного препарата.

Исследование репарационных свойств пептида показало, что в группах женщин после электроэксцизии с использованием пептида была отмечена быстрая положительная клиническая динамика, которая сопровождалась хорошим косметическим эффектом, отсутствием кровотечения после отторжения струпа и качественно лучшим заживлением послеоперационной раны уже к 10 суткам после электроэксцизии (в контроле заживление происходило на 20-22 сутки). При этом у женщин раньше нормализовалась цитологическая картина мазков цервикального канала и вагинального секрета, снижалась обсемененность влагалища кокковой флорой, восстанавливался нормальный биоценоз данного эпитопа. Все это выявлялось на фоне усиления выхода нейтрофилов в цервикальный канал. Возможно, активация нейтрофильного звена иммунитета способствует более быстрому очищению влагалища от кокковой флоры и условно-патогенных микроорганизмов и способствует нормализации влагалищного микробиоценоза и дополняет прямые бактерицидные эффекты данного препарата.

Полученные данные свидетельствуют о том, что местная терапия с использованием пептида позволила сократить сроки заживления в среднем на 10 дней, предотвратить развитие таких осложнений послеоперационного периода, как кровотечение вследствие отхождения струпа, обострение хронических воспалительных процессов шейки матки и образование стеноза шейки матки. Оптимальная доза препарата составила 40 мкг/мл по предложенной схеме лечения.

Таким образом, проведенные исследования позволили систематизировать исследования и получить новые сведения о меха-

низмах действия и спектре новых свойств синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ и тем самым расширить возможности его применения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жемчугов В.Е., Зурочка А.В., Румянцев Н.Г. Стимулятор роста костномозговых клеток человека. Патент № 2136308 от 10.09.1999.
2. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г.. Иммунологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ // Цитокины и воспаление.– 2010.– Т. 9.– № 3.– С.53
3. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Костоломова Е.Г. Плейотропные эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. //Вестник уральской медицинской академической науки. Тематический выпуск по аллергологии и иммунологии.– 2010.– № 2/1 (29).– С.35
4. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г., Аргунова Е.Г., Субботин А.М., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Антибактериальные свойства синтетических пептидов активного центра GM-CSF. // Цитокины и воспаление.– 2010.– т. 9.– № 4.– С.32-34.
5. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Костоломова Е.Г., Добрынина М.А., Суховой Ю.Г., Гриценко В.А., Симбирцев А.С. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств различных синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и веществ, полученных из супернатантов CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> клеток предшественников гемопоэза. Цитокины и воспаление.– С.– Петербург, 2012, Т. 11.–№ 2–С.96-99
6. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Сравнительные эффекты клеток фенотипа CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> и синтетических пептидов активного центра GM-CSF на процессы репарации кожной раны в эксперименте. Цитокины и воспаление.– С.– Петербург, 2012, Т. 11.–№ 4–С.21-25
7. А.В. Аклеев, Г.А. Тряпицын, А.С. Симбирцев, А.А. Аклеев, Е.А. Пряхин, А.В. Зурочка. Влияние синтетического пептида активного центра GM-CSF на восстановление гемопоэза у мышей C57BL/6 после фракционированного облучения. Радиационная биология. Радиоэкология.2014 т. 54, № 2, с.117-126
8. Чеботарь И.В., А.Н. Маянский, Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чиятякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012.– т. 1цервикального канала и4.– № 1.– с.51-58

## SYSTEMATIZATION OF APPROACHES TO STUDYING OF A RANGE OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF SYNTHETIC PEPTIDES OF THE KSF GM-ACTIVE CENTER

A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, M. A. Dobrynina, E. B. Zuyeva, I. A. Goltsova, V. A. Gritsenko

The range of biological activity of synthetic peptide of the KSF GM-active center, including antibacterial, immunotropic and reparation activity is revealed. It allowed to create new approaches to studying and systematization of mechanisms of action of this connection on various fabrics and biological objects. It was revealed that peptide possesses not only direct bactericidal action, but also reduces biofilm formation at wide range GR-otritsatelny and Gr-polozhitelny bacteria, has the expressed reparation effect not only on skin wounds, but also restores wound defects mucous, thus the speed of healing of wounds increases approximately twice, promotes restoration of a normal biocenosis of a vagina.

---

## ВЛИЯНИЕ ТРОМБОДЕФЕНСИНОВ ЧЕЛОВЕКА НА АПОПТОЗ И КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Иванов Ю. Б., Гриценко В. А.

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

Целью данного исследования было изучение влияния тромбодифенсинов (ТД) на апоптоз и клеточный цикл опухолевых клеток *in vitro*. Полученные результаты показали, что препарат ТД не является токсичным для клеток Wnt-1 и не оказывает прямого действия на пролиферацию клеток и экспрессию ими поверхностных маркеров.

*Ключевые слова:* тромбодифенсины, апоптоз, опухолевые клетки.

**Введение.** Онкологические заболевания представляют труднейшую и не решенную до настоящего времени проблему медицины. В связи с этим наряду с многочисленными направлениями исследований в этой области особое внимание уделяют поиску адекватных терапевтических средств в области онкологии.

Существующие на сегодняшний день противоопухолевые препараты, помимо позитивного влияния, оказывают токсические эффекты на нормальные органы и ткани. Поэтому необходимость поиска новых и более безопасных лекарственных средств актуальна. Описано противоопухолевое действие катионных низкомолекулярных пептидов, являющихся факторами врожденного иммунитета и выделяемых из нейтрофилов и тканей эпителиального происхождения (дефенсины, протегрины и т.д.), действующих как эндогенные, природные антибиотики и обладающих антивирусной, цитотоксической, хемотаксической, иммуномодулирующей активностью [1–3].

Установлен факт наличия способности выделять эндогенные пептиды (тромбодифенсины – ТД) у тромбоцитов человека [4]. Данные пептиды относятся к «острофазным» белкам, содержание которых в биологических жидкостях резко повышается при стрессе, инфекционной патологии и неопластических процессах [5]. Ранее нами было установлено противоопухолевые эффекты ТД в отношении рака молочной железы на модели *in vivo* [6].

В связи с этим, целью данной работы явилось изучение антионкогенных механизмов ТД на модели *in vitro*.

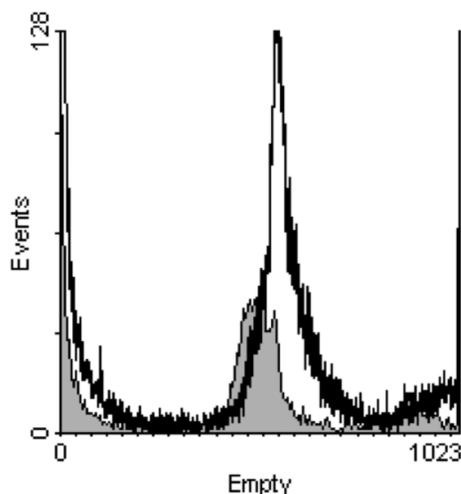
В работе использовали первичные культуры клеток рака молочной железы мышей Wnt-1. ТД человека получали и стандартизовали как описано ранее [7].

Для оценки влияния препарата на апоптоз и клеточный цикл клетки рассевали на чашки Петри 60 мм в полной культуральной среде. Клетки наращивали до полуконфлюэнтного монослоя и затем добавляли ТД в концентра-

ции 50 мкг/мл. В контрольную чашку добавляли фосфатный буфер в том же разведении. Чашки инкубировали 24 ч. По окончании инкубации клетки трипсинизировали, переводили в фосфатный буфер с 1% бычьим альбумином, 0,05% NaN<sub>3</sub>, 0,05% сапонином и окрашивали йодистым пропидием (50 мкг/мл) 1 час при +4°C. Анализ доли апоптотических клеток, доли клеток в G1, G2 и S фазах проводили на проточном цитометре FACScan (BD).

Для анализа влияния ТД на пролиферацию опухолевых клеток Wnt-1 получали стандартизованную культуру клеток как описано выше. Полученный препарат вносили в широкий диапазоне доз к клеткам в двух режимах. В первом случае препарат вносили одновременно с клетками при пересеве для анализа влияния на адгезию клеток к пластику. Во втором случае препарат в широком диапазоне доз вносили через сутки после пересева. Препараты инкубировали 24 или 48 ч. Анализ проводили по восстановлению соли тетразолия до формазана. ТД не оказывали влияния на численность клеточной популяции Wnt-1 ни в одном из режимов внесения.

Препарат ТД в выбранных дозах также не изменял клеточного цикла и не вызывал апоптоза (Рис).



Препарат вносили в дозе 50 мкг/мл через сутки после пересева по достижении клетками состояния адгезии при полуконфлюентной плотности культур. Инкубировали 24 ч, трипсинизировали, фиксировали/пермебиализовывали, окрашивали йодистым пропидием и оценивали клеточный цикл. Серым показан контроль, черным – культура с ТД.

Известно, что опухолевые клетки независимо от их природы выделяют вещества, угнета-

ющие или нарушающие нормальное функционирование иммунной системы [3]. Введение в организм известных медиаторов иммунной системы (интерферонов, интерлейкинов, колониестимулирующих факторов), являющихся естественными продуктами иммунокомпетентных клеток, оказывает в ряде случаев выраженный противоопухолевый эффект [8].

В этой связи, ТД, являясь факторами врожденного иммунитета, свое противоопухолевое действие, вероятно, оказывают опосредованно через иммунную систему. В пользу этого предположения говорят полученные нами данные *in vitro* по отсутствию прямого действия на апоптоз и клеточный цикл клеток Wnt-1, а также имеющиеся на сегодняшний день литературные данные об иммуномодулирующем действии катионных низкомолекулярных эндогенных пептидов, выделенных из нейтрофилов и тканей эпителиального происхождения – дефензинов, протегринов и др. [2].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boman H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Internal Med.* 2003, 254, 197-215.
2. Johnstone S.A., Gelmon K., Mayer L.D., Hancock R.E., Bally M.B. In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. I. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines. *Anticancer Drug Des.* 2000, 15 (2), 151-160.
3. McKeown ST, Lundy FT, Nelson J, Lockhart D, Irwin CR et al. The cytotoxic effect of human peptid-1 (HNP1) and lacto-ferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro. *Oral Oncol.* 2006, 42 (7), 685-690.
4. Tang Y.- Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect. Immun.* 2002, 70, 6524-6533.
5. Бухарин О.В., Черешнев В.А., Сулейманов К.Г. Антимикробный белок тромбоцитов. УрО РАН, Екатеринбург, 2000.
6. Иванов Ю.Б., Мирошников С.А., Лебедев С.В., Нотова С.В., Сипайлова О.Ю. и др. Противоопухолевое средство. Патент РФ 2419451.
7. Ivanov I.B., Gritsenko V.A. Comparative activities of cattle and swine platelet microbicidal proteins. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2009, 1, 148-151.
8. Asher A., Mulé J.J., Reichert C.M., Shiloni E., Rosenberg S.A. Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. *J. Immunol.* 1987, 138, 963-974.

## EFFECT OF HUMAN THROMBODEFENSINS ON APOPTOSIS AND CELL CYCLE OF TUMOR CELLS IN VITRO

I. B. Ivanov, V. A. Gritsenko

*Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian academy of Sciences, Orenburg*

The purpose of this study was to investigate the influence thrombodefensins (TD) on apoptosis and cell cycle of tumor cells *in vitro*. The results showed that the TD is not toxic for Wnt-1 cells, and has no direct effect on cell proliferation, and expression of surface markers.

---

---

## РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ. РОЛЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Казакова И. А.<sup>1,2</sup>, Мухлынина Е. А.<sup>1</sup>, Данилова И. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 2ГБУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

Изучено содержание CD117<sup>+</sup> гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) различной степени дифференциации в печени при ее повреждении. Обнаружено увеличение количества CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup> клеток, что связано с вступлением ГСК в процессы дифференциации в органе.

*Ключевые слова:* гепатэктомия, регенерация, стволовые клетки.

**Введение.** Согласно современным представлениям, в восстановлении печени после повреждения могут принимать участие не только собственные, резидентные, стволовые клетки, но и стволовые клетки костномозгового происхождения, которые могут мигрировать в печень [1, 2]. Наиболее общим маркером, присущим мышинным ГСК, является CD117 (c-kit) – трансмембранный тирозинкиназный рецептор, относящийся к семейству CSF-1/PDGF рецепторных киназ. Взаимодействие CD117 с его лигандом, фактором стволовой клетки (SCF), запускает пролиферацию и дифференцировку ГСК [3]. У взрослых линейных мышей 7–8% от общего числа клеток костного мозга экспрессируют c-kit на своей поверхности [4]. Это не только мультипотентные гемопоэтические стволовые клетки, но и коммитированные предшественники миелоидных и эритроидных линий, предшественники Т- и В-лимфоцитов. В связи с этим для характеристики ГСК у мышей принято использовать несколько маркеров, среди которых большинство исследователей выделяют CD90 (Thy-1) и CD38 [5]. Однако, единого мнения о степени зрелости различ-

ных популяций CD117<sup>+</sup> клеток на данный момент не существует. Ранее нами был установлен факт активации CD117<sup>+</sup> гепатоцитов, образующих ростковую зону в печени, а также усиление пролиферации CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> в костном мозге [6].

Целью настоящей работы явилось изучение содержания ГСК в печени после частичной гепатэктомии.

**Материалы и методы.** Опыты проводились на белых беспородных мышках-самцах одного возраста массой 18–25 г. Условия содержания и обращения с животными соответствовали рекомендациям международных этических комитетов и Директиве Совета ЕС 2010/63/EU.

Репаративную регенерацию печени вызывали удалением 2/3 массы органа – частичной гепатэктомией по Higgins G.M., Anderson R.M.. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом через сутки после операции.

Определение абсолютного количества стволовых клеток в печени осуществлялось одноплатформенным методом. Изготовление клеточной суспензии печени проводилось при помощи системы для дезагрегации тканей

BDMedimashine. Полученную суспензию клеток пропускали через фильтры с размером пор 50-70 мкм. Клетки помещали в пробирки с флуоресцентными частицами BD Tru-Count tubes (BDBiosciences). Оценку содержания стволовых клеток в печени производили стандартным методом прямого иммунофлуоресцентного окрашивания с использованием моноклональных антител производства BDBiosciences анти-CD117-PE, IgG2b; анти-CD38-FITC, IgG2a; анти-CD90-FITC, IgG2a и соответствующих «изотипических» контролей (крысиные IgG2b-PE, IgG2a-FITC; BD). Лизис эритроцитов осуществляли с помощью коммерческого лизирующего буфера FACS Lysing Solution фирмы BDBiosciences. Для контроля границ лейкоцитарного гейта применяли моноклональные антитела против общелейкоцитарного антигена CD45 (анти-CD45-PerCP-Cy5.5, IgG2b; изотипический контроль – крысиный IgG2b-PerCP-Cy5.5; BD). Цитофлюориметрию осуществляли на проточном цитофлюориметре FC500 (Beckman Coulter), при этом регистрировали суммарно не менее 100000 событий.

В качестве стволовых рассматривались клетки, имевшие морфологию малого лимфоцита, слабо экспрессировавшие маркер CD45 [7] и являющиеся CD117<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, либо CD117<sup>+</sup>CD90<sup>low</sup>. Доля стволовых клеток высчитывалась от общего количества CD45-позитивных клеток. Абсолютное количество стволовых клеток в печени осуществлялось в расчете на 1000 лейкоцитов.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы StatSoftStatistica 6.0. Использовался непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-WhitneyUtest). Данные приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего, статистически достоверные различия принимали при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** При анализе на проточном цитофлюориметре печени интактных животных отчетливо выделяется немногочисленная популяция CD45<sup>+</sup> клеток.

Среди них нами рассматривались ГСК, имеющие морфологию малого лимфоцита, оцениваемую прибором по параметрам переднеуглового и малоуглового светорассеяния и характеризующиеся низким уровнем экспрессии панлейкоцитарного маркера. Среди них обнаружены как CD117-позитивные, так и CD117-негативные клетки.

Количество CD117<sup>+</sup> клеток у гепатэктомизированных животных возрастало по сравнению с интактными мышами в 7 раз (таблица 1). Данный факт, вероятно, связан с пролиферацией клеток указанного фенотипа.

При анализе клеток CD117<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> и CD117<sup>+</sup>CD90<sup>low</sup> было установлено, что у интактных животных в печени содержатся клетки обоих фенотипов, причем преобладают более дифференцированные клетки CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, количество которых составляет  $4,43 \pm 1,17$  на 1000 лейкоцитов, и превышает содержание CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup>CD90<sup>low</sup> клеток приблизительно в 2 раза.

У гепатэктомизированных животных содержание CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> в регенерирующем остатке печени не увеличивается, оставаясь на уровне интактных животных, а число CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup>CD90<sup>low</sup> снижается до нуля, поскольку эти клетки не были обнаружены на цитограммах.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать следующий вывод:

1. Частичная гепатэктомия вызывает активацию (пролиферацию) CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup> гепатоцитов, что проявляется как в увеличении количества этих клеток.
2. Количество клеток фенотипа CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> и CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup>CD90<sup>low</sup> не возрастает, что свидетельствует о вступлении данного типа клеток в дифференцировку.

Работа поддержана инициативным проектом фундаментальных исследований, выполняемых в Учреждении Российской академии наук Уральском отделении РАН в 2012–2014 гг.

**Таблица 1.** Содержание CD117<sup>+</sup> клеток с различным фенотипом в печени мышей после частичной гепатэктомии, на 1000 лейкоцитов

	Интактные	Гепатэктомия
CD45 <sup>low</sup> CD117 <sup>+</sup>	27,23±8,14	195,2±44,4*
CD45 <sup>low</sup> CD117 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	4,43±1,17	1,73±1,4
CD45 <sup>low</sup> CD117 <sup>+</sup> CD90 <sup>low</sup>	2,71±1,3	0*

Примечание: \* – отличия от интактной группы достоверны ( $P < 0,05$ )

и финансируемых из средств Уральского отделения РАН в 2012–2014 гг. № 12-У-4–1020.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Broudy V. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*. 1997, 90, 1345-1364.
2. Guettier C. Which stem cells for adult liver? *Annales de Pathologie*. 2005, 25, 33-44.
3. Reya T. Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. *Recent. Prog. Horm. Res.* 2003, 58, 283-95.
4. Ogawa M., Matsuzaki Y., Nishikawa S., Hayashi S., Kunisada T., Sudo T., Kina T., Nakauchi H., Nishikawa S. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells *J. Exp. Med.* 1991, 174, 63-71.
5. Randall T.D., Lund F.E., Howard M.C., Weissman I.L. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996, 87, 4057-67.
6. Юшков Б. Г., Данилова И. Г., Казакова И. А. Пролиферация и миграция гемопоэтических стволовых клеток в условиях репаративной регенерации тканей. Роль системы фагоцитирующих мононуклеаров. Вестник уральской медицинской академической науки. 2012, 4, 77-78.
7. Данилова И. Г., Казакова И. А. Юшков Б. Г., Абидов М. Т. Модуляция макрофагов и реакции CD117<sup>+</sup>-клеток различной локализации при повреждении печени у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014, 3, 335-339.

### REPARATIVNY REGENERATION OF A LIVER. ROLE OF HAEMATOPOIETIC STEM CELLS

<sup>1,2</sup>Kazakova I. A., <sup>1</sup>Mukhlylina E. A., <sup>1,2</sup>Danilova I. G.

<sup>1</sup>Science federal state budgetary institution Institute of immunology and physiology of URO Russian Academy of Sciences, <sup>2</sup>GBUZ WITH Institute of medical cellular technologies, Yekaterinburg, Russia

The content of CD117<sup>+</sup> hematopoietic stem cells (HSC) of varying degrees of differentiation in liver damage was investigated. An increase in the number of CD45<sup>low</sup>CD117<sup>+</sup> cells is associated with the entry in the HSC differentiation processes in the body.

### ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЙ МЕТФОРМИНА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ TLR2 И TLR4 АДИПОЦИТАМИ ПАРАПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ КЛЕТЧАТКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Камышный А. М., Путилин Д. А., Камышная В. А.

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии Запорожского государственного медицинского университета, Запорожье, Украина

Исследовано влияние экспериментального сахарного диабета на экспрессию TLR2 и TLR4 адипоцитами парапанкреатической клетчатки у крыс линии Вистар. Установлено, что развитие диабета увеличивало количество TLR2<sup>+</sup>- и TLR4<sup>+</sup>- адипоцитов и преимущественно повышало плотность TLR2<sup>+</sup>- и TLR4<sup>+</sup>- рецепторов на их мембране. Введение метформина диабетическим крысам снижало общее количество TLR2<sup>+</sup>-адипоцитов на 16% (ЭСД1) – 22% (ЭСД2), TLR4<sup>+</sup>-адипоцитов на 36% (ЭСД1), сопровождалось уменьшением плотности TLR2<sup>+</sup>- и TLR4<sup>+</sup>- рецепторов на поверхности жировых клеток.

*Ключевые слова:* метформин, TLR2, TLR4, диабет, адипоциты.

В последние годы стало ясно, что жировая ткань (ЖТ) является важным органом иммунной системы [1], а “ремоделирование” адипоцитов сопровождается развитием ее воспаления и может быть триггером разви-

тия и прогрессии аутоиммунных заболеваний, в том числе и сахарного диабета (СД) [2]. Известно, что ЖТ содержит целые группы клеток врожденной и адаптивной иммунной системы – М1- и М2-макрофаги, дендритные клет-

ки, NK- и NKT-лимфоциты, Treg, разнообразные субпопуляции Т-хелперов -Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 [1]. От баланса этих клеток зависит уровень провоспалительной сигнализации в ЖТ и продукция таких цитокинов как IL1 $\beta$ , IL6, IL17, IL18, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , способных непосредственно влиять на прогрессию инсулита. Между тем, включение адаптивной иммунной системы зависит от уровня сигнализации через паттерн-распознающие рецепторы (PRR – pattern-recognition receptors) врожденной, одними из важных представителей которых являются толл-подобные рецепторы TLR2 и TLR4 [3]. Лигандами TLR2 являются липопротеиды, липотейхоевые кислоты, пептидогликан, липоарабиноманнан, зимозан, хитин практически всех микроорганизмов, TLR4 – липополисахариды (LPS) грам-негативных бактерий. Кроме того, диабет сопровождается целым рядом метаболических нарушений, а природными лигандами TLR-4, способными их активировать, являются насыщенные жирные кислоты [3].

Важной стратегической задачей является поиск эффективных путей коррекции иммунных нарушений, которые развиваются при СД и поддерживают его прогрессию. В связи с этим мы остановили свой выбор на метформине, способном снижать концентрацию глюкозы в крови через АМФ-активируемую протеинкиназу (АМФК) [4]. Однако, наибольший интерес представляет недавно обнаруженная способность метформина через АМФК влиять на активность ключевого регулятора внутриклеточного метаболизма, роста, пролиферации и выживания клеток mTOR (mammalian target of rapamycin) [5]. Метформин, как и рапамицин, но более мягко, без развития иммуносупрессии, угнетает активность mTOR, и уменьшает интенсивность провоспалительной сигнализации в жировой ткани [5]. Поэтому, цель настоящей работы заключалась в выяснении особенностей экспрессии TLR2 и TLR4 адипоцитами парапанкреатической жировой клетчатки у крыс линии Вистар с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД) и после введений метформина.

**Материал и методы исследования.** Исследования проведены на 60 самцах крыс линии Вистар массой 115-135 грамм, которые были разделены на 5 экспериментальных групп: контрольные крысы, которым однократно внутрибрюшинно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (pH = 4,5) (группа 1);

крысы с 3-недельным экспериментальным стрептозотоцин-индуцированным диабетом (ЭСД1) (группа 2); крысы с 3-недельным экспериментальным стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным диабетом (ЭСД2) (группа 3); крысы с 3-недельным ЭСД1 (группа 4) и ЭСД2 (группа 5), которым внутрижелудочно ежедневно на протяжении 3 недель вводили метформин в дозе 50 мг/кг начиная с 1 дня индукции диабета. Для индукции ЭСД1 стрептозотоцин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг, растворенной в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (pH 4,5) перед самым моментом введения. Индукцию ЭСД2 осуществляли STZ в дозе 65 мг/кг с предварительным (за 15 мин.) введением никотинамида (внутрибрюшинно – 230 мг/кг). Определение концентрации глюкозы в крови, которую брали из хвостовой вены, проводили глюкозооксидазным методом с применением прибора “BIONIMERigh testTMGM 110” (Швейцария) через 12 часов и на 1, 2, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки после инъекции STZ. На 21 сутки после введения STZ животных выводили из эксперимента декапитированием под эфирным наркозом. Извлекали участки парапанкреатической жировой клетчатки (ППК), которые на 20 часов погружали в фиксатор Буэна и после промывки заливали в парапласт.

Структуру популяции TLR2<sup>+</sup> и TLR4<sup>+</sup>-адипоцитов изучали на основании анализа серийных гистологических срезов и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Для проведения данного исследования на ротационном микротоме MICROM HR –360 (Microm, Германия) делали 5-микронные серийные срезы ППК. Данные срезы депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), отмывали в 0,1М фосфатном буфере (pH=7,4) и красили с первичными кроличьими поликлональными антителами (ПКАТ) к TLR2 и TLR4 (SantaCruzBiotechnology, США) в течение 18 часов во влажной камере при T = 4°C. После отмывания избытка первичных антител в 0,1М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 минут (T=37°C) с вторичными антителами к полной молекуле IgG кролика (SantaCruzBiotechnology, США), конъюгированными с FITC. После инкубации срезы промывали 0,1М фосфатным буфером и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (1:9) для последующей люминесцентной микро-

скопии. Обработанные гистологические срезы изучали с помощью компьютерной программы ImageJ (NIH, США). Изображение, получаемое на микроскопе PrimoStar (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) с помощью высокочувствительной камеры AxioCam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображений к публикации AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводилось в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флуоресценцией, характерной для клеток, экспрессирующих TLR2 и TLR4. Все полученные экспериментальные данные обрабатывали на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ EXCEL из пакета MS Office 2010 (Microsoft Corp. США), STATISTICA 6.0 (Stat – Soft, 2001).

**Результаты и обсуждение.** Развитие ЭСД1 сопровождалось увеличением суммарной плотности популяции TLR2<sup>+</sup> адипоцитов ППК в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, в тоже время этот же показатель при ЭСД2 увеличился на 83% ( $p < 0,05$ ). Индукция ЭСД1 приводила к увеличению плотности TLR2<sup>+</sup> рецепторов на поверхности адипоцитов всех классов на 9–23% ( $p < 0,05$ ) относительно контроля, а при ЭСД2 этот показатель увеличивался у больших адипоцитов в 9,4 раза ( $p < 0,05$ ) и уменьшался у средних и малых адипоцитов на 8% ( $p < 0,05$ ) и на 13% ( $p < 0,05$ ), соответственно. Изучение распределения TLR4<sup>+</sup> адипоцитов в ППК показало, что в условиях индукции ЭСД1 наблюдается увеличение их общего количества на 95% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, тогда как при ЭСД2 достоверных изменений не выявлено. Развитие ЭСД1 приводило к снижению плотности TLR4<sup>+</sup> рецепторов на поверхности больших адипоцитов на 12% ( $p < 0,05$ ), а этот же показатель при ЭСД2, наоборот, увеличивался на 33% ( $p < 0,05$ ). В ряде других исследований также была показана способность адипоцитов человека и крыс экспрессировать практически весь спектр Toll-подобных рецепторов, от TLR-1 до TLR-9 [6]. Характерно, что наши результаты показывают активное участие рецепторов врожденной иммунной системы в развитии не только ЭСД2, а и ЭСД1, а также важную роль в этом процессе и TLR-2.

После введений метформина суммарная плотность TLR2<sup>+</sup> адипоцитов снижалась на 16% (ЭСД1) ( $p < 0,05$ ) и на 22% (ЭСД2) ( $p < 0,05$ )

по сравнению с диабетическими крысами, тогда как общее количество TLR4<sup>+</sup> адипоцитов уменьшалось на 36% ( $p < 0,05$ ) только в случае ЭСД1. Введение в условиях ЭСД1 метформина нашло отражение в снижении плотности TLR2<sup>+</sup> рецепторов на 21% ( $p < 0,05$ ) у средних адипоцитов и на 12% ( $p < 0,05$ ) у малых, по сравнению с диабетическими животными. Похожие изменения наблюдались и в случае ЭСД2 – введения метформина вызывали снижение плотности TLR2<sup>+</sup> рецепторов на поверхности больших адипоцитов на 92% ( $p < 0,05$ ) и на поверхности средних – на 7% ( $p < 0,05$ ). Плотность TLR4<sup>+</sup> рецепторов в условиях введения метформина однонаправленно снижалась как при ЭСД1 (на 10–13%,  $p < 0,05$ ), так и при ЭСД2 (на 14% ( $p < 0,05$ ) у больших адипоцитов. Полученные нами данные свидетельствуют о способности метформина снижать плотность TLR2<sup>+</sup>- и TLR4<sup>+</sup>- рецепторов на поверхности жировых клеток и косвенно подтверждается и для других типов клеток. Так, Soraya H. et al. (2012) показали способность метформина подавлять экспрессию TLR4 и его адаптерного белка MyD88 в кардиомиоцитах, снижать продукцию TLR-зависимых провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-6 [7]. Была установлена способность метформина угнетать активность NF- $\kappa$ B и продукцию IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-8 эндотелиальными клетками человека [8]. Andrews M. et al. (2012) продемонстрировали способность метформина снижать уровень мРНК TNF- $\alpha$  и TLR 2/4 в моноцитах периферической крови у больных с СД2 типа [9].

Таким образом, развитие ЭСД увеличивает экспрессию TLR2 и TLR4 адипоцитами паранепкротической клетчатки и уровень провоспалительной сигнализации в жировой ткани, а метформин способен снижать интенсивность активации рецепторов врожденной иммунной системы в данных условиях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaminski D. et al. // J. Trends Immunol.– 2010.– Vol.31.– P.384-390.
2. Matarese G. et al. // J. Immunol Rev.– 2012.– Vol.116.– P.34-39.
3. Jialal I. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2014.– Vol.99.– P.39-48.
4. Russo G. et al. // J. Biochem.Pharmacol.– 2013.– Vol.339.– P.50-59.
5. Hardie D. et al. // J. Diabetes.– 2013.– Vol.24.– P.72-79.

6. Schäffler A. et al. // J. Trends Immunol.– 2010.– Vol.228.– P.35-41.
7. Soraya H. et al. // J. Int. Immunopharmacol.– 2012.– Vol.785.– P.91-99.
8. Isoda K. et al. // J. Arterioscler.Thromb.Vasc. Biol.– 2006.– Vol.611.– P.7-13.
9. Andrews M. et al. // Rev. Med. Chil.–2012.– Vol.140.– P.1377-1382.

## INFLUENCE OF INTRODUCTIONS OF METFORMIN ON LEVEL OF THE EXPRESSION OF TLR2 AND TLR4 ADIPOTSITAMI OF PARAPANCREATIC CELLULOSE AT EXPERIMENTAL DIABETES

Kamyshny A. M., Putilin D. A., Kamyshnaya V.A.

*Chair of microbiology, virology and immunology, Zaporozhye state medical university, Zaporozhye*

It is researched the influence of experimental diabetes mellitus on the expression of TLR2 and TLR4 by adipocytes of parapancreatic adipose tissues in the rats of Wistar line. It is detected that the development of EDM increased the number of TLR2<sup>+</sup>- and TLR4<sup>+</sup>- adipocytes and increased the density TLR2<sup>+</sup>- and TLR4<sup>+</sup>- receptors on their membrane. The introduction of metformin to the diabetic rats reduced the general number of TLR2<sup>+</sup>- adipocytes in 16% (EDM1) –22% (EDM2), TLR4<sup>+</sup>- adipocytes in 36% (EDM1) accompanied by the decrease of the density TLR2<sup>+</sup>- and TLR4<sup>+</sup>-receptors of the surface of adipose cells.

*Keywords: metformin, TLR2, TLR4, diabetes, adipocytes.*

---

---

## ОПЫТ ИММУНОИНТЕРВЕНЦИИ ПРИ ТРАНЗИТОРНОЙ ГИПОГАММАГЛОБУЛИНЕМИИ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА

Климов А. В., Климов В. В.

*Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

С целью анализа 10-летнего опыта иммуноинтервенции обследовано 30 детей в возрасте от 6 месяцев до 4 лет с транзиторной гипогаммаглобулинемией. Все дети страдали рецидивирующими пиогенными инфекциями разных локализаций и имели уменьшенное содержание сывороточных иммуноглобулинов ниже диагностических критериев. Были исключены другие формы первичных иммунодефицитов. Все дети получали миелопид, рибомунил и при выделении из биологических материалов стафилококка – стафилококковый анатоксин. У всех детей как следствие иммунокоррекции отмечалось заметное снижение частоты и выраженности респираторных инфекций и поражения ЛОР-органов, постепенная утрата потребности в антибиотикотерапии, а после полугода – обратное развитие избыточной лимфоидной ткани. В катамнезе происходило исчезновение симптомов иммунодефицита.

*Ключевые слова:* дети, иммунодефицит, транзиторная гипогаммаглобулинемия, инфекция, иммуноинтервенция.

**Введение.** Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста (ТГД), относительно часто встречающаяся, но не фатальная форма первичного иммунодефицита [1, 2], характеризуется 1) снижением на 2 SD уровня IgG без или с уменьшением уровней IgM и IgA у детей в возрасте старше 6 месяцев до 2–6 лет, 2) сохранением гуморального ответа на вак-

цинации. Точная природа ТГД до настоящего времени не известна, а молекулярная аномалия именно для этой формы иммунодефицита не выявлена [3, 4]. При диагностике ТГД должны исключаться другие формы первичных иммунодефицитов [5, 6]. Предполагается [7], что в связи со снижением экспрессии части корцепторного комплекса В-клеток (CD19)

при сохранении другой части (CD21, CD81 и CD225) после распознавания антигенов через BCR первоначально нарушается активация В-клеток, а в последующем – переключение синтеза IgM на продукцию IgG. Однако этот процесс является транзиторным и нивелируется с возрастом. Современное лечение детей с ТГД включает антибиотикотерапию, вакцинацию против *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *S.aureus*, санацию носоглотки. Иммуноглобулинотерапию [8] в связи с доброкачественным характером болезни и известными ограничениями (высокая стоимость, риск развития аутоантител к IgA и инфицирования некоторыми вирусами), вероятно, можно считать устаревшей, хотя и в настоящее время предпринимаются попытки её обоснования [9].

Целью настоящей работы был анализ 10-летнего опыта применения иммуноинтервенции у детей с транзиторной гипогаммаглобулинемией.

В период 2004–2013 г.г. нами обследовано 30 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, на основании чего, а также при исключении тяжёлых форм первичных иммунодефицитов, им был поставлен диагноз ТГД. У 5 детей в анамнезе определялись двукратные эпизоды внебольничных пневмоний, у 12 – рецидивирующий гнойный отит и мастоидит, у 6-х – рецидивирующая пиодермия, у одного – абсцесс печени, у всех – синдром избыточного роста микробов в кишечнике. Из биологического материала (отделяемого уха, мокроты, гноя, кала) выделялись *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. viridans*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* и др. В 8 случаях проводились операции (мастотомия, иссечение фурункулов и абсцесса). Все больные многократно получали антибиотикотерапию. В среднем концентрации иммуноглобулинов у обследованных детей на относительно здоровом фоне были следующими: IgG 3,0 (1,2–4,8) г/л, IgM 0,3 (0,1–1,1) г/л, IgA 0,12 (0,09–0,35) г/л, при этом у 5 детей в слюне регистрировался дефицит sIgA. Содержание Т- (CD3<sup>+</sup>) и В-клеток (CD19<sup>+</sup>) существенно не отличалось от нормы, а уровень CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> был несколько повышен.

Всем детям назначалась иммуноинтервенция (иммунокоррекция): миелопид (старое название «В-активин») по 3 мг внутримышеч-

но через день в количестве 5 инъекций 2 раза в год (2–3 курса), рибомунил по 5-месячной схеме (1 раз в 1–2 года), стафилококковый очищенный адсорбированный анатоксин по 1 дозе подкожно в количестве 2-х инъекций (1 раз в год). Один ребёнок получал внутривенные инъекции габроглобина. У всех детей, начиная со 2-го месяца иммунокоррекции, отмечалось заметное снижение частоты и выраженности респираторных инфекций и поражения ЛОР-органов, постепенная утрата потребности в антибиотикотерапии, а после полугода – обратное развитие избыточной лимфоидной ткани (аденоидов, шейных лимфатических узлов и т.д.). О клинико-иммунологической эффективности рибомунилы нами сообщалось ранее [10]. При исследовании сывороточной концентрации IgG у 15 детей через 6 месяцев от начала иммунокоррекции отмечено её достоверное повышение у 13. У 15 детей исследован 3–5-летний катамнез, который позволил констатировать исчезновение клинических симптомов иммунодефицита (у 14), но формирование атопической аллергопатологии (у 9).

Таким образом, комплексная иммуноинтервенция, включающая миелопид и препараты с вакциноподобным действием (рибомунил, стафилококковый анатоксин) позволяет в большинстве случаев ТГД достигать отдалённого клинико-иммунологического эффекта без назначения иммуноглобулинотерапии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ji-hong Q. Jian-xing Z. Xiao-dong Z. Tong-xin C. Chin Med J. 2009, 122, 1877-1883.
2. Whelan M.A., Hwan W.H., Beausoleil J., et al. J Clin Immunol. 2006, 26 (1), 7–11.
3. Thiel J., Kimmig L., Salzer U., Grudzien M., Lebrecht D., et al. J Allergy Clin Immunol. 2012, 129, 801-810.
4. Van Zelm M.C., Smet J., Adams B., Mascart F., Schandené L., et al. J Clin Invest. 2010, 120, 1265-1274.
5. Bukowska-Strakova K., Kowalczyk D., Baran J., Siedlar M., Kobylarz K., et al. Pediatr Res. 2009, 66, 28-34.
6. Moschese V., Graziani L., Avanzini M.A., Carsetti R., Marconi M., et al. Network. Inter J Immunopath Pharmacol. 2008, 21, 343-352.
7. Artac H., Kara R., Gokturk B., Reisli I. Clin Exp Med. 2013, 13 (4), 257-263.
8. Dalal I., Reid B., Nisbet-Brown E., Roifman CM. J Pediatr. 1998, 133 (1), 144-146.
9. Memmedova L., Azarsiz E., Edeer Karaca N., Aksu G., Kutukculer N. Pediatr Rep. 2013, 5 (3), e14.
10. Климов В.В. Вопросы современной педиатрии 2012, 11 (5), 109-112.

## EXPERIENCE OF THE IMMUNOINTERVENTIONAL PHARMACOTHERAPY IN CHILDREN OF TRANSIENT HYPOGAMMAGLOBULINEMIA

Klimov A. V., Klimov V. V.

*Siberian State Medical University, Tomsk*

To analyze 10-year experience of immunointerventional pharmacotherapy in 30 children at the age from 6 months to 4 years with transient hypogammaglobulinemia were investigated. All the children suffered from recurrent pyogenic infections in various organs and displayed decreased levels of the serum immunoglobulins as compared to diagnostic criterions. The other types of primary immunodeficiencies were excluded. All the children took myeloid, ribomunyl and staphylococcal anatoxin if they had the staphylococcal infections in their analyts. Immunointervention resulted in a decrease in often respiratory and other infections and a progressive loss of a need in antibiotic therapy as well as an involution of enlarged lymphoid tissue after the 6-month therapeutic course. All the immunodeficiency symptoms were disappeared in follow-up histories of the children.

---

---

## СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ «КОЖНОГО ОКНА» ПРИ КРУГЛОГОДИЧНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ И АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ

Климов В. В., Найдина О. А., Кошовкина Т. В., Кошкарлова Н. С.,  
Салахутдинова З. В.

*Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

С целью определения IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17 и IL-22, вырабатываемых адаптивными хелперными Т-клетками и ILC, обследовано 46 больных с круглогодичным аллергическим ринитом и 55 пациентов с атопическим дерматитом в возрасте от 18 до 55 лет. Для установления концентрации данных цитокинов методом иммуноферментного анализа производилось исследование экссудатов «кожного окна». При круглогодичном аллергическом рините выявлено статистически значимое снижение IL-10 и IL-17, а также повышение IL-22 по отношению к контролю. При атопическом дерматите зарегистрировано статистически значимое снижение содержания IL-10 и IFN-g и существенное повышение содержания IL-22 по отношению к контролю. Обнаруженные нами однонаправленные изменения данных цитокинов при обеих атопических патологиях могут свидетельствовать о дисбалансе локально действующих адаптивных и врождённых иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов с активацией T $\chi$ 22 и ILC22 и инактивацией T $\chi$ 17 и ILC17.

*Ключевые слова:* цитокины, иммунорегуляция, аллергический ринит, атопический дерматит.

**Введение.** Патогенез атопических аллергических болезней до сих пор является объектом пристальных научных исследований, которые постепенно обогащаются новыми данными и новыми идеями [1, 2]. В основе каждой атопической болезни лежит персистирующее IgE-зависимое воспаление, в котором участвуют многие медиаторы, включая цитокины. Источниками цитокинов являются адаптивные хелперные Т-лимфоциты (T $\chi$ ), макрофаги, разные группы дендритных клеток, а также недавно

охарактеризованные врождённые лимфоидные клетки (innate lymphoid cells – ILC) [3].

Установлено, что ILC – гетерогенная популяция лимфоцитов, ответственная за более быстрые по сравнению с адаптивными T $\chi$ -клетками регуляторные и защитные реакции в ответ на попадание аллергенов и патогенов. Они особенно важны для барьерных органов (таких, как нос и кожа) и функционируют в составе мукозо-ассоциированной лимфоидной ткани. ILC также существенны для разви-

тия лимфоидной ткани, рециклинга Т-клеток, В-лимфоцитов и дендритных клеток, гомеостаза эпителия слизистых оболочек и кожи, заживления случайных повреждений и др. ILC имеют общего лимфоидного предшественника, но под влиянием разных транскрипционных факторов дифференцируются в разные типы и субпопуляции. ILC1 продуцируют IFN-g и регулируют воспаление. ILC2 (нуоциты) секретируют IL-5, IL-9, IL-13 и отвечают за защиту от паразитов и регенерацию повреждений эпителия. ILC17 вырабатывают IFN-g, IL-17 и обеспечивают защиту от внеклеточных патогенов, а ILC22 продуцируют IL-22, регулируют гомеостаз эпителия и также влияют на защиту от внеклеточных патогенов [3].

Целью настоящей работы было определение цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17 и IL-22), вырабатываемых адаптивными Тх и ILC в «кожном окне» при круглогодичном аллергическом рините (КАР) и атопическом дерматите (АтД).

Обследовано 46 пациентов с КАР и 55 больных с АтД в возрасте 18-55 лет. У всех пациентов была лёгкая и среднетяжёлая форма заболеваний в периоде ремиссии. Диагноз патологий устанавливался на основании сбора анамнеза, оценки клинической симптоматики, проведения кожных аллергологических проб и определения IgE. В качестве контроля обследовано 10 практически здоровых людей, не имеющих атопической конституции. В работе использовались «кожное окно» и камера – модель, которая позволяла исследовать цитокины на локальном уровне [4]. Содержание цитокинов определялось иммуноферментным способом и выражалось в пг/мл экссудата. На предварительном этапе проводилось сопоставление результатов в расчёте пг/г белка, что позволило судить о стандартизации данных. Для презентации количественных данных, не подчиняющихся нормальному закону распределения, использовались критерии описательной статистики: Me (медиана), Q1 (1-й квартиль (25%)) и Q3 (3-й квартиль (75%)).

При КАР выявлено статистически значимое снижение IL-10 в кожных экссудатах (0,8 (0,8–1,1) пг/мл) по отношению к показателю у здоровых людей ( $p < 0,05$ ). Нами также обнаружено при КАР достоверное уменьшение IL-17 (1,2 (0,9–1,4) пг/мл) и повышение IL-22 (2,0 (1,8–2,2) пг/мл) по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

При АтД зарегистрировано статистически значимое снижение по отношению к контро-

лю ( $p < 0,05$ ) содержания IL-10 (8,5 (7,8–18,1) пг/мл) и IFN-g (5,2 (2,1–13,8) пг/мл). Нами также выявлено существенное повышение содержания IL-22 (12,3 (10,7–14,6) пг/мл) по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

IL-10 – цитокин, секретируемый целым рядом клеток (Тх3, Treg, Tr1 и другими), является противовоспалительным фактором и влияет на процессы ремоделирования барьерных органов [5]. Возможно, выявленное снижение IL-10 отражает интенсивность воспалительного процесса при аллергии по сравнению с нормой. IFN-g – ключевой цитокин Тх1 и ILC1. Локальное снижение IFN-g, по крайней мере при АтД, укладывается в общую концепцию снижения активности Тх1 и повышения Тх2 при АтД и атопиях вообще [6].

IL-17 и IL-22 являются важными цитокинами недавно открытых регуляторных субпопуляций Тх17 и Тх22, а также ILC17 и ILC22, которые проявляют свою активность преимущественно на локальном уровне. Обнаруженные нами однонаправленные изменения данных цитокинов при обеих патологиях могут свидетельствовать о дисбалансе локально действующих адаптивных и врождённых иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов с активацией Тх22 и ILC22 и инактивацией Тх17 и ILC17, что в свою очередь может рассматриваться как компенсаторная реакция организма пациентов на персистирующее аллергическое воспаление [3, 7].

Установленные изменения в содержании цитокинов в кожных экссудатах при КАР и АтД отражают сложные взаимодействия противовоспалительных, воспалительных и иммунорегуляторных процессов на локальном уровне. «Кожное окно» может служить адекватной моделью для определения этих параметров воспаления, несмотря на то, что «органом-мишенью» при КАР является слизистая носа.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aguilar A. D., Serrano M. E., Rojo G. M. et al. Rev. Alerg. Mex. 2006, 53 (3), 85-88.
2. Bieber T. N Engl J Med. 2008, 358, 1483-1494.
3. Walker J. A., Barlow J. L., McKenzie A. N. J. Nature Reviews Immunology. 2013, 13, 75-87.
4. Климов В. В., Жукова Ж. П., Кошовкина Т. В., Кошкарлова Н. С., Якунина М. А. Российский аллергологический журнал 2013, 2 (4), С. 139-140.
5. Wu K., Bi Y., Sun K. et al. Cellular & Molecular Immunology. 2007, 4 (4), 269-275.

6. Grewe M., Bruijnzeel-Koomen C.A.M.F., Schöpf E. et al. *Immunology Today*. 1998, 19 (8), 359-361.
7. Nograles K. E., Zaba L. C., Shemer A. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009, 123, 1244-1252.

## «SKIN WINDOW» CYTOKINES IN PERENNIAL ALLERGIC RHINITIS AND ATOPIC DERMATITIS

Klimov V. V., Naidina O. A., Koshovkina T. V., Koshkarova N. S., Salakhutdinova Z. V.

*Siberian State Medical University, Tomsk*

To evaluate IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17 and IL-22, which produce by helper T cells and innate lymphoid cells (ILC), 46 patients of perennial allergic rhinitis and 55 patients of atopic dermatitis were investigated. The age of persons was from 18 to 55 years. ELISA cytokine values were determined in "skin window" exudates. There have been found a decrease in IL-10 and IL-17 and an increase in IL-22 in perennial allergic rhinitis as compared to control. There have been also registered a decrease in IL-10 and IFN-g and an essential increase in IL-22 in atopic dermatitis as compared to the control. Such similar cytokine changes in both atopic diseases may reflect an imbalance of the local helper T cells and ILC activity, which exerts Th22 and ILC22 upregulation and Th17 and ILC17 downregulation.

---

---

## СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ И ЦИТОКИНОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ

Колупаев В. А.<sup>1</sup>, Сашенков С. Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Уральский государственный университет физической культуры <sup>2</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

Проведено посезонное сравнение содержания адреналина, кортизола, тиреоидных гормонов и цитокинов в периферической крови спортсменов с преимущественно анаэробным или аэробным энергообеспечением мышечной деятельности, осуществляющейся в осенне-зимний период в условиях температурного комфорта или гипотермии. Содержание кортизола и тироксина значимо выше у спортсменов с анаэробным энергообеспечением мышечной деятельности, а тиреотропина и трийодтиронина – существенно ниже у спортсменов, адаптированных к холоду. Уровень содержания адреналина у спортсменов существенно отличался в отдельные сезоны. Содержание интерлейкина-1 $\alpha$  у атлетов исследуемых групп не имело значимых различий, тогда как летом в общей выборке обследованных было положительно связано с уровнем адреналина, осенью – с уровнем кортизола, а зимой – отрицательно коррелировало с содержанием тиреотропина.

**Ключевые слова:** адреналин, интерлейкины, кортизол, периферическая кровь, тиреоидные гормоны.

**Введение.** Изменение содержания гормонов в периферической крови при мышечной работе и под влиянием низкой или высокой температуры внешней среды оказывает модулирующее влияние на состояние эффекторных и секреторных функций клеток иммунной системы [1], в том числе, при физических нагрузках [2].

**Цель исследования:** сравнить содержание гормонов надпочечников, щитовидной железы и цитокинов в периферической крови спортсменов в зависимости от механизма энергообеспечения мышечной деятельности и условий внешней среды.

В различные сезоны обследованы практически здоровые квалифицированные

спортсмены в возрасте 16-25 лет, с преимущественно анаэробным (борцы,  $n=23$ ) или аэробным энергообеспечением мышечной деятельности, осуществляющейся при нормотермических условиях среды (представители спортивной ходьбы,  $n=35$ ) или в условиях гипотермии (лыжники-гонщики,  $n=24$ ). В ходе целенаправленной подготовки к соревнованиям в периферической крови атлетов определяли содержание адреналина, кортизола, тироксина, трийодтиронина, тиреотропного гормона, а также интерлейкина-1 $\alpha$ , интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-4 и  $\gamma$ -интерферона методом иммуноферментного анализа на базе НИИ иммунологии Южно-Уральского государственного медицинского университета (ректор ЮУГМУ – заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор И.И. Долгушин). Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты сравнения содержания гормонов и цитокинов в периферической крови представителей исследуемых видов спорта содержатся в таблице 1. Как видно из представленных данных, средний уровень содержания адреналина в периферической крови у представителей исследуемых видов спорта не имел существенных отличий. Вместе с тем, средний уровень содержания адреналина у лыжников-гонщиков зимой был значительно ниже ( $P<0,05$ ), а осенью существенно выше ( $P<0,05$ ), чем у борцов. При этом у скороходов, двигательная деятельность которых осуществляется в условиях температурного комфорта, спад содержания адреналина в крови наблюдался осенью, тогда как у лыжников-гонщиков существенное снижение среднего содержания адреналина в крови отмечалось

зимой ( $P<0,05$ ), а летом наблюдалось значительное повышение его содержания ( $P<0,01$ ) по сравнению с таковым весной и осенью.

Содержание кортизола и тироксина у атлетов с преимущественно анаэробным энергообеспечением мышечной деятельности было значительно выше ( $P<0,01$  и  $P<0,05$  – соответственно), чем у спортсменов, двигательная активность которых обеспечивается в основном за счет аэробных механизмов ресинтеза АТФ. Отмеченные различия, очевидно, отражают более интенсивный уровень процессов метаболизма в состоянии оперативного покоя у атлетов с преимущественно анаэробным энергообеспечением мышечной деятельности. Кроме того, у лыжников-гонщиков, адаптированных к осуществлению аэробной двигательной деятельности в условиях низких температур, содержание тиреотропина и трийодтиронина было достоверно ниже ( $P<0,01$ ), чем у борцов и скороходов, двигательная деятельность которых осуществляется при положительных значениях температуры окружающей среды. Изменения уровня содержания кортизола и тиреоидных гормонов у борцов, лыжников и представителей спортивной ходьбы в цикле года не являлись статистически значимыми.

Средние значения содержания цитокинов в периферической крови спортсменов представлены в таблице 2. Как видно из таблицы, уровень содержания интерлейкина-1 $\alpha$  в периферической крови спортсменов исследуемых групп не имел значимых различий. Летом у лыжников-гонщиков и скороходов отмечалось повышение содержания этого интерлейкина. Помимо того, летом и в цикле года в целом содержание интерлейкина-1 $\alpha$  у спортсменов положительно связано с содержанием адреналина в крови. Зимой уровень содержания интерлейкина-1 $\alpha$  у них отрицательно

Таблица 1. Сравнение содержания гормонов в периферической крови у спортсменов с анаэробным или аэробным энергообеспечением мышечной деятельности ( $\bar{X} \pm m$ )

Показатели	Борцы $n=23$	Лыжники $n=35$	Ходоки $n=24$	$P_{\text{Б-Л}}$	$P_{\text{Б-Х}}$	$P_{\text{Л-Х}}$
Содержание адреналина, пг/мл	191,60 $\pm$ 20,45	210,88 $\pm$ 16,14	219,05 $\pm$ 20,20	>0,05	>0,05	>0,05
Содержание кортизола, нмоль/л	526,87 $\pm$ 23,07	452,20 $\pm$ 12,87	419,00 $\pm$ 18,65	<0,01	<0,001	>0,05
Содержание тиреотропина, мМЕ/л	0,73 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,15	<0,05	>0,05	<0,01
Содержание трийодтиронина, пмоль/л	4,88 $\pm$ 0,06	4,69 $\pm$ 0,03	4,86 $\pm$ 0,06	<0,01	>0,05	<0,01
Содержание тироксина, пмоль/л	34,00 $\pm$ 0,81	31,43 $\pm$ 0,57	30,76 $\pm$ 0,78	<0,05	<0,05	>0,05

Условные обозначения: уровень значимости межгрупповых различий соответствии с величиной критерия Манна-Уитни.

Таблица 2. Содержание цитокинов в сыворотке крови у спортсменов с анаэробным или аэробным энергообеспечением мышечной деятельности ( $\bar{X} \pm m$ )

Показатели	Борцы n=28	Лыжники n=36	Ходоки n=24	P <sub>Б-Л</sub>	P <sub>Б-Х</sub>	P <sub>Л-Х</sub>
Содержание интерлейкина-1 $\alpha$ , пг/мл	128,07 $\pm$ 1,04	127,81 $\pm$ 1,25	124,72 $\pm$ 2,23	>0,05	>0,05	>0,05
Содержание интерлейкина-1 $\beta$ , пг/мл	10,94 $\pm$ 1,69	11,77 $\pm$ 1,13	7,43 $\pm$ 0,34	>0,05	<0,05	<0,01
Содержание интерлейкина-4, пг/мл	3,31 $\pm$ 0,26	3,13 $\pm$ 0,12	2,50 $\pm$ 0,11	>0,05	<0,05	<0,01
Содержание $\gamma$ -интерферона, пг/мл	39,14 $\pm$ 3,71	38,11 $\pm$ 2,56	33,39 $\pm$ 4,44	>0,05	<0,05	<0,05

Условные обозначения: см. табл. 1.

коррелировал с содержанием тиреотропного гормона, а осенью был положительно связан с содержанием кортизола.

Средний уровень содержания интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-4 и  $\gamma$ -интерферона у борцов и лыжников-гонщиков не имел существенных различий. Вместе с тем, содержание этих цитокинов у квалифицированных скороходов было статистически значимо ниже, чем у борцов и лыжников-гонщиков ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$  – соответственно). Изменения среднего уровня содержания этих цитокинов у борцов, лыжников-гонщиков и скороходов в цикле года не являлись достоверными, за исключением увеличения содержания  $\gamma$ -интерферона у лыжников-гонщиков летом.

Таким образом, механизм взаимосвязи нейроэндокринной и иммунной систем у спортсменов в значительной степени зависит от особенностей энергообеспечения их мышечной деятельности в определенных условиях внешней среды.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Манфорд Р.С. Иммуно-эндокринные взаимодействия. В кн.: Физиология эндокринной системы. БИНОМ. Лаборатория знаний, Москва 2008, 114-128.
2. Швыдченко И.Н. и др. Цитокин-секретирующая активность и функциональные особенности нейтрофильных гранулоцитов у спортсменов. Российский иммунологический журнал 2013, 2–3, 137.

## THE CONTENTS OF HORMONES AND CYTOKINES IN PERIPHERAL BLOOD OF QUALIFIED ATHLETES

<sup>1</sup>Kolupaev V.A., <sup>2</sup>Sashenkov S.L.

<sup>1</sup>Ural State University of Physical Culture, <sup>2</sup>South Ural State Medical University, Chelyabinsk

Seasonal conducted comparing the content of adrenaline, cortisol, thyroid hormones and cytokines in peripheral blood of athletes with predominantly anaerobic or aerobic energy supply of muscle activity being undertaken in the autumn-winter period in terms of thermal comfort or hypothermia. Cortisol and thyroxine significantly higher in athletes with anaerobic energy supply of muscle activity, and thyrotropin and triiodothyronine – significantly lower in athletes adapted to cold. The level of adrenaline in athletes was significantly different in different seasons. Of interleukin-1 $\alpha$  in athletes studied groups had no significant differences, whereas in summer the total sample surveyed was positively associated with the level of adrenaline, in the fall – with the level of cortisol, and winter – negatively correlated with the content of thyrotropin.

## ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Кравченко П. Н.<sup>1</sup>, Олейник Е. К.<sup>1</sup>, Барышева О. Ю.<sup>2</sup>, Жулай Г. А.<sup>1</sup>,  
Чуров А. В.<sup>1</sup>, Олейник В. М.<sup>1</sup>, Везикова Н. Н.<sup>2</sup>, Марусенко И. М.<sup>2</sup>,  
Выбач М. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

Изучено содержание отдельных субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов и экспрессия ими функциональной молекулы CTLA-4 в периферической крови больных ревматоидным артритом (РА) и у здоровых людей. Получены данные о том, что количество клеток с регуляторным фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> и CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> у больных РА не отличалось от контроля. В то же время содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg клеток у больных было значительно выше по сравнению с контролем. Также у больных было выявлено снижение числа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CTLA-4<sup>+</sup> Treg и повышенное содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> лимфоцитов.

*Ключевые слова:* регуляторные Т-клетки, аутоиммунитет, FOXP3, CTLA-4.

**Введение.** По современным представлениям, ревматоидный артрит (РА) – это хроническое заболевание неизвестной этиологии, со сложным аутоиммунным патогенезом, характеризующееся хроническим воспалением синовиальной оболочки суставов и прогрессирующей деструкцией хрящевой и костной ткани [1]. Патогенез ревматоидного артрита в настоящее время до конца не ясен, но многие исследователи сходятся на том, что важную роль в развитии заболевания играют Т-лимфоциты. Регуляция иммунного ответа осуществляется различными способами. Одним из таких механизмов является активация отдельной группы Т-лимфоцитов – регуляторных Т-клеток (Treg), обладающих иммуносупрессорной активностью. Treg представлены несколькими субпопуляциями Т-клеток и на сегодня самым надежным маркером для определения этих клеток является транскрипционный фактор FOXP3. Экспрессия этого гена является необходимой для развития и функционирования регуляторных клеток. Другая характерная для этих клеток особенность – это способность конститутивно экспрессировать α-цепь рецептора интерлейкина (IL)-2 (CD25). В норме эти клетки способствуют поддержанию иммунологической толерантности [14]. Нарушение функционирования и/или баланса супрессорных субпопуляций Treg

усиливает аутоиммунное воспаление [2]. Было показано, что удаление CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Т-клеток приводит к экспансии Т-эффекторных клеток с последующим развитием аутоиммунных расстройств [12]. К настоящему времени уже установлено, что Treg вовлекаются в патогенез аутоиммунных заболеваний, в частности РА. В 2003 году Morgan и соавт. [10] на экспериментальной модели коллаген-индуцированного артрита у мышей показали, что удаление CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg осложняет развитие воспаления, тем самым установив важную роль этих клеток в развитии данного заболевания. Последующее изучение Treg у больных РА показало более высокое содержание их в местах локального воспаления – в синовиальной жидкости [8, 9, 11]. Среди исследователей нет единого мнения о роли этих лимфоцитов в системном воспалении у больных РА и до сих пор не ясна степень их активации на периферии. Это связано с противоречивыми данными о характере содержания Treg у больных РА в периферической крови [5, 6, 7, 13].

Целью нашей работы являлось изучение содержания Treg-клеток в периферической крови больных РА по уровню экспрессии молекул CD4, CD25, FOXP3, а также анализ экспрессии этими лимфоцитами функциональной молекулы CTLA-4.

В работе было исследовано 12 образцов периферической крови больных РА, средний возраст которых составил  $62,5 \pm 10,2$  лет. Диагноз РА устанавливался на основании критериев Американской коллегии ревматологов (ASR) 1987. Все пациенты получали терапию базисными противовоспалительными препаратами. У больных была определена серопозитивная форма РА и поздняя стадия заболевания. Контрольную группу составили 10 условно здоровых лиц в возрасте  $44,7 \pm 12,6$  лет. Оценку содержания популяций лимфоцитов проводили методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 («Beckman Coulter», США) с применением программного обеспечения CXP 2.0. Для окрашивания клеток применяли следующие моноклональные антитела: CD4-PC7, CD25-PC5, CD8-PC5, CTLA-4-PE («Beckman Coulter», США), FOXP3-PE (eBioscience, США), а также соответствующие изотипические контроли. Внутриклеточное окрашивание для определения экспрессии FOXP3 и фиксацию выполняли с помощью реагента для набора для детекции FOXP3 (eBioscience, США). Для анализа внутриклеточной экспрессии CTLA-4 использовали набор для пермеабелизации IntraPrep («Beckman Coulter», США). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0, достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна-Уитни при уровне значимости  $p < 0,05$ . Исследование выполнено с применением приборов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН (ЦКП НО ИБ КарНЦ РАН).

В работе была проведена оценка содержания клеток с регуляторным фенотипом  $CD4^+CD25^{hi}$ ,  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ,  $CD4^+FOXP3^+$  у больных РА. В результате анализа полученных данных было показано, что количество  $CD4^+CD25^{hi}$  и  $CD4^+FOXP3^+$  Treg клеток у больных РА не отличалось от контроля. В то же время содержание  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  Treg клеток у больных было достоверно выше в 1,4 раза, по сравнению с контролем ( $5,65 \pm 1,57\%$  и  $4,17 \pm 0,69\%$  от  $CD4^+$  клеток, соответственно,  $p < 0,05$ ). Из литературы известно, что развитие РА может сопровождаться не только изменением количества Treg [5, 6, 7, 13], а также нарушением механизмов подавления ими аутореактивных лимфоцитов с участием таких молекул как CTLA-4 [4]. Эта молекула, подобно CD28, может связываться

с костимуляторной молекулой B7 на поверхности клетки-мишени, что приводит к подавлению активации и дальнейшей пролиферации. Как правило на Treg клетках CTLA-4 экспрессируется конститутивно, что позволяет отнести данную молекулу к числу важных функциональных маркеров Treg клеток. В связи с этим был изучен уровень экспрессии поверхностной и внутриклеточной CTLA-4 на  $CD4^+$  Т-лимфоцитах в периферической крови больных. Полученные данные свидетельствуют о том, что происходит снижение числа  $CD4^+CTLA-4^+$  клеток у больных по отношению к контролю ( $9,46 \pm 2,3\%$  и  $12,27 \pm 3,1\%$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). Вместе с тем экспрессия CTLA-4<sup>+</sup> на поверхности  $CD4^+CD25^+$  клеток была значительно выше у больных по сравнению с контролем ( $0,12 \pm 0,12\%$  и  $0,02 \pm 0,05\%$  от  $CD4^+$  клеток, соответственно,  $p < 0,05$ ), в то время как экспрессия внутриклеточной CTLA-4 на активированных Т-лимфоцитах не отличалась от контроля. Однако содержание  $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$  клеток было в 2 раза выше у больных, по сравнению с контролем ( $0,02 \pm 0,02\%$  и  $0,01 \pm 0,04\%$  от  $CD4^+$  клеток, соответственно,  $p < 0,05$ ), хотя количество этих клеток с внутриклеточной экспрессией CTLA-4 не отличалось от контроля. Кроме того, у больных было выявлено увеличение числа активированных  $CD4^+$  Т-лимфоцитов почти в 2 раза по сравнению с контролем ( $12,54 \pm 3,76\%$  и  $7,09 \pm 2,01\%$  от  $CD4^+$  клеток, соответственно,  $p < 0,01$ ). Содержание  $CD4^+CD25^{hi}CTLA-4^+$  клеток было на уровне контроля, в то время как количество этих клеток с внутриклеточной экспрессией показало снижение  $CD4^+CD25^{hi}CTLA-4^+$  клеток в 1,7 раза у больных в сравнении с контролем ( $1,63 \pm 0,6\%$  и  $2,72 \pm 0,9\%$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). Что касается популяции  $CD4^+CD25^{hi}$  Treg клеток, то в этом случае не было выявлено различий в уровне экспрессии как внутриклеточной, так и поверхностной CTLA-4. Из литературы известно, что экспрессия негативной костимулирующей молекулы CTLA-4 увеличивается после активации [3]. Поэтому полученные нами данные о повышенном содержании  $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$  лимфоцитов,  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  Treg клеток и пониженном числе  $CD4^+CD25^{hi}CTLA-4^+$  Treg может указывать на хронический воспалительный процесс, характерный для данной аутоиммунной патологии.

Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать, что развитие ау-

тоиммунного заболевания сопровождается нарушением регуляции иммунного ответа, что проявляется в дисбалансе регуляторных субпопуляций лимфоцитов. Поэтому количественные и функциональные характеристики регуляторных Т лимфоцитов могут служить прогностическим фактором у больных аутоиммунными расстройствами, а также быть терапевтическими мишенями при иммунотерапии. Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 13-04-98826, а также программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Насонов Е. Л., Насонова В. А., редакторы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008, 720с.
2. Buckner J. H. Immunology 2010, 10, 849-859.
3. Fife B. T., Bluestone J. A. Immunol Rev. 2008, 224, 166-182.
4. Flowres-Borja F, Jury E. C., Mauri C., Ehrenstein M. R. Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105 (49), 19396-19401.
5. Han G. M., O'Neil-Andersen N. J., Zurier R. B., Lawrence D. A. Cell Immunol. 2008, 253 (1-2), 92-101.
6. Kim J. R., Chae J. N., Kim S. H., Ha J. S. J. Korean Med Sci. 2012, 27 (9), 1009-13.
7. Lanlan J. I., Geng Y., Zhou W., Zhang Z. A. Int J Rheum Dis 2014.
8. Liu M. F., Wang C. R., Fung L. L., et al. Scand. J. Immunol. 2005, 62, 312-317.
9. Moradi B., Schnatzer Ph., et al. Arthritis research & therapy. 2014. 16: R97. <http://arthritis-research.com/content/16/2/R97>.
10. Morgan M. E., Suttmuller R. P., Witteveen H. J., et al. Arthritis Rheum. 2003, 48 (5), 1452-1460.
11. Mottonen M., Heikkinen J., Mustonen L., et al. Clin. Exp. Immunol. 2005, 140, 360-367.
12. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Haffler D. A. Nat. Rev. Immunol. 2010, 10, 490-500.
13. Sempere-Ortells J. M., Pérez-García V., Marín-Alberca G., et al. Autoimmunity 2009, 42 (8), 636-645.
14. Shevach E. M. Immunity 2009, 30, 636-645.

#### CHARACTERISTICS OF REGULATORY T-LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Kravchenko P. N., Oleinik E. K., Barysheva O. Yu., Zhulai G. A., Churov A. V., Oleinik V. M., Vezikova N. N., Marusenko I. M., Vybach M. V.

The content of individual subpopulations of regulatory T-lymphocytes and expression of the functional molecule CTLA-4 by them were studied in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA) and in healthy people. The data obtained showed that the quantities of cells with the regulatory phenotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> and CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> in RA patients did not differ from the control. At the same time, the content of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg cells in diagnosed patients was significantly higher than in the control. The patients were also found to have lower amounts of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CTLA-4<sup>+</sup> Treg cells, and elevated amounts of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> lymphocytes.

#### ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛЛИТОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ВИРУС ЭПШТЕЙНА-БАРР ИНФЕКЦИЕЙ

Красницкая А. С., Боровская Н. А., Красников В. Е.

ГБОУ ВПО Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Владивосток, Россия

В комплексном исследовании участвовало 103 пациента в возрасте от 18 до 74 лет с диагнозом хронический тонзиллит. Из них у 53 человек диагностирована ВЭБ-инфекция (1 группа), у 50 человек – *Streptococcus pyogenes* (2 группа). Контролем служили 30 человек – практически здоровых добровольцев, в возрасте от 18 до 45 лет. У пациентов с хроническим тонзиллитом определена недостаточность иммунного ответа по клеточному типу, со снижением уровня ИРИ и повышением содержания CD16<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>.

Ключевые слова: иммуноциты, вирус Эпштейн-Барра инфекция, хронический тонзиллит.

**Введение.** При хроническом тонзиллите инфицирование ВЭБ иммунокомпетентных клеток (В-лимфоцитов) происходит через специфический рецептор CD21. После внедрения вируса в геном В-лимфоцитов они трансформируются в вирус Эпштейн-Барра – презентующие клетки и приобретают способность к неограниченной пролиферации. Эффективный иммунный ответ на внедрение ВЭБ включает гуморальный и клеточный компоненты. Основным механизмом иммунной защиты являются вирусспецифические CD8<sup>+</sup> – цитотоксические Т-лимфоциты, а также CD4<sup>+</sup> Т-клетки, вызывающие апоптоз зараженных В-лимфоцитов [5]. Вирус, предохраняя инфицированные им В-лимфоциты от апоптоза, усиливает апоптоз Т-лимфоцитов и нейтрофилов, создавая тем самым предпосылки для своей длительной персистенции в В-клетках из-за механизмов нарушения Т-клеточного иммунологического контроля [2]. Функциональная неполноценность В-лимфоцитов приводит к снижению выработки специфических антител. ВЭБ инфицирует и нейтрофилы, результатом чего является нарушение процессов фагоцитоза [1]. Также ВЭБ способен подавлять продукцию интерферонов [3]. Таким образом, формируется иммунологическая несостоятельность клеточного и гуморального иммунитета [4].

Однако, не все исследователи единодушны в определении направленности и степени выраженности иммунных нарушений при герпетической инфекции, в том числе при ВЭБ-инфекции. Исследование Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>) и их субпопуляций (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) у пациентов с ВЭБ-инфекцией на фоне хронического тонзиллита, отличались достаточной противоречивостью, регистрировались, как низкие, или нормальные, так и высокие уровни их в крови, либо дисбаланс их содержания [4].

В связи с чем целью нашей работы стало: определении основных иммуноцитов: Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup> и их субпопуляций (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), В-лимфоцитов (CD22<sup>+</sup>) и натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>) у пациентов с хроническим тонзиллитом.

**Материалы и методы исследования.** В комплексном исследовании участвовало 103 пациента в возрасте от 18 до 74 лет с диагнозом хронический тонзиллит. У всех пациентов

произведен забор материала из зева на микрофлору и чувствительность к антибиотикам, а также методом ПЦР определяли ДНК вируса Эпштейн-Барр. Из них у 53 человек диагностирована ВЭБ-инфекция (1 группа), у 50 человек – *Streptococcus pyogenes* (2 группа). У всех обследованных пациентов хронический тонзиллит был в стадии обострения, о чем свидетельствовали наличие клинических симптомов, данные анамнеза и объективного осмотра. Больные обследованы в период разгара заболевания (1 день болезни), угасания клинических симптомов (7-й день) и в период реконвалесценции (28-й день). Контролем служили 30 человек – практически здоровых добровольцев, в возрасте от 18 до 45 лет. Для выявления ДНК ВЭБ использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Материалом для выделения ДНК ВЭБ служили кровь, слюна и эпителиальные клетки небных миндалин. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли EBV-VCA-IgM, EBV-EA-IgG, EBV-NA-IgG в сыворотке крови.

**Результаты исследования.** При исследовании фенотипа основных иммунокомпетентных клеток у пациентов с хроническим тонзиллитом было выявлено достоверное снижение относительного количества CD3<sup>+</sup>- (Т-лимфоцитов) по сравнению с группой контроля до 45,16±2,84 (p<0,001), абсолютное их количество было также снижено, но находилось в референсных пределах. Уровень CD4<sup>+</sup> – Т-хелперов был достоверно снижен по сравнению с группой контроля как по удельному весу (до 28,59±1,51% против 42,11±0,39% (p<0,001)), так и по абсолютному содержанию (0,51±0,04×10<sup>9</sup>/л против 0,98±0,09×10<sup>9</sup>/л, p<0,01). При оценке показателей CD8<sup>+</sup> и индекса ИРИ не было выявлено достоверных изменений относительного и абсолютного уровня по сравнению с контрольной группой. При оценке уровня CD16<sup>+</sup> (NK-клетки) у пациентов основной группы было выявлено достоверное увеличение как их относительного количества по сравнению с группой контроля до 26,48±1,95% против 14,00±0,4% (p<0,001) так и абсолютного их числа (0,5±0,06×10<sup>9</sup>/л против 0,3±0,03×10<sup>9</sup>/л, p<0,05). Увеличение количества натуральных киллеров в крови пациентов расценено нами как компенсаторный механизм, обеспечивающий усиление противовирусной

защиты. У обследованных нами пациентов с хроническим тонзиллитом было выявлено статистически достоверное повышенное содержание в периферической крови клеток, экспрессирующих CD22 рецептор, в 1,5–2 раза ( $26,48 \pm 1,95\%$  и  $0,5 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$  против  $14,00 \pm 0,4\%$  и  $0,3 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$  при  $p < 0,001$  и  $p < 0,05$  соответственно).

При оценке показателей гуморального иммунитета было отмечено уменьшение содержания IgA до  $1,76 \pm 0,1$  г/л ( $p < 0,001$ ) и ЦИК до  $27,42 \pm 3,0$  г/л ( $p < 0,001$ ), однако полученные результаты, не выходили за пределы референсных величин. Нами не выявлено достоверных различий в содержании IgG. Установленная тенденция к увеличению IgM, вероятно, свидетельствует о его участии в нейтрализации вирусов и их токсичных компонентов в крови ( $1,45 \pm 0,1$  г/л и  $11,96 \pm 1,1$  г/л против  $1,14 \pm 0,01$  г/л и  $10,71 \pm 0,15$  г/л при  $p < 0,001$  и  $p < 0,05$  соответственно).

При анализе результатов иммунофенотипирования клеток у пациентов с хроническим тонзиллитом в зависимости от этиологии было выявлено достоверное снижение удельного веса CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>, наименьшие значения (ниже референсных величин) зафиксированы при ВЭБ-ассоциированном тонзиллите. У пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с ВЭБ-инфекцией также было отмечено достоверное снижение относительного уровня CD8<sup>+</sup> (в пределах референсных величин). Уровень CD16<sup>+</sup> был достоверно выше у всех исследуемых пациентов (превышал значения референсных величин).

Было выявлено достоверное снижение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> у пациентов всех исследуемых групп по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ), причем ниже значений референсных величин.

Уровень как абсолютного, так и относительного содержания CD22<sup>+</sup> у пациентов I и II групп был достоверно выше по сравнению с III и контрольной группами, а также превышал значения референсных величин.

При оценке гуморального иммунитета у пациентов с хроническим тонзиллитом в зависимости от этиологии (табл. 1), было выявлено достоверное снижение IgA у пациентов I и II группы по сравнению с группой контроля, особенно низкий показатель зафиксирован у пациентов с хроническим

тонзиллитом, ассоциированным с ВЭБ-инфекцией. Не установлено статистически значимых отличий уровня IgG у пациентов с хроническим тонзиллитом в зависимости от этиологии. Зафиксировано увеличение IgM у всех исследуемых пациентов, причем наибольший показатель у пациентов с хроническим тонзиллитом вирусно-бактериальной этиологии.

При анализе количества ЦИК, было отмечено достоверное его снижение в сыворотке крови у всех пациентов. Особенно низкие показатели наблюдались у пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с ВЭБ-инфекцией ( $p < 0,05$ ).

При оценке клеточного и гуморального иммунитета у пациентов с хроническим тонзиллитом в зависимости от дополнительных ассоциаций микроорганизмов нами не было выявлено статистически значимых особенностей.

**Выводы.** У пациентов с хроническим тонзиллитом определена недостаточность иммунного ответа по клеточному типу, со снижением уровня ИРИ и повышением содержания CD16<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>. При ВЭБ-ассоциированном тонзиллите выявлено повышение количества CD22<sup>+</sup>, IgG и достоверное снижение CD8<sup>+</sup> и IgA. Хронический тонзиллит смешанной этиологии характеризовался высоким содержанием CD22<sup>+</sup> и IgG. Стрептококковая инфекция сопровождалась повышением количества CD16<sup>+</sup> клеток.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева А. А. Клинико – иммунологические особенности течения инфекционного мононуклеоза Эпштейн – Барр вирусной этиологии у детей и иммунокоррекция кипфероном: автореф. дис. на соиск. ... канд. мед. наук: 14.00.09, 14.00.36 – Красноярск, 2006. – 24 с.
2. Казмерчук В. Е., Ковальчук Л. В., Мальцев Д. В. // Клиническая иммунология и аллергология / – Ростов н/Д.: Феникс, 2009. – 524 с.
3. Орлова С. Н., Машин С. А. // Дет. инфекции. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 32–34.
4. Салахова А. Х., Азнабаева Л. Ф., Арефьева Н. А. // Фундаментальные исследования. – 2005. – № 6. – С. 104–106.
5. Ярилин А. А. // Иммунология. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 752 с.

**Таблица 1.** Содержание иммунокомпетентных клеток, иммуноглобулинов А, М, G и циркулирующих иммунных комплексов в периферической крови у пациентов с хроническим тонзиллитом в зависимости от этиологии

Показатели	Группа контроля (n=50) (ДИ)	Пациенты с хроническим тонзиллитом		
		ВЭБ-инфекция (n=30), pI	ВЭБ + <i>S.pyogenes</i> (n=64), p II	<i>S.pyogenes</i> (n=70), p III
CD3 <sup>+</sup> %	66,6±4,3 (60,00-75,00)	44,97±2,6*** p <sub>1</sub> -p <sub>2</sub> <0,05	52,94±4,67***	48,7±1,8*** p <sub>1</sub> -p <sub>3</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> (10 <sup>9</sup> /л)	1,37±0,1 (0,68-1,92)	0,87±0,09*	1,033±0,12*	1,08±0,06*
CD4 <sup>+</sup> %	42,11±0,39 (33,00-50,00)	26,51±1,46***	28,7±1,61***	27,0±2,11***
CD4 <sup>+</sup> (10 <sup>9</sup> /л)	0,98±0,09 (0,42-1,20)	0,76±0,32*	0,76±0,02*	0,81±0,17*
CD8 <sup>+</sup> %	29,60±0,35 (23,83-39,00)	16,58±1,54* p <sub>1</sub> -p <sub>2</sub> <0,05	26,6±0,3*	27,8±1,98** p <sub>1</sub> -p <sub>3</sub> <0,05
CD8 <sup>+</sup> (10 <sup>9</sup> /л)	0,55±0,01 (0,25-0,94)	0,50±0,05	0,52±0,07	0,75±0,16
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1,38±0,2 (1,30-2,10)	1,14±0,05*	0,99±0,07*	1,12±0,12*
CD16 <sup>+</sup> %	14,00±0,4 (7,00-18,00)	26,48±1,8***	27,22±2,68***	25,16±4,2***
CD16 <sup>+</sup> (10 <sup>9</sup> /л)	0,3±0,03 (0,07-0,49)	0,47±0,06	0,49±0,05	0,53±0,15
CD22 <sup>+</sup> %	16,47±0,13 (7,00-18,00)	25±3,4 ***	29,6±3,27 *** p <sub>2</sub> -p <sub>3</sub> <0,001	16,95±1,8 p <sub>1</sub> -p <sub>3</sub> <0,001
CD22 <sup>+</sup> (10 <sup>9</sup> /л)	0,38±0,01 (0,07-0,43)	0,52±0,08 *	0,53±0,07 *	0,47±0,08
IgA, г/л	2,05±0,003 (1,21-2,64)	1,07±0,1*	1,49±0,23*	2,02±0,39 p <sub>1</sub> -p <sub>3</sub> <0,05
IgG, г/л	10,71±0,15 (8,54-11,85)	12,49±1,1	13,05±2,47	10,84±0,39
IgM, г/л	1,14±0,01 (0,98-2,17)	1,45±0,1***	1,98±0,33***	1,92±0,27***
ЦИК, усл.ед.	36,2±1,10 (10,00-50,00)	17,29±1,4 *** p <sub>1</sub> -p <sub>2</sub> <0,05	25,8±3,6 ***	24,0±0,5*** p <sub>1</sub> -p <sub>3</sub> <0,05

Примечание: статистическая достоверность различий (p) с контрольной группой – p<0,05 – \*, p<0,01- \*\*, p<0,001-\*\*\*; между группами p<sub>1</sub>-p<sub>2</sub><0,05, p<sub>1</sub>- p<sub>3</sub><0,05, p<sub>2</sub>-p<sub>3</sub><0,05.

## INDICATORS OF THE IMMUNE STATUS AT PATIENTS WITH THE CHRONIC TONSILLITIS ASSOCIATED ABOUT A VIRUS OF EPSTEIN-BARR BY AN INFECTION

**Krasnitskaya A. S. Borovskaya N. A., Krasnikov V. E.**

*GBOU VPO Pacific state medical university of Ministry of Health of the Russian Federation.*

103 patients participated in complex research aged from 18 till 74 years with the diagnosis chronic tonsillitis. From them the WEB infection (1 group) is diagnosed for 53 people, 50 people have Streptococcus pyogenes (the 2nd group). As control 30 people – almost healthy volunteers, aged from 18 till 45 years served. At patients with chronic tonsillitis insufficiency of the immune answer is determined by cellular type, with decrease in the IRI level and increase of the maintenance of CD16<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>.

*Keywords: immunocytes, virus Epstein-Burra infection, chronic tonsillitis.*

## ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ВАГИНАЛЬНЫМИ ЭПИТЕЛИОЦИТАМИ, ИЗОЛИРОВАННЫМИ ОТ ЖЕНЩИН С ЭУБИОЗОМ ВЛАГАЛИЩА И БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ

Кремлева Е. А., Сгибнев А. В.

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

Исследовали изменение продукции цитокинов вагинальными эпителиоцитами, изолированными от женщин с эубиозом влагалища и бактериальным вагинозом под влиянием метаболитов нормальной микрофлоры и условно-патогенных микроорганизмов. Установлено, что эпителиоциты, сформировавшиеся в условиях эубиоза, 5–9-кратно увеличивают синтез IL-6 и IL-1 $\beta$  при взаимодействии с условно-патогенными микроорганизмами и незначительно – при контакте с экзометаболитами лактобацилл. Напротив, эпителиоциты, изолированные от женщин с бактериальным вагинозом, реагируют двукратным и более повышением экспрессии провоспалительных цитокинов на экзометаболиты лактобацилл, при этом несущественно изменяют синтез цитокинов при контакте с условно-патогенными микроорганизмами. Предполагается, что утрата эпителиоцитами, сформировавшимися при бактериальном вагинозе, способности адекватно реагировать на метаболиты микросимбионтов, является причиной снижения колонизационной резистентности женского репродуктивного тракта при дисбиозе.

*Ключевые слова:* бактериальный вагиноз, лактобациллы, мукозальный иммунитет, цитокины, эпителиоциты.

**Введение.** Дисбиотические состояния женского репродуктивного тракта характеризуются снижением колонизационной резистентности, что приводит к повышению риска инфицирования половых органов [1]. Известно, что ключевую роль в мукозальном иммунитете репродуктивного тракта, заключающуюся в координации взаимодействия компонентов врожденного и приобретенного иммунитета, играют вагинальные эпителиальные клетки [2]. Это возможно благодаря способности эпителиоцитов синтезировать широкий спектр цитокинов, дифференцированно реагируя на взаимодействие с микроорганизмами, их фрагментами или секреторными продуктами [3]. Существуют данные об изменении параметров мукозального иммунитета при дисбиотических состояниях, в частности, для бактериального вагиноза описано повышение уровня провоспалительных цитокинов и снижение концентрации факторов врожденного иммунитета [4]. Однако, не известно являются ли выявленные нарушения резуль-

татом непосредственного влияния патологической микрофлоры, или исходно измененной способности эпителиоцитов реагировать на микроорганизмы. Это и определило цель настоящего исследования.

**Цель.** Определить особенности цитокиновой реакции мукозальных эпителиоцитов влагалища, сформировавшихся в условиях нормоценоза и дисбиоза (бактериального вагиноза) на взаимодействие с вагинальными микросимбионтами.

**Материалы и методы.** В исследовании были использованы первичные культуры вагинальных эпителиоцитов, полученных в первой фазе менструального цикла с боковых стенок влагалища 22 женщин с эубиозом и 24 женщин, страдающих бактериальным вагинозом. Бактериальный вагиноз диагностировали по критериям R. Amsel [5]. После элиминации сопутствующей микрофлоры, оценивали общее количество и процент живых эпителиоцитов путем подсчета в камере Горяева после окрашивания флюорохрома диацетатом при лю-

минесцентной микроскопии [6] и довели взвесь до концентрации  $10^6$  кл/мл в растворе Хенкса.

В качестве представителей нормальных вагинальных микросимбионтов использовали штаммы *Lactobacillus spp.*, выделенные из репродуктивного тракта здоровых женщин. В качестве Gr «-» представителей условно-патогенной микрофлоры были выбраны штаммы *E. coli*, в качестве Gr «+» – штаммы *S. aureus* вагинального происхождения. Лактобациллы культивировали в бульоне MRS (Sifin, Германия), *E. coli* и *S. aureus* – в 2% мясопептонном бульоне (НПО «Питательные среды», Махачкала) в микроаэрофильных условиях при 37°C.

Для определения влияния микросимбионтов на экспрессию вагинальными эпителиоцитами цитокинов к их взвеси добавляли фильтраты суточной культуральной жидкости выбранных микросимбионтов, соблюдая объемное соотношение микробный супернатант/взвесь эпителиоцитов – 1/7.

После 6 часов культивирования в эпителиальных супернатантах определяли концентрацию цитокинов IL1 $\beta$ , IL6, IL8, TNF $\alpha$  иммуноферментным методом, используя наборы производства ООО «Цитокин», С-Петербург, TGF  $\beta$ 1 - BD Biosciences, США по протоколам, рекомендованным фирмами-производителями.

Полученные данные обрабатывались статистически: сравнение средних значений показателей проводили по парному критерию Стьюдента в случае зависимых выборок и по t-критерию Стьюдента для независимых выборок. Различия между группами считали значимыми при  $p \leq 0,05$  [7].

**Результаты.** Мы наблюдали различия в уровнях базовой экспрессии цитокинов эпителиоцитами, сформировавшимися при состоянии нормоценоза и бактериального вагиноза. Так, уровень продукции IL1 $\beta$  эпителиоцитами, изолированными при бактериальном вагинозе, составил  $17,8 \pm 2,1$  пг/мл, при зубиозе –  $8,7 \pm 0,9$  пг/мл, IL-8 –  $69,9 \pm 4,1$  пг/мл и  $43,1 \pm 1,9$  пг/мл, IL-6 –  $9,6 \pm 1,3$  пг/мл и  $4,1 \pm 0,8$  пг/мл, TNF $\alpha$  –  $4,9 \pm 0,7$  пг/мл и  $7,5 \pm 1,2$  пг/мл, TGF  $\beta$ 1 –  $51,3 \pm 9,3$  пг/мл и  $98,2 \pm 12,4$  пг/мл, соответственно. То есть, базовая секреция цитокинов эпителиоцитами, сформировавшимися при бактериальном вагинозе, характеризовалась повышенным уровнем экспрессии IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6 и пониженным – TNF $\alpha$  и TGF  $\beta$ 1. Вероятно, данные результаты можно объяснить длительным влиянием на формирующиеся эпителиоциты продуктов метаболизма патологического микроокружения.

Измененной оказалась и реакция эпителиальных клеток на стимуляцию секреторными продуктами вагинальных микросимбионтов. При взаимодействии эпителиоцитов, сформировавшихся при бактериальном вагинозе, с секреторными продуктами *S.aureus* и *E. coli* экспрессия провоспалительных цитокинов изменялась не значительно (табл. 1). Тогда как, взаимодействие вагинальных эпителиоцитов, развившихся в условиях нормоценоза, с секреторными продуктами *S.aureus* и *E. coli* приводило к выраженной стимуляции продукции IL-6 и IL-1 $\beta$  (табл. 1).

Напротив, супернатанты лактобацилл вызывали усиление экспрессии IL-6 и IL-1 $\beta$  эпителиоцитами, полученными от пациен-

**Таблица 1.** Изменение экспрессии цитокинов эпителиоцитами, изолированными из разных типов микробиоценоза влагалища, при взаимодействии с микросимбионтами.

Кратность изменения экспрессии цитокинов	Влияние секреторных продуктов микросимбионтов					
	<i>Lactobacillus spp.</i>		<i>S.aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Н.	Б.В.	Н.	Б.В.	Н.	Б.В.
IL-6	$1,4 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2^*$	$5,8 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1^*$	$8,7 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1^*$
IL-1 $\beta$	$1,2 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1^*$	$7,5 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1^*$	$4,6 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,1^*$
IL-8	$1,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
TNF $\alpha$	$2,2 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1^*$	$1,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1^*$	$0,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
TGF $\beta$ 1	$1,9 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1^*$	$0,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2^*$

Н- вагинальные эпителиоциты, сформированные в условиях нормоценоза;

Б.В. – вагинальные эпителиоциты, сформированные в условиях бактериального вагиноза.

\*  $p \leq 0,05$  – статистически значимые различия при сравнении с эпителиоцитами, сформировавшимися при нормоценозе

ток с бактериальным вагинозом, тогда как нормальные эпителиоциты на взаимодействие с экзометаболитами лактобацилл почти не реагировали (табл. 1). То есть, эпителиоциты, полученные при нормоценозе и бактериальном вагинозе, при взаимодействии с вагинальными микросимбионтами демонстрировали диаметрально противоположную реакцию. Это наблюдалось и в отношении TGF  $\beta$ 1. Взаимодействие нормальных эпителиоцитов с лактобациллами вызывало стимуляцию синтеза TGF  $\beta$ 1, а с *S. aureus* и *E. coli* – подавление. Тогда как, у эпителиоцитов, развившихся в условиях дисбиоза, наоборот, усиление экспрессия TGF  $\beta$ 1 происходило при взаимодействии с *S. aureus* и *E. coli*, а снижение – в результате контакта с экзометаболитами лактобацилл (табл. 1).

Обнаруженными особенностями цитокиновой реакции вагинальных эпителиоцитов, сформировавшихся в условиях дисбиоза, можно отчасти объяснить снижение колонизационной резистентности, наблюдаемое при бактериальном вагинозе [8]. Вероятно, причиной этого служит утрата ключевой в мукозальном иммунитете влагалища клеткой – эпителиоцитом способности адекватно реагировать на сигналы со стороны микробного окружения. При этом эпителиоциты практически не реагируют на потенциально патогенную микрофлору, зато демонстрируют несоразмерно бурную реакцию на представителей нормальной микрофлоры.

Работа выполнена при поддержке гранта (проект № 12-У-4-1023) Программы инициативных фундаментальных исследований УРО РАН и гранта программы Президиума РАН № 5 «Фундаментальные науки – медицине», проект № 12-П-4-1015.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черкасов С. В. Бактериальные механизмы колонизационной резистентности репродуктивного тракта женщин. Журн. микробиол. 2006, 4, 100-105.
2. Wira C. R., Grant-Tschudy K. S., Crane-Godreau M. A. Epithelial Cells in the Female Reproductive Tract: a Central Role as Sentinels of Immune Protection. Am. J. Reprod. Immunol. 2005, 53 (2), 65-76.
3. Кремлева Е. А., Черкасов С. В. Продукция цитокинов вагинальными эпителиоцитами в процессе взаимодействия с доминантными и ассоциативными микросимбионтами. Жур. микробиол. 2012, 4, 114-118.
4. Cauci S. I., Culhane J. F. Modulation of vaginal immune response among pregnant women with bacterial vaginosis by *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and yeast. Am. J. Obstet. Gynecol. 2007, 196 (2), 133.e1-7.
5. Amsel R., Totten P. A., Spiegel C. A., Chen K. C., Eschenbach D., Holmes K. K. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am. J. Med. 1983, 74 (1), 14-22.
6. Лимфоциты: Методы: Пер. с англ. Под ред. Дж. Клауса Мир, Москва 1990, 394.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. Практика, Москва 1998, 459.
8. Кира Е. Ф. Бактериальный вагиноз. ООО «Нева-Люкс», Санкт-Петербург 2001, 364.

### CYTOKINE PRODUCTION BY VAGINAL EPITHELIAL CELLS ISOLATED FROM HEALTHY WOMEN AND WOMEN WITH BACTERIAL VAGINOSIS

Kremleva E. A., Sgibnev A. V.

*Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg*

Modification of cytokine production by vaginal epithelial cells isolated from healthy women and women with bacterial vaginosis under the influence of metabolites of normal microflora and opportunistic pathogens has been studied. Cytokine production by epithelial cells obtained from healthy women, strongly (5–9 fold) increased when interacting with opportunistic pathogens and slightly – in contact with *Lactobacillus* metabolites. In contrast, epithelial cells isolated from women with bacterial vaginosis, react twice or more increase in the expression of proinflammatory cytokines on the secretory products of lactobacilli, while insignificant change cytokine synthesis in contact with opportunistic microorganisms. Likely loss of epithelial cells the ability to respond adequately on the metabolites of microorganisms, is the cause of reducing the colonization resistance of the female reproductive tract at bacterial vaginosis.

*Keywords: bacterial vaginosis, cytokines, epithelial cells, lactobacilli, mucosal immunity.*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Кудрявцев И. В.<sup>1</sup>, Захарова Г. А.<sup>2</sup>, Гапонова Т. В.<sup>2</sup>, Горчакова М. В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Дальневосточный федеральный университет, <sup>2</sup> СПб ГБУЗ «Клиническая ревматологическая больница № 25», <sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Россия

С использованием антител против CD45RA и CD62L проведено исследование основных субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов у больных ревматоидным артритом. Среди Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток выявлены популяции наивных (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), центральных клеток памяти (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), эффекторных клеток памяти (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) и «терминально-дифференцированных CD45RA-позитивных» эффекторных клеток (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). Для каждой из популяций определены нормативные показатели как в относительных, так и в абсолютных величинах. Показано, что при ревматоидном артрите наблюдается значительное увеличение клеток популяций с эффекторным фенотипом как среди Т-хелперов, так и цитотоксических Т-клеток.

*Ключевые слова:* проточная цитофлуориметрия, субпопуляции Т-лимфоцитов, клетки памяти, эффекторные клетки, ревматоидный артрит.

**Введение.** В рамках исследования различного рода аутоиммунных патологических состояний особое внимание традиционно уделяется изучению субпопуляционного состава В-клеточного звена приобретенного иммунитета [1]. Вместе с тем, развитие и прогрессирование большинства аутоиммунных заболеваний сопровождается существенными качественными и количественными изменениями Т-лимфоцитов [2]. В настоящее время существует несколько основных подходов к классификации этих клеток – способность к синтезу и продукции эффекторных цитокинов; экспрессия молекул (хемокиновых рецепторов и адгезионных молекул), отвечающих за миграцию Т-клеток в определенные ткани; и, наконец, определение уровня «зрелости» или степени дифференцировки клеток [3]. Последний из приведенных выше подходов предполагает определение уровня экспрессии на поверхности Т-клеток таких молекул как CD45RA (и/или CD45R0) и CD62L (и/или CCR7 и/или CD27). С использованием антител против любой пары указанных выше поверхностных антигенов (в нашем случае – пара CD45RA и CD62L) Т-клетки можно разделить

на четыре популяции, соответствующие четырем стадиям дифференцировки. Самые незрелые или «наивными» (N) Т-клетки, прошедшие только стадию антиген-независимой дифференцировки в тимусе и мигрирующие во вторичные лимфоидные органы, будут иметь фенотип CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. Клетки центральной памяти (CM) – Т-клетки, сформировавшиеся в ходе антиген-зависимой дифференцировки и мигрирующие от одного периферического лимфоидного органа к другому в поисках повторного контакта со своим специфическим антигеном – будут иметь фенотип CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>. Третьей популяцией, на поверхности которой не обнаруживаются ни CD45RA, ни CD62L, является клетки эффекторной памяти (EM). Эти клетки не способны проникать в периферические лимфоидные органы, но обладают высокими эффекторными функциями – способность к синтезу цитокинов в случае Т-хелперов или эффективному уничтожению клеток-мишеней в случае цитотоксических Т-клеток. И, наконец, так называемые «терминально-дифференцированные CD45RA-позитивные» эффекторные клетки (TEMRA), представляющие собой, по крайней

мере, среди цитотоксических Т-клеток, наиболее высоко дифференцированную и короткоживущую популяцию лимфоцитов [4]. Итак, целью данной работы было исследование распределения Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток по данным популяциям в группе условно здоровых доноров и больных ревматоидным артритом.

**Материалы и методы.** В ходе проведенного исследования для выявления основных популяций Т-хелперов и Т-киллеров использовался следующий набор моноклональных антител (все антитела производства Beckman Coulter Inc., США), конъюгированных с различными флуорохромами: CD45RA-FITC (кат. № A07786), CD62L-PE (кат. № IM2214U), CD8-PC5,5 (кат. № A99019), CD3-PC7 (кат. № 737657), CD4-APC (кат. № IM2468) и CD45-APC-Alexa Fluor 750 (кат. № A79392). Объектом исследования служила периферическая кровь 61 условно здорового донора и 26 пациентов с диагнозом «ревматоидный артрит» (РА), постоянно проживающих на территории Санкт-Петербурга. Окраску препаратами антител производили в соответствии с рекомендациями производителя. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOtest 3 Fixative Solution (кат. № A07800), в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный двумя диодными лазерами 488 и 638 нм. Для корректного исключения из зоны анализа клеток, которые не соответствовали по размерам и структуре неповрежденным лимфоцитам, вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения клеток по малоугловому и боковому светорассеянию, а также уровню экспрессии CD45. Для каждого из образцов анализировали не менее 20000 лимфоцитов, отвечающих указанным выше условиям. Абсолютные значения были получены как в одноплатформенной (с помощью реагента FlowCount™ (кат. № IM3631, Beckman Coulter, США)), так и в двухплатформенной (с использованием результатов гематологического анализа, полученных на гематологическом анализаторе DxH800 (Beckman Coulter, США)) системах. Математическую обработку цитоф-

луориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.3 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 6.1 (StatSoft). Полученные в ходе проведенного исследования результаты обследования приведены в таблице в виде медианы и интерквартильного размаха – Med (25; 75). Различия между контрольной группой и группой больных РА оценивали в соответствие с непараметрическим критерием Манна-Уитни.

**Результаты и обсуждение.** При анализе Т-клеточного звена приобретенного иммунитета в группах больных РА и условно здоровых доноров было показано, что данные группы достоверно не различаются по уровню Т-клеток. Вместе с тем, у больных РА отмечено увеличение относительного числа Т-хелперов ( $p=0,0007$ ), а также снижение относительного ( $p=0,0136$ ) и абсолютного ( $p=0,0031$ ) содержания цитотоксических Т-клеток (см. таблица). Столь же существенные различия были обнаружены при анализе соотношения CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток, когда для группы больных РА средние значения составили  $2,64 \pm 0,25$  и  $1,77 \pm 0,06$  для группы сравнения ( $p < 0,001$ ).

Исследование уровня популяций Т-хелперов, различающихся по уровню экспрессии CD45RA и CD62L, показало, что уровень наивных клеток, а также клеток центральной и эффекторной памяти достоверно не различается между сравниваемыми группами, что подтверждается данными литературы [5]. Вместе с тем, у больных РА обнаружено достоверное увеличение как относительного ( $p=0,0001$ ), так и абсолютного ( $p=0,0002$ ) содержания TEMRA CD4+ клеток, функциональные и фенотипические характеристики которых позволяют рассматривать их в качестве коротко живущих эффекторных Т-хелперов [6].

Результаты изучения распределения CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток по экспрессии CD45RA и CD62L носят несколько противоречивый характер. Например, Maldonado и соавторами при анализе цитотоксических Т-клеток было отмечено увеличение количества клеток центральной памяти, в первую очередь, за счет клеток с фенотипом CD45RA+CD62L- [7]. Тогда как в более поздних работах, в которых для типирования Т-клеток использовались CD45RA CD62L, отмечалось увеличение именно цитотоксических Т-клеток с эффекторным феноти-

Таблица. Распределение Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток по популяциям в зависимости от уровня экспрессии CD45RA и CD62L в группах условно здоровых доноров и больных ревматоидным артритом.

Показатель	Доноры		Больные РА	
	%	#	%	#
CD3 <sup>+</sup>	74,43 (69,09; 79,46)	1290 (1092; 1719)	75,355 (68,67; 82,25)	1147 (894; 1432)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> :	44,54 * (40,36; 49,19)	778 (634; 1061)	49,85 (44,91; 55,16)	771 (632; 1005)
– naïve	35,61 (29,86; 43,80)	268 (163; 395)	34,25 (20,86; 47,27)	293 (147; 408)
– CM	42,37 (37,24; 47,18)	321 (251; 437)	40,95 (32,77; 50,42)	300 (255; 406)
– EM	22,09 (16,10; 25,67)	167 (131; 212)	17,24 (12,82; 24,80)	131 (105; 243)
– TEMRA	0,41 * (0,08; 0,96)	4 * (1; 7)	1,31 (0,53; 4,24)	12 (5; 32)
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> :	25,08 (22,09; 29,86)	460 * (385; 617)	21,71 (18,08; 26,59)	346 (219; 505)
– naïve	38,77* (27,10; 49,43)	164 * (104; 289)	20,63 (15,42; 33,07)	70 (45; 108)
– CM	12,16 (8,97; 15,42)	53 (43; 73)	16,19 (8,42; 24,81)	54 (30; 90)
– EM	21,87 (17,24; 29,10)	101 * (79; 135)	21,16 (15,89; 33,90)	64 (44; 121)
– TEMRA	23,35 * (15,36; 31,14)	100 (63; 166)	32,96 (23,24; 49,29)	127 (56; 222)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,63 * (0,48; 0,84)	12 * (8; 18)	1,35 (0,64; 1,99)	19 (14; 37)

Примечание: для CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> результат представлен в процентах от общего числа лимфоцитов; для популяций наивных клеток («naïve»), клеток центральной («CM») и эффекторной памяти («EM»), а также «терминально-дифференцированных» эффекторных клеток («TEMRA») приведены в процентах от общего числа Т-хелперов («CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>») и цитотоксических Т-клеток («CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>»), соответственно. \* – различия между контрольной группой и группой больных РА достоверны при уровне значимости  $p < 0,05$  в соответствии с непараметрическим критерием Манна-Уитни.

пом CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> [5]. Собственные результаты, приведенные в таблице, свидетельствуют об уменьшении как относительного ( $p=0,0001$ ), так и абсолютного ( $p < 0,0001$ ) содержания наивных CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> у больных РА. Кроме того, имело место и увеличение ( $p=0,0013$ ) относительного содержания клеток популяции TEMRA по сравнению с контролем.

Отдельного упоминания заслуживает тот факт, что у больных РА значительно возрастает как относительное ( $p=0,0002$ ), так и абсолютное ( $p=0,0019$ ) содержание Т-клеток, одновременно экспрессирующих как CD4, так и CD8. Клетки данного фенотипа являются весьма гетерогенной популяций, в ко-

торой доминируют эффекторные и высоко дифференцированные клетки [8]. Таким образом, приведенные результаты еще раз указывают на значительное увеличение в периферической крови больных РА эффекторных Т-клеток. Литературные данные также свидетельствуют о том, что увеличение высоко дифференцированных Т-лимфоцитов – как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-клеток – характерно и для других системных аутоиммунных заболеваний, например, для синдрома Шегрена [9]. Более того, снижение числа Т-клеток с «эффекторным фенотипом», например, CD28-негативных Т-хелперов, может являться признаком успешно проведенной

терапии при ревматоидном артрите [10]. Данное обстоятельство позволяет рассматривать полученные нами значения для группы условно здоровых доноров в качестве референсных при оценке эффективности проводимой терапии для больных РА.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yanaba K., Bouaziz J. D., Matsushita T., Magro C. M., St Clair E. W., Tedder T. F. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 2008. 223. 284-299.
2. Abbas A. K., Lohr J., Knoechel B. Balancing autoaggressive and protective T cell responses. *J. Autoimmun.* 2007. 28. 59-61.
3. Maecker H. T., McCoy J. P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat. Rev. Immunol.* 2012. 12. 191-200.
4. Takata H., Naruto T., Takiguchi M. Functional heterogeneity of human effector CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood.* 2012. 119. 1390-1398.
5. Fekete A., Soos L., Szekanecz Z., Szabo Z., Szodoray P., Barath S., Lakos G. Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. *J. Autoimmun.* 2007. 29. 154-163.
6. Libri V., Azevedo R. I., Jackson S. E., Di Mitri D., Lachmann R., Fuhrmann S., Vukmanovic-Stejic M., Yong K., Battistini L., Kern F., Soares M. V., Akbar A. N. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. *Immunology.* 2011. 132. 326-339.
7. Maldonado A., Mueller Y. M., Thomas P., Bojczuk P., O'Connors C., Katsikis P. D. Decreased effector memory CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T cells and increased central memory CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* 2003. 5. 91-96.
8. Parel Y., Chizzolini C. CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun. Rev.* 2004. 3. 215-220.
9. Smolenska Z., Pawłowska J., Zdrojewski Z., Daca A., Bryl E. Increased percentage of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells correlates with clinical activity in primary Sjögren's syndrome. *Cell Immunol.* 2012. 278. 143-151.
10. Scarsi M., Ziglioli T., Airo P. Decreased circulating CD28-negative T cells in patients with rheumatoid arthritis treated with abatacept are correlated with clinical response. *J. Rheumatol.* 2010. 37. 911-916.

## RESEARCH OF THE MAIN SUBPOPULATIONS T-HELPEROV AND CYTOTOXIC T-CAGES AT RHEUMATOID ARTHRITIS

<sup>1</sup>Kudriavcev I. V., <sup>2</sup>Zaxarova H. A., <sup>2</sup>Gaponova T. V., <sup>3</sup>Gorchacova M. V.

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution Scientific Research Institute of Experimental Medicine of SZO Russian Academy of Medical Science; Far East federal university, <sup>2</sup>Spb GBUZ "Clinical Rheumatologic Hospital No. 25", <sup>3</sup>GBOU VPO "First St. Petersburg State Medical University of a Name of the Academician of Nominative of Pavlov" of Ministry of Health of the Russian Federation.

Multicolor flow cytometry was used to analyze naïve cells (CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>), central memory (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>) and effector memory cells (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) as well as terminally differentiated CD45RA-positive effector cells (CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) in the populations of T-helpers and cytotoxic T-cells. The absolute numbers and percent of these cell subsets were quantified in peripheral blood of healthy donors and patients with rheumatoid arthritis. We found increased frequencies of circulating CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells with effector phenotype in patients with rheumatoid arthritis.

*Keywords: flow cytometry, subpopulations of T-lymphocytes, memory cages, effector cages, rheumatoid arthritis.*

## ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИЯ КАК МЕТОД ПРОГНОЗА ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Лабис В. В.<sup>1</sup>, Базикян Э. А.<sup>1</sup>, Козлов И. Г.<sup>2</sup>, Гусева О. А.<sup>3</sup>, Хайдуков С. В.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Кафедра пропедевтической стоматологии МГМСУ им. А. И. Евдокимова, <sup>2</sup>Кафедра фармакологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, <sup>3</sup>Лаборатория клеточной иммунологии, ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева», Минздрава России,

<sup>4</sup>Технопарк, ФГБУН «ИБХ им. Акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Иммунофенотипирование лимфоцитов крови перед дентальной имплантацией свидетельствует об актуальности и целесообразности проведения иммунологического обследования с помощью метода многоцветной проточной цитофлюориметрии. Разработанный алгоритм иммунологического исследования предоставляет возможность выявлять аутоиммунную компоненту у пациента до наступления клинической симптоматики, и установить наличие воспалительного процесса различной этиологии, в частности в ротовой полости, что позволяет в дальнейшем избежать возможных осложнений при проведении дентальной имплантации.

**Keywords:** проточная цитометрия, профилактика периимплантации, репаративный остеогенез, иммунорегуляция.

**Введение.** Проточная цитофлюориметрия является высокоточным методом определения субпопуляционного состава клеток иммунной системы, позволяющим расшифровывать патогенез заболеваний и выбирать стратегию и тактику профилактических и лечебных мероприятий [1]. Данный метод исследования может быть использован в клинической практике для диагностики и мониторинга проведенной терапии пациентов при дентальной имплантации.

Как известно, любое оперативное вмешательство приводит к развитию иммунного ответа, направленного на регуляцию репаративных процессов в организме человека. Активация врожденных и адаптивных механизмов иммунной регуляции при повреждении тканей, позволило выдвинуть предположение о способности иммунной системы регулировать процесс репаративного остеогенеза, в частности при проведении операции дентальной имплантации [2, 3, 4]. В связи с этим, возникает необходимость в надежных методах исследования иммунокомпетентных клеток, их субпопуляционного состава и функционального состояния, которые позволят прово-

дить раннюю диагностику возможных осложнений различного генеза. Одним из таких методов в практике хирурга-имплантолога может стать проточная цитофлюориметрия.

Целью настоящего исследования было разработка алгоритма иммунологического исследования при дентальной имплантации и выявлении с его помощью неблагоприятных факторов, приводящих к возникновению постимплантационных осложнений.

**Материалы и методы.** Обследовано 10 человек, обратившихся для проведения дентальной имплантации с положительным анамнезом. Материалом исследования являлась периферическая кровь и кровь, полученная непосредственно из лунок зубов после удаления, а также из сформированного под дентальный имплантат костного ложа. Абсолютное и относительное количество лимфоцитов в исследуемых образцах проводили на гематологическом анализаторе UniCel® DxH™ 800 (BeckmanCoulter, США). Идентификацию субпопуляций лимфоцитов проводили методом шестицветной проточной цитофлюориметрии [5]. Для окрашивания клеток были использованы mAT: 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 цитофлуориметре Navios (США) как описано в [6]. Анализировали следующие субпопуляции лимфоцитов: общие Т-лимфоциты, Th, Tc, T<sub>reg</sub>, Th-эффекторы, Th<sub>naev</sub>, T<sub>activ</sub>, общие В-лимфоциты, В1, В2, В<sub>mem</sub>, В<sub>пролиф</sub>, NK-клетки, NKT-клетки, NK цитолитические, NK цитокинпродуцирующие, NK<sub>пролиф</sub>, NK<sub>reg</sub>. Математическую обработку данных проводили при помощи программы Kaluza v. 1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Statistica 6.1 (StatSoft).

**Результаты.** В ходе проведения иммунологического обследования пациентов, обратившихся по вопросу дентальной имплантации, у одного из них (пациент X) была выявлена аутоиммунная компонента, предполагающая наличие или вероятность развития аутоиммунной патологии. Однако при сборе анамнеза, ни в результате проведения общепринятого предоперационного обследования наличие аутоиммунной патологии выявлено не было, а со слов самого пациента, он был практически здоров, хотя за неделю до операции перенес легкую форму вирусной инфекции. В дальнейшем иммунологическое обследования выявило значительное отличие от физиологической нормы некоторых клеточных показателей иммунной системы данного пациента, как в периферической крови, так и в крови костного ложа.

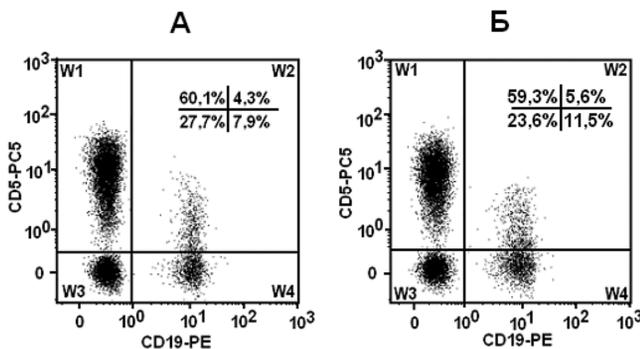


Рисунок 1. Гистограммы распределения В1-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) в периферической крови (А) и крови костного ложа (В).

Как видно из рис. 1, у пациента X наблюдалось значительное увеличение аутоиму-

нореактивного клона клеток В1 с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> как в периферической крови (А), так и в образцах крови, полученной из костного ложа (Б). При этом в костном ложе количество В1-клеток несколько превышало такое, по сравнению с периферической кровью (4,04% и 5,34% соответственно, при физиологической норме 1,3±0,8%). Помимо этого у данного пациента было выявлено повышение активированных В-лимфоцитов с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>. Следует отметить, что и в количественном отношении CD23<sup>+</sup> В-клеток в крови костного ложа было больше, чем в периферической крови (6,7% и 5,4% соответственно). Однако, и в том, и в другом случае количество этих клеток незначительно превышает физиологическую норму (≤ 5%).

Также, у данного пациента отмечено выраженное изменение состава NK-клеточного звена. Общее содержание NK-клеток как в периферической крови, так и в крови из костного ложа значительно превышало уровень нормы (12,5±4,5%) и составляло 29,74% и 25,88% соответственно. Причем, в периферической крови их количество увеличивалось за счет цитокинпродуцирующих NK-клеток с фенотипом CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>, тогда как в крови, взятой из лунки костного ложа, за счет и цитокинпродуцирующих, и цитолитических NK-клеток с фенотипом CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>.

Особый интерес вызывает популяция NK-клеток, экспрессирующих αα-гомономер CD8, которые обладают долговременной жизнеспособностью и участвуют в многократном лизисе клеток-мишеней. В норме количество этих клеток не превышает 5% от всех лимфоцитов (2,75±2,25), в то время как у данного пациента содержание этих клеток более чем в 2 раза превышало физиологическую норму (p<0.05). Причем значительное повышение доли этих клеток отмечалось как в периферической крови, так и в крови, взятой из лунки костного ложа (рис.2А и 2Б соответственно).

Кроме описанного выше, было выявлено, что количество эффекторных Т-хелперов/Т-хелперов памяти с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup> в 3 раза превышало таковое наивных Т-хелперов CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>. На рис 3 представлены гистограммы распределения субпопуляций Т-хелперов в периферической крови (рис.3А) и крови костного ложа (рис.3Б).

Как видно из рис. 3 количество Т-хелперов, экспрессирующих молекулу CD45R0 у обследу-

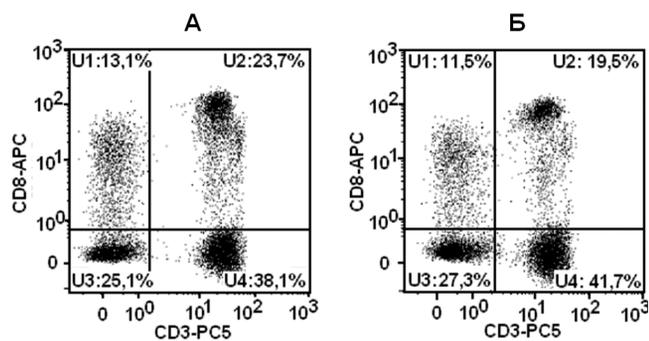


Рисунок 2. Гистограммы распределения NK-клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -гомомер CD8 (CD3-CD8<sup>+</sup>) в периферической крови (А) и крови костного ложа (Б).

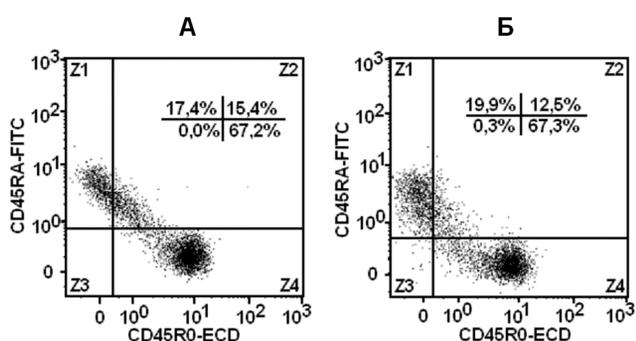


Рисунок 3. Гистограмма распределения CD45RA и CD45R0 на Т-хелперах периферической крови (А), крови костного ложа (Б) при дентальной имплантации. Наивные Т-хелперы (фенотип CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>), квадранты Z1, Т-хелперы-эффекторы/Т-хелперы памяти (фенотип CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>), квадранты Z4.

емого пациента практически в 2 раза выше, чем у здорового донора, тогда как содержание наивных Т-хелперов, экспрессирующих молекулу CD45RA, в 2,5 (кровь из костного ложа) и 3 раза (периферическая кровь) снижена по отношению к таковому у здорового донора.

**Обсуждение результатов.** Для характеристики направленности иммунных реакций, протекающих в костной ткани, в качестве образцов, помимо периферической крови, была использована кровь из лунки сформированного костного ложа. Такой подход позволит не только оценить выраженность того или иного процесса со стороны костной ткани, но и адекватно определить выбор протокола дентальной имплантации (немедленной или отсроченной) с учетом регенераторных возможностей организма при проведении операций методами НКР (направленной костной регенерации) и/или использовании свободных

хаутокостных трансплантатов. В свою очередь шестицветный цитофлуориметрический анализ позволил провести раннюю диагностику предрасположенности одного из обследованных пациентов к аутоиммунной патологии, что могло бы стать причиной возникновения осложнений при проведении дентальной имплантации.

Одним из результатов настоящего исследования явилось выявление наличия аутоиммунной компоненты до проявления у пациента клинической симптоматики аутоиммунной патологии. Такой аутоиммунной составляющей клеточного иммунитета является увеличение аутоиммунореактивного клона В-лимфоцитов (B1). Повышенное содержание этих клеток в периферической крови и крови костного ложа наряду с возрастанием количества активированных В-лимфоцитов с экспрессией молекулы CD23 может указывать на наличие или вероятность развития аутоиммунной патологии.

Кроме того, у пациента X отмечалось повышенное содержание NK-клеток как в периферической крови, так и в крови костного ложа, что может свидетельствовать о наличии вирусной инфекционной патологии или являться следствием перенесенного в тяжелой форме вирусного заболевания. Подтверждением последнего может являться повышение в периферической крови НКТ-клеток, а также долгоживущих, устойчивых к апоптозу NK-клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -гомомер CD8.

Следует отметить, что, несмотря на достаточно низкое содержание, как в периферической крови, так и в образцах крови из костного ложа наивных Т-хелперов, экспрессирующих CD45RA, уровень Т-хелперов, экспрессирующих хемокиновый рецептор CCR7 во всех исследованных образцах крови соответствовал физиологической норме. Это может являться показателем благоприятности иммунопоза, поскольку CCR7 экспрессируется на наивных Т-хелперах, покидающих тимус после дифференцировки.

Таким образом, среди выявленных иммунологических нарушений у конкретного пациента, наиболеестораживающимися в качестве факторов риска приживляемости дентального имплантата или развития отсроченных инфекционно-воспалительных осложнений можно рассматривать: увеличение B1-

лимфоцитов и активированных В-клеток как показателей наличия или риска развития аутоиммунных реакций; увеличение доли эффекторных Т-хелперов/Т-хелперов памяти и, соответственно, уменьшение доли наивных Т-хелперов, а также повышенное содержание общих НК-клеток, долгоживущих CD8<sup>+</sup> НК-клеток и НКТ-клеток в качестве показателей персистенции вирусной инфекции и предрасположенности к возникновению инфекционно-воспалительных осложнений в полости рта.

**Выводы.** Изложенное выше, может свидетельствовать в пользу актуальности и целесообразности проведения иммунологического обследования с помощью метода многоцветной проточной цитофлуориметрии. Разработанный алгоритм иммунологического исследования предоставляет возможность выявлять аутоиммунную компоненту у пациента до наступления клинической симптоматики, и установить наличие воспалительного процесса различной этиологии, в частности в ротовой полости, что позволяет в дальнейшем избежать возможных осложнений при проведении дентальной имплантации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. В. Хайдуков., А. В. Зурочка, В. А. Черешнев. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. // Екатеринбург: УрО РАН, 2011., С. 188.
2. Базилян Э. А., Лабис В. В. Прошлое и будущее в понимании механизма остеоинтеграции дентальных имплантатов // Медицина катастроф.- 2012.- № 2, С. 57-61.
3. Базилян Э. А., Лабис В. В. Иммунореактивность и остеоинтеграция дентальных имплантатов // Медицина катастроф.- 2012.- № 3, С. 29-32.
4. Базилян Э. А., Лабис В. В. Иммунологические аспекты механизма остеоинтеграции дентальных имплантатов // Медицина катастроф.- 2013.- № 2, С. 59-63.
5. Claude L., Lobagiu C., Genin C. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of new flowcytometer // Cytometry. Pt B (Clinic. Cytom.), 2005. Vol. 70B.P. 29-38.
6. Хайдуков С. В., Байдун Л. В., Зурочка А. В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект). // Медицинская иммунология.- 2012.- Т. 14 (3).- С. 255-268.

## FLOW CYTOMETRY AS A METHOD FOR PREDICTION OF COMPLICATIONS FOR DENTAL IMPLANTATION

Labis V. V., Bazikyan E. A., Kozlov I. G., Guseva O. A., Khaidukov S. V.

Immunophenotyping of blood lymphocytes before dental implantation shows the relevance and feasibility of an immunological study by using the multicolor flow cytometry. Developed an algorithm for immunological examination which enables to identify the autoimmune component of the patient before onset of clinical symptoms, and to establish the presence of inflammation of various etiologies, especially in the mouth. This results can help further avoid possible complications for dental implants.

*Keywords: flow cytometry, the prevention of peri-implantitis, reparative osteogenesis, immunoregulation.*

## ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ЛЮМИНОЛЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ У БОЛЬНЫХ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Левашова О. А., Золкорняев И. Г., Алешина Н. И.

*Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Пензенский институт усовершенствования врачей»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пенза, Россия*

Исследована функциональная активность нейтрофилов по показателям люминолзависимой хемилюминесценции у больных ишемическим инсультом в остром периоде в динамике. У больных с тяжелым течением ишемического инсульта выявлено повышение спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции и снижение резерва активации нейтрофилов. Исследование функциональной активности нейтрофилов у больных ишемическим инсультом способно отражать тяжесть ишемического повреждения мозга и раскрыть патофизиологические механизмы заболевания.

*Ключевые слова:* люминолзависимая хемилюминесценция, нейтрофилы, ишемический инсульт.

**Введение.** Ишемический инсульт занимает одно из первых мест по причинам смерти и инвалидизации в мире. Несмотря на достижения в изучении патогенетических механизмов развития этой патологии, необходим поиск новых подходов и целей терапевтического воздействия, что позволило бы улучшить исход заболевания. Острый период церебральной ишемии характеризуется сложным каскадом патофизиологических механизмов, часто связанных с образованием активных форм кислорода, основным источником которых являются полиморфноядерные лейкоциты – нейтрофилы. Повышенная генерация кислородных радикалов при активации НАДФ-оксидазы играет важную роль в механизмах повреждения мембран, цитотоксического, иммунорегуляторного и микробицидного действия. Выяснение роли нейтрофилов, оксидантных процессов в механизмах повреждения мозговой ткани в остром периоде ишемического инсульта является актуальной проблемой [4].

Одним из немногочисленных методов лабораторного исследования, позволяющих выявить и оценить уровень активности сво-

боднорадикальных процессов, является хемилюминесценция [1].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение резерва реактивности нейтрофилов у больных ишемическим инсультом по кинетике люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ).

**Материалы и методы.** Обследовано 27 пациентов с полушарным ишемическим инсультом и 20 человек контрольной группы сопоставимого возраста и пола. Диагноз ишемического инсульта подтверждался данными неврологического обследования и методов нейровизуализации. Тяжесть состояния больных инсультом оценивалась с помощью шкалы NIHSS. Больные обследовались в динамике: на 1, 3, 7 и 14 сутки.

При проведении исследования регистрировали ЛХЛ гепаринизированной крови по показателям спонтанной светосуммы (ССС) на хемилюминомере ХЛМ-003, выраженную в условных единицах (у.е.) [2]. Измерение проводили дважды: непосредственно после забора крови и через 4 часа. Затем рассчитывали разность светосумм (РСС) как разность результатов измерения через 4 часа инкубации

крови и результатов, полученных сразу после взятия крови:

РСС = ССС (через 4 ч) – ССС (непосредственно после взятия крови) [3].

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6 (StatSoft, USA) с использованием непараметрического критерия Вольд-Вольфовича. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Результаты проведенных исследований представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me [25%; 75%]).

**Результаты и обсуждение.** Обследованные пациенты были разделены на 2 группы. Первую группу составили пациенты с легким течением заболевания ( $n=18$ ), пациенты с инсультом средней и тяжелой степени тяжести вошли во 2 группу ( $n=9$ ).

В контрольной группе спонтанная хемилюминесценция составила 2,61 у.е. [1,48; 5,33], а значение РСС были равны 2,34 у.е. [0,17; 6,16].

Анализ результатов спонтанной хемилюминесценции выявил статистически значимые различия при сравнительной оценке показателей 1 и 2 групп на 1 и 14 сутки заболевания. Значения спонтанной хемилюминесценции в 1 сутки заболевания в группе с легким течением инсульта составили 3,81 у.е. [1,89; 4,83], во второй группе эти значения составили 18,36 [17,34; 28,75]. Значительное повышение величины спонтанной хемилюминесценции при тяжелом инсульте вероятно связано с большим очагом ишемии, темпом развития заболевания, наличием коморбидных состояний, отягощающих течение заболевания. Эти процессы находятся в сложных сопряженных отношениях с механизмами местного и системного воспалительного ответа и свободно-радикальных процессов.

Для выявления функционального резерва реактивности нейтрофилов мы провели исследования ЛХЛ при экспозиции крови *in vitro*, что позволило оценить оксидантный потенциал нейтрофилов, исключая воздействие экзогенных биологически активных субстанций. Так, значения РСС в группе пациентов с легким течением ишемического инсульта в первые сутки заболевания составили 4,59 у.е. [2,89; 5,43], в группе же больных с тяжелым течением инсульта эти значения соста-

вили -7,12 у.е. [-14,7; -7,0]. Отрицательные значения РСС, на наш взгляд, обусловлены повышенными значениями спонтанной ЛХЛ и снижением резерва активации нейтрофилов, что, очевидно, отражает структурно-функциональные изменения мозговой ткани и степень чрезмерной активации нейтрофилов, с последующим развитием вторичных повреждений в зоне ишемии.

При сравнении результатов исследования спонтанной хемилюминесценции на 14 сутки заболевания выявлены статистически значимые различия между сравниваемыми группами. Так, значения спонтанной хемилюминесценции у больных с легким течением заболевания достоверно повышались и составили 7,27 у.е. [5,6; 9,4]. В группе же пациентов с тяжелым инсультом эти значения достигали 19,33 [18,21; 20,46], отражая сохраняющееся напряжение механизмов свободно-радикального окисления.

Показатели РСС составили -0,5 у.е. [-2,89; 1,03] и -5,4 у.е. [-18,8; 7,94] соответственно. Как следует из полученных данных, у пациентов с тяжелым течением заболевания был снижен резерв оксидантного потенциала нейтрофилов, однако сравнение средних ранговых значений РСС оказалось статистически не достоверно.

Таким образом, изучение оксидантного потенциала нейтрофилов с использованием люминолзависимой хемилюминесценции способно отражать тяжесть ишемического повреждения мозга и свидетельствовать о функциональном состоянии нейтрофилов, в частности, их оксидантном потенциале.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. Успехи биологической химии 2009, 49, 341-388.
2. Друх В. В., Фархутдинов Р. Р., Загидуллин Ш. З. Метод изучения хемилюминесценции лейкоцитов в цельной крови. Клиническая лабораторная диагностика 2004, 12, 41-43.
3. Дружинина Т. А., Левашова О. А. Патент на изобретение «Способ определения резерва реактивности нейтрофилов (оксидантного потенциала)» 2011. № 2457488.
4. Schofield Z. V., Woodruff T. M., Halai R., Wu M. C., Cooper M. A. Neutrophils-a key component of ischemia-reperfusion injury. Shock 2013, 40 (6), 463-470.

## ASSESSMENT OF NEUTROPHILS' FUNCTIONAL ACTIVITY BY INDICES OF LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE IN THE ACUTE PERIOD

Levashova O. A., Zolkornyaev I. G., Aleshina N. I.

*Postgraduate medical institute, Penza*

Abstract. Neutrophils' functional activity has been investigated by indices of luminal-dependent chemiluminescence in patients with ischemic stroke in the acute period in dynamics. Increase of spontaneous luminal-dependent chemiluminescence and decrease of neutrophils activation reserve has been detected in patients with severe ischemic stroke. The examination of neutrophils' functional activity in patients with ischemic stroke is able to reflect the severity of ischemic brain damage and to disclose pathophysiological mechanisms of the disease.

*Keywords: luminol-dependent chemiluminescence, neutrophils, ischemic stroke.*

---

## РЕАКЦИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ОРГАНОВ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ВНЕДРЕНИЕ ПОРИСТЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ В КОСТНУЮ ТКАНЬ

Макарова Э. Б.<sup>1</sup>, Захаров Ю. М.<sup>2</sup>, Блинкова Н. Б.<sup>3</sup>, Киселева Н. С.<sup>1</sup>,  
Рубштейн А. П.<sup>4</sup>, Кобылкин К. С.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Уральский НИИТО им. В. Д. Чаплина» МЗ РФ; <sup>2</sup>Южно-Уральский гос. медицинский университет МЗ РФ; <sup>3</sup>Уральская Государственная Медицинская Академия; <sup>4</sup>Институт физики металлов УрО РАН; <sup>5</sup>Институт математики и механики им. Красовского УрО РАН, Россия

Выполнена оценка регионарных лимфоузлов и селезенки после внедрения в костный дефект кроликов пористых титановых имплантатов, насыщенных аутогенными миелокариоцитами. Выявлены изменения преимущественно в В-зависимых зонах через 4 недели после операции, нарастание изменений в Т-зонах через 52 недели, активация макрофагов в течение всего периода наблюдения.

*Ключевые слова:* пористые титановые имплантаты, лимфатический узел, селезенка, морфология.

Титан и его сплавы активно используются в травматологии и ортопедии, поскольку они биосовместимы и имеют приемлемые для замещения костного дефекта физико-химические свойства. Однако биомеханическое несоответствие костной ткани и металла со временем приводит к развитию вокруг монолитных имплантатов стрессорного ремоделирования костной ткани. Применение пористых металлов уменьшает данное несоответствие, увеличивает прочность фиксации имплантата в костной ткани, но также и площадь контакта металлической поверхности

с клетками костной и кроветворной тканей, что может влиять на выраженность ответной реакции иммунной системы. Показана [1] лучшая интеграция пористых титановых имплантатов (ПТi) в костный дефект после предварительного насыщения их аутомиелокариоцитами. Цель работы – оценить морфологические изменения периферических органов лимфатической системы при внедрении в костную ткань ПТi, предварительно насыщенных аутологичными миелокариоцитами.

**Материалы и методы.** Эксперимент выполнен на 21-м половозрелом кролике стадного

разведения обоего пола. Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с требования ГОСТ Р ИСО 10993.2–99 от 01.07.2010. Кроликам внедряли в большеберцовые и бедренные кости ПТi, насыщенные аутологичными миелокариоцитами в соответствии с ранее описанными методиками [1]. Через 4, 16, 52 недели после операции оценивали изменения морфологии подколенных лимфатических узлов и селезенки. Контролем являлись подколенные лимфоузлы и селезенки 3-х интактных кроликов. Гистологические препараты лимфоузлов и селезенки окрашивали гематоксилином-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону. В функциональных зонах лимфоузлов осуществляли дифференцированный подсчет клеточных элементов. Результаты описывали, используя медианы (Me) и квартили ( $Q_{25}$ ;  $Q_{75}$ ), для выявления различий между двумя независимыми группами количественных признаков – критерий Манна-Уитни. Статистическую гипотезу считали подтвержденной при уровне значимости  $p \leq 0,05$  [2].

**Результаты и их обсуждение.** Через 4 недели после внедрения в костную ткань ПТi в подколенных лимфатических узлах кроликов по сравнению с контролем выявлено утолщение капсулы, расширение подкапсульных синусов с увеличением количества клеточных элементов, что указывает на активацию барьерно-фильтрационной функции лимфатических узлов; расширение коркового вещества за счет фолликулярной гиперплазии; увеличение площади коркового плато. В лимфатических фолликулах четко определялись расширенные светлые центры, мантийные и краевые зоны. В корковом плато – снижение относительного количества зрелых лимфоидных клеток (97,3%;  $p \leq 0,019$ ), обусловленное пролиферацией бласттрансформированных лимфоцитов; количество макрофагов и эозинофилов было существенно увеличено, что свидетельствует о формировании гуморального иммунного ответа. Антигенами могут выступать продукты распада тканей, образовавшиеся в результате оперативного вмешательства, нарушения кровоснабжения в оперированном сегменте [3]. Паракортикальная зона лимфоузла (Т-зона) сегментарно или диффузно расширена с эозинофильной инфильтрацией (у 3-х кроликов из 4-х), сниженным количеством зрелых лимфоидных элементов (97,8%,  $p \leq 0,009$ ), что, вероятно,

обусловлено как пролиферацией лимфоцитов, так и быстрой миграцией сенсibilизированных лимфоцитов в кровь, где они помимо иммунных функций могут осуществлять регуляцию регенераторных процессов костной ткани [4] посредством синтеза регуляторных цитокинов. В мозговом веществе лимфоузла – отек синусов и мягкотных тяжей, венозное полнокровие, увеличение количества центробластов (211,1%,  $p \leq 0,009$ ) и centroцитов (200,0%,  $p \leq 0,009$ ). К этому же сроку в селезенке подопытных кроликов выявлены признаки нарушения кровообращения (полнокровие венозных синусов красной пульпы, трабекулярных вен) и гиперсидероз. У 2-х кроликов из 4-х соотношение площадей красной и белой пульпы – 80:20, что характерно для интактной селезенки. У 2-х белая пульпа расширена за счет увеличения количества лимфоидных элементов (70:30, 60:40). В белой пульпе периартериальные лимфатические муфты (Т-зоны) слабо выражены, вторичные фолликулы выражены умеренно или значительно, их светлые центры (В-зоны) значительно расширены с четкой границей между светлым центром и мантийной зоной, что указывает на стимуляцию иммунного ответа по гуморальному типу.

Через 16 недель после операции в подколенных лимфатических узлах подопытных кроликов отмечалась положительная динамика по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. В серозной оболочке селезенки через 16 недель после операции наблюдали очаговую десквамацию мезотелия, фиброзная оболочка истончена, что указывает на увеличение объема органа. Кровенаполнение венозных синусов и трабекулярных вен нормальное, импрегнация красной пульпы железом отсутствует. В синусах большое количество клеток: малых, средних лимфоцитов, гистиоцитов. Соотношение красной и белой пульпы – 60:40 (у 2-х кроликов), у 1-го – 70:30. Периартериальные лимфатические муфты и вторичные фолликулы белой пульпы со светлыми центрами значительно расширены, границы между светлыми центрами и мантийными зонами фолликулов четкие. Выраженность Т-клеточной реакции преобладала над В-клеточной. Таким образом, выявлены признаки развития клеточного и гуморального иммунного ответа, гистиоцитарной реакции в синусах красной пульпы.

Через 52 недели после операции изменения в Т-зависимых зонах и синусах лимфатических узлов нарастают по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Паракортикальная зона диффузно расширена, увеличено относительное количество центробластов и centroцитов (200%,  $p \leq 0,022$ , 133,3%,  $p \leq 0,035$ ), в синусах – значительное количество гистиоцитов. В селезенке к этому же сроку серозная оболочка выстлана мезотелием, фиброзная оболочка не изменена, кровенаполнение венозных синусов и трабекулярных вен нормальное. В синусах красной пульпы – небольшое количество лимфоцитов и гистиоцитов, её соотношение с белой пульпой – 80:20 у 2-х животных, 60:40 – у 1-го. Периартериальные лимфатические муфты и вторичные фолликулы белой пульпы селезенки со светлыми центрами расширены, то есть сохраняется активность клеточного и гуморального иммунного ответа. Моноциты, контактирующие с поверхностью титана, секретируют хемокины, цитокины, факторы роста [5] и, мигрируя в лимфоузлы из периферической крови, оттекающей от сегмента конечности с внедрённым ПТi, могут инициировать реактивную лимфоидную гиперплазию и гистиоцитарную реакцию. Хроническую воспалительную реакцию могут вызывать и диффундирующие в прилежащие ткани ионы титана, образующиеся при механической нагрузке на ПТi или/и формирующиеся при ремоделировании костной ткани вокруг имплантата ау-

тоантигены или/и конформационно измененные белковые молекулы, накапливающиеся в районе их контакта с ПТi [6].

К 4 неделе после внедрения в костную ткань ПТi в регионарных лимфатических узлах и в селезенке выявлена повышенная реактивность Т- и В-зависимых зон с преобладанием последних. К 16-52 неделям после операции в селезенке и лимфоузлах нарастает реактивность Т-зависимых зон и активация системы фагоцитирующих мононуклеаров (с развитием синусового гистиоцитоза).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рубштейн А. П., Макарова Э. Б., Трахтенберг И. Ш., Захаров Ю. М. Биоимплантаты на основе пористого титана с алмазоподобными пленками для замещения костной ткани. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2012, 137 с.
2. Гржибовский А. М. Анализ количественных данных для двух независимых групп. Экология человека. 2008. № 2. С.54-61.
3. Бородин Ю. И., Григорьев В. Н., Лятегин А. Ю. и др. Функциональная морфология иммунной системы. Новосибирск: Наука, 1987. 238 с.
4. Lorenzo J., Horowitz M., Choi Y. Osteoimmunology: Interactions of the Bone and Immune System. *Endocr. Rev.* 2008 29, P.403-440.
5. Low Q. E., Drugea I. A., Duffner L. A. et al. Wound healing in MIP-1 alpha and MCP-1 mice. *Am J. Pathol.* 2001, 159 (2), P.457-463.
6. Bakir M. Haemocompatibility of titanium and its alloys. *J. Biomaterials Applications* 2012. 27 (1), P.3-15.

#### REACTION OF PERIPHERAL BODIES OF LYMPHATIC SYSTEM TO INTRODUCTION OF POROUS TITANIC IMPLANTS IN BONE FABRIC

Makarova E. B.<sup>1</sup>, Zakharov Yu. M.<sup>2</sup>, Blinkova N. B.<sup>3</sup>, Kiselyovs N.S.<sup>4</sup>, Rubstein A. P.<sup>4</sup>, Kobylkin K. S.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>FGBU "The Ural NIITO of V.D. Chaklin" MZ Russian Federation; <sup>2</sup>MZ Russian Federation Yuzhno-Uralsky gos. meditsinsky university; <sup>3</sup>The Ural State Medical Academy; <sup>4</sup>Institute physics of OURO metals of the Russian Academy of Sciences; <sup>5</sup>Institute mathematics and mechanics of Krasovsky Ouro of the Russian Academy of Sciences

Evaluation of regional lymph nodes and spleen after the introduction of porous titanium implants saturated with autologous myelokaryocytes into the bone defect of rabbits was performed. There were revealed the changes in the B-dependent areas in four weeks after the surgery, augmenting changes in the T-zones after 52 weeks, activation of macrophages throughout the observation period.

*Keywords: porous titanic implants, lymph node, spleen, morphology.*

## ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ CD11b И CD95 НА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Маркова В. А., Савочкина А. Ю., Квятковская С. В., Никушкина К. В.,  
Курносенко И. В., Долгушин И. И.

*НИИ иммунологии государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия*

Изучена экспрессия рецепторов CD11b и CD95 на нейтрофильных гранулоцитах периферической крови у здоровых мужчин и женщин. В работе установлено, что распределение рецепторов не зависит от пола донора. На интактных нейтрофилах максимальное количество клеток экспрессируют рецептор CD11b. После активации увеличивается количество нейтрофилов экспрессирующих CD95.

*Ключевые слова:* нейтрофилы, рецептор CD11b, рецептор CD95.

**Введение.** Нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми клетками врожденной иммунной системы и выполняют основные функции – уничтожение патогенных микроорганизмов, таких как бактерии, грибы и паразиты, а так же предотвращение их распространения в организме [6]. Более века исследователи всего мира изучают строение и физиологию нейтрофильных гранулоцитов, биохимический состав их гранул, структуру синтезируемых ими метаболитов и роль этих клеток в регуляции иммунного ответа [2]. Нейтрофил оснащен богатым набором рецепторов, которые позволяют чутко и дифференцированно реагировать на малейшие изменения окружающей среды. Гетерогенность функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов, степень их зрелости определяются состоянием рецепторного аппарата. Специфическая мембранная рецепция отражает адгезивные, поглощательные, цитолитические, апоптотические способности нейтрофилов. Фагоцитарная и микробицидная активность нейтрофильных гранулоцитов находится в непосредственной зависимости от количества и плотности таких рецепторов, как CD11b, CD64, CD16, CD32, CD95 [1, 4].

Антиген CD95 входит в суперсемейство рецептора фактора роста нервов / фактора не-

кроза опухолей (NGFR / TNF) и содержит три повтора, богатых цистеином. CD95 антиген принадлежит к так называемому семейству рецепторов клеточной гибели и высоко экспрессируется на активированных лейкоцитах, уровень экспрессии на гранулоцитах и моноцитах может сильно варьироваться [5, 8].

CD11b является альфа-цепью интегрина CR3. CD11b экспрессируется на гранулоцитах, моноцитах, естественных киллерах, а также различных субпопуляциях лимфоцитах. Игрет роль в миграции макрофагов из кровяного русла в очаг воспаления в процессе иммунного ответа, является молекулой межклеточной адгезии. CD11b-рецептор, участвует в процессах распознавания фагоцитами объектов фагоцитоза [3, 7].

**Целью** работы являлось определение распределения рецепторов CD11b и CD95 на интактных и активированных нейтрофильных гранулоцитах периферической крови.

**Используемые методы.** Для достижения поставленной цели за период с 2012 по 2013 год на базе НИИ иммунологии ЮУГМУ было проведено обследование 30 практически здоровых мужчин и 30 практически здоровых небеременных женщин в первую и вторую фазы менструального цикла, чей возраст варьировался от 18 до 35 года.

Материалом для исследования являлись периферическая венозная кровь. Определение популяционного состава нейтрофилов проводили методом проточной цитофлуориметрии. Тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с дискретными антигенными детерминантами, экспрессированными на поверхности нейтрофилов. Непосредственно для окрашивания были использованы одноцветные реагенты: CD11b-FITC и CD95-PE (BeckamCoulter, США). Окрашивание моноклональными антителами проводили в цельной крови. С этой целью по 100 мкл крови помещали в пробирку размером 12x75 мм и добавляли в нее по 10 мкл антител CD11b-FITC и CD95-PE. Для учета изменения рецепторного аппарата нейтрофила после активации 100 мкл крови смешивали с 5 мкл раствора фарбол-миристанг-ацетатом (1,5мМ) и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Затем в пробирку добавляли по 10 мкл антител CD11b-FITC и CD95-PE. Пробирки инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 25 минут. По окончании инкубации проводили лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов. Готовый образец анализировали на лазерном проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (BeckamCoulter, США), с использованием гомогенного гейтирования по показателям светорассеяния.

Полученные результаты исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием пакета прикладных компьютерных программ Statistica for Windows (v. 8.0). Полученные данные обработали общепринятыми методами вариационной статистики и представили в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ( $M \pm m$ ),

$n$  – количество наблюдений в выборке. О достоверности межгрупповых различий судили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Проверка статистических гипотез осуществляли при критическом уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

**Основные результаты.** Использование для детекции сигнала двух каналов проточного цитофлуориметра позволило разделить все нейтрофильные гранулоциты на четыре популяции: нейтрофилы, экспрессирующие на своей поверхности оба рецептора CD11b и CD95 (CD11b<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>); нейтрофилы, экспрессирующие на своей поверхности только рецептор CD11b (CD11b<sup>+</sup>CD95<sup>-</sup>); нейтрофилы, экспрессирующие на своей поверхности только рецептор CD95 (CD11b<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>); нейтрофилы, неэкспрессирующие на своей поверхности ни рецептора CD11b, ни рецептора CD95 (CD11b<sup>-</sup>CD95<sup>-</sup>).

Данные по распределению всех четырех популяций представлены в таблице 1.

Исследование показало, что экспрессия рецепторов на нейтрофильных гранулоцитах не зависит от пола обследуемых лиц и от фазы менструального цикла у женщин.

При изучении распределения рецепторов CD11b и CD95 на интактных нейтрофильных гранулоцитах было установлено, что максимальное количество клеток 83% на своей поверхности имели рецептор CD11b и не несли рецептор CD95. Менее 10% приходилось на нейтрофилы, не имеющие на своей поверхности ни рецептора CD11b, ни рецептора CD95. Близок к этому процент нейтрофилов, экспрессирующих на своей поверхности оба рецептора. При этом следует отметить, что неактивированные нейтрофильные гранулоци-

Таблица 1. – Распределение рецепторов CD11b и CD95 на интактных и активированных нейтрофильных гранулоцитах периферической крови здоровых доноров, % ( $M \pm m$ )

Группа	Активатор	CD11b <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup>	CD11b <sup>+</sup> CD95 <sup>-</sup>	CD11b <sup>-</sup> CD95 <sup>+</sup>	CD11b <sup>-</sup> CD95 <sup>-</sup>
Женщины первая фаза м.ц., n=30	Контроль	8,44±1,55	83,19±1,37	0,32±0,10	7,74±1,43
	ФМА	3,91±0,65*	73,13±2,73*	20,35±2,78*	2,72±0,53*
Женщины вторая фаза м.ц., n=30	Контроль	5,41±0,93	80,25±9,98	0,53±0,16	6,16±0,77
	ФМА	2,95±0,39*	70,45±2,27*	25,87±1,82*	2,63±0,38*
Мужчины n=30	Контроль	5,15±0,58	82,75±1,52	0,49±0,14	8,59±1,19
	ФМА	2,97±0,31*	72,91±1,62*	20,93±1,62*	3,56±0,44*

Примечание: \* – достоверность отличий при сравнении контроля с ФМА

ты, экспрессирующие только рецептор CD95, представлены в цельной крови в количестве не более 1%.

После воздействия на нейтрофильные гранулоциты ФМА изменялось процентное соотношение всех четырех популяций клеток. Происходило снижение количества клеток CD11b<sup>+</sup>CD95<sup>-</sup> до 73%. Также уменьшалось количество нейтрофилов CD11b<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> и клеток CD11b<sup>-</sup>CD95<sup>-</sup> до 4% и 3% соответственно. После активации ФМА наблюдалось достоверное увеличение количества нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих на своей поверхности лишь рецептор CD95 до 25%.

Таким образом, распределение рецепторов CD11b и CD95 на нейтрофильных гранулоцитах периферической крови не зависит ни от пола обследуемых лиц, ни от фазы менструального цикла у женщин. В ответ на активацию нейтрофильных гранулоцитов изменяется распределение на них поверхностных рецепторов: снижается экспрессия CD11b и увеличивается экспрессия CD95.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковальчук Л. В., Хорева М. В., Варивода А. С. Врожденные компоненты иммунитета: Toll-подобные рецепторы в норме и при иммунопатологии. Микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2005, 4. 96-104.
2. Тотолян А. А., Фрейдлин И. С. Клетки иммунной системы Москва: Наука, 2000. – 231 с.
3. Ding Z. M., Babensee J. E., Simon S. I. [et al.] Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. J. Immunol. 1999, 163, 5029-5038.
4. Hoffmann J. A. The immune response of Drosophila. Nature 2003, 426. 33-38.
5. Itoh N., Yonehara S., Ishii A. [et al.] The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 1991, 66. 233-243.
6. Papayannopoulos V., Staab D., Zychlinsky A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. PLoS One 2011. 6 (12). 125-131.
7. Springer T. A. Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990, 346. 425-434.
8. Van Parijs L., Abbas A. K. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. Curr Opin Immunol. 1996, 8. 355-361.

## EXPRESSION RECEPTORS CD11B AND CD95 ON NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD

**Markova V. A., Savochkina A. Y., Kvyatkovskaya S. V., Nikushkina K. V., Kurnosenko I. V., Dolgushin I. I.**

Studied the expression of receptors CD11b and CD95 on neutrophilic granulocytes in peripheral blood in healthy men and women. The work established that the distribution of receptors independent of the donor sex. At the intact neutrophils maximum number of cells, express the receptor CD11b. After activation increases the number of neutrophils expressing CD95.

## ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ ЭНДОТЕЛИЕМ И МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИЕЙ КРОВИ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ И СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Матвеева В. Г., Антонова Л. В., Головкин А. С.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН, Кемерово, Россия

Проведено сравнительное изучение секреторной активности изолированных клеток и сокультуры мононуклеаров периферической крови (МНФ) с эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVES) после предварительной стимуляции HUVES IL-1 $\beta$ , липополисахаридом (LPS) и лизатом ушка предсердия (HL). В ответ на стимуляцию IL-1 $\beta$  изолированный монослой HUVES увеличивал синтез IL-6, IL-8 и IL-10, тогда как HL и LPS не оказывали стимулирующего эффекта. Провоспалительная активность нестимулированной сокультуры была выше по сравнению с нестимулированными МНФ. В то же время совместное культивирование МНФ со стимулированным слоем HUVES приводило к снижению синтеза IL-6 и IL-10 по сравнению с нестимулированной сокультурой. Это свидетельствует о взаимном влиянии HUVES и МНФ, что приводит к изменению их цитокинпродуцирующих свойств.

*Ключевые слова:* цитокины, воспаление, эндотелий, мононуклеары.

**Введение.** Реализация воспалительной реакции невозможна без участия иммунокомпетентных клеток. Системой мононуклеарных фагоцитов и лимфоцитов осуществляется основной синтез цитокинов. Кроме того активными участниками воспалительной реакции в организме являются эндотелиальные клетки (ЭК) сосудов, функция которых изменяется под влиянием микробных факторов и медиаторов воспаления [1]. Индукторами воспалительной реакции могут выступать как инфекционные агенты и факторы воспаления, так и алармины [2].

Для реализации защитной воспалительной реакции организма, требуется оптимальное соотношение про- и противовоспалительных факторов. Поэтому наряду с провоспалительными цитокинами идет одновременный сбалансированный синтез противовоспалительных, в том числе IL-10. Активированные лимфоциты и моноциты продуцируют IL-10, так же показана возможность синтеза IL-10 покоящимися и активированными ЭК [3].

При всем многообразии данных о механизмах развития воспалительной реакции прак-

тически нет работ, направленных на изучение взаимодействия эндотелия и лейкоцитов в условиях воспалительной стимуляции.

**Цель.** Сравнительное изучение секреторной активности изолированных клеток и сокультуры мононуклеаров периферической крови (МНФ) с эндотелиальными клетками HUVES после предварительной стимуляции монослоя HUVES IL-1 $\beta$ , липополисахаридом (LPS) и лизатом ушка предсердия.

**Материалы и методы.**

**Выделение, культивирование и стимуляция HUVES.** HUVES выделяли согласно адаптированному протоколу Jaffe и культивировали с использованием наборов Endothelial Cell Cultur Medium Kit (BD Bioscience, США). В эксперименте использовали культуру HUVES 2-го пассажа, которую высевали в покрытые коллагеном 24-луночные планшеты и культивировали в полной эндотелиальной среде до формирования монослоя. В качестве стимуляторов использовали рекомбинантный IL-1 $\beta$  человека 10 нг/мл (Sigma, США), LPS 10 нг/мл (Sigma, США). Моделью продуктов механического повреждения миокарда в эксперименте

*in vitro* служила цитозольная фракция кардиомиоцитов (heart lysate (HL)). HL готовили в асептических условиях путем механического растирания биоптата ткани ушка левого предсердия с добавлением PBS и центрифугирования. Супернатант разводили культуральной средой до концентрации 4%, фильтровали через стерильный мембранный фильтр (поры 0,2 мкм), получая цитозольную фракцию поврежденных кардиомиоцитов человека или HL. Концентрация Hsp70 в маточном растворе HL составила 10,2 нг/мл, что в 100 раз выше, чем в сыворотке крови. 4% разведение HL – концентрация Hsp70 0,408 нг/мл.

**Совместное культивирование HUVEC и МНФ.** Через 24 часа стимуляции лунки с HUVEC отмывали PBS и в каждую лунку опытных и контрольных образцов вносили по  $6,2 \cdot 10^5$ , выделенных на градиенте плотности МНФ здорового донора. Для контроля секреторной активности нестимулированных МНФ моноклеары вносили в пустые лунки в той же концентрации.

Исследование содержания уровня цитокинов в культуральной среде. Через 24 часа инкубации из лунок забирали среду для последующего определения в ней цитокинов методом проточной цитофлуориметрии на аппарате FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием набора Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (BD, США), позволяющем в 50 мкл среды определять одновременно 6 различных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , IL-12). Пробоподготовку и настройку прибора проводили по протоколу фирмы производителя.

Работа одобрена локальным этическим комитетом организации. По вышеуказанной схеме в дублях выполнено 3 независимых эксперимента.

**Статистическая обработка результатов** в программе «Statistica 6.0». Достоверность различий определяли с помощью непараметрических критериев Фридмана, Вилкоксона с поправкой Бонферрони. Данные представлены медианой, 25 и 75 процентилями (Me (25%; 75%)). Уровень статистической значимости при  $p < 0,05$ .

**Результаты. IL-8.** Уровень IL-8 при стимуляции монослоя HUVEC IL-1 $\beta$  был в 1,8 раза выше, чем в нестимулированном (таблица). Разницы между концентрациями IL-8 в группах сравнения (нестимулированные МНФ и сокультура

МНФ с нестимулированным HUVEC) не выявлено, хотя имелась тенденция к увеличению его содержания в сокультуре. МНФ – функционально активные клетки, и их сокультивирование с монослоем ЭК привело, в среднем, к 11-кратному увеличению концентраций IL-8 по сравнению с изолированными ЭК.

**IL-6.** Содержание IL-6 в культуре нестимулированных ЭК был низок (таблица). Наиболее сильный ответ на стимуляцию зарегистрирован на IL-1 $\beta$  (содержание IL-6 в среде увеличилось в 1,7 раза). Сокультивирование МНФ как со стимулированными, так и с нестимулированными ЭК увеличило концентрацию IL-6 в 15-20 раз по сравнению с нестимулированными МНФ. В сокультуре вид используемого стимулятора не влиял на синтез IL-6. Тем не менее, его концентрации были в среднем в 1,5 раза ниже, чем в сокультуре без стимуляции.

**IL-1 $\beta$ .** В изолированном монослое ЭК не было достоверной разницы в синтезе IL-1 $\beta$  как на фоне стимуляции, так и без нее (таблица). При совместной инкубации МНФ с HUVEC резко возросло содержание IL-1 $\beta$  в среде культивирования. Однако в нестимулированной сокультуре концентрация IL-1 $\beta$  оказалась выше, чем после предварительной стимуляции HUVEC с HL, IL-1 $\beta$  и LPS.

**TNF- $\alpha$ .** Активированные и неактивированные ЭК секретировал минимальное количество TNF- $\alpha$  (таблица). Уровни TNF- $\alpha$  в нестимулированных МНФ и в нестимулированной сокультуре не отличались между собой. Если сравнивать выраженность активирующего воздействия используемых в экспериментах стимуляторов, то наиболее активный синтез TNF- $\alpha$  в сокультуре клеток вызывал HL.

**IL-10.** Нестимулированные HUVEC синтезировал следовые концентрации IL-10, в то время как стимуляция ЭК привела к увеличению его синтеза (таблица). Максимум подобных проявлений отмечен при инкубации HUVEC с IL-1 $\beta$ . В сокультуре после предварительной стимуляции ЭК HL и LPS концентрации IL-10 в среде были ниже, чем в нестимулированной сокультуре и изолированных МНФ.

**Обсуждение.** В организме идет постоянное взаимодействие различных видов клеток между собой, в процессе которого клетки оказывают влияние на свойства и функциональную активность друг друга. В эксперименте со стимуляцией изолированного монослоя ЭК происходило повышение синтеза IL-6, IL-8 и IL-10

по сравнению с нестимулированным эндотелием, тогда как совместное культивирование МНФ со стимулированными ЭК приводило к снижению синтеза этих цитокинов по сравнению с нестимулированной сокультурой. Кроме того предварительная стимуляция ЭК вызывала ослабление синтеза цитокинов.

Особенность воспалительной реакции и набор секретлируемых цитокинов зависит от вида стимула. Наиболее интенсивное увеличение секреторной активности ЭК оказывала стимуляция цитокином IL-1 $\beta$ , вызывающая максимальный ответный синтез IL-8 и IL-6. HL, являющийся моделью воздействия на эндотелий продуктов механического повреждения миокарда, содержащего алармины, проявлял меньший провоспалительный эффект, чем IL-1 $\beta$ . В культуре HUVEC, стимулированной LPS, синтез цитокинов был минимальным, что может быть связано с особенностями локализации TLR4. По данным литературы, TLR4 не обнаруживается на мембране ЭК, а локализуется во внутриклеточном компартменте, в частности, у HUVEC в аппарате Гольджи [4].

Антивоспалительные факторы способны подавлять и регулировать силу воспалительного каскада. Подтверждена значимость антивоспалительной активности активированных ЭК в выраженности формируемого воспалительного ответа [5]. Анализ уровня IL-10 в среде культивирования показал его повыше-

ние в культуре HUVEC при стимуляции IL-1 $\beta$  одновременно с увеличением концентрации провоспалительных цитокинов.

Выводы. Активированные, так и интактные ЭК влияют на функциональную активность МНФ. При этом сокультура с предварительно стимулированными ЭК вызывает более низкий синтез про- и противовоспалительных цитокинов по сравнению с интактным. Интенсивность и спектр секретлируемых ЭК и МНФ цитокинов зависит от вида стимула.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Старикова Э. А., Лебедева А. М., Бурова Л. А., Фрейдлин И. С. Изменение функциональной активности эндотелиальных клеток под влиянием лизата *Streptococcus Pyogenes*. Цитология 2012, 54 (1), 49-56.
2. Черешнев В. А., Гусев Е. Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления. Мед. иммунология 2012, 14 (1-2), 9-20.
3. Baker N., O'Meara S.J., Scannell M. et al. Lipoxin A4: Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Impact on Endothelial Cells. J. Immunol. 2009, 182, 3819-3826.
4. Mako V., Czusj J., Weiszhar Z. et al. Proinflammatory Activation Pattern of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by IL-1b, TNF- $\alpha$  and LPS. Cytometry A 2010, 77 (10), 962-970.
5. Kofler S., Nickel T., Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. Clin Sci (Lond) 2005, 108 (3), 205-213.

Таблица. Концентрации цитокинов (пг/мл) в среде культивирования моно- и сокультуры HUVEC и мононуклеарной фракции (МНФ) Me (25%; 75%)

Цитокин	HUVEC				МНФ	Сокультура HUVEC и МНФ				
	нестим.	стимуляторы				нестим.	нестим.	стимуляторы		
		IL-1 $\beta$	LPS	HL				IL-1 $\beta$	LPS	HL
IL-8	421,1 349,9-492,2	776,0 * 733,1-818,8	509,7 472-547,2	604,0 455,1-753	6422, 0 6052-6792,5	7305,2 7175-7435,4	6727,4 6374,3-7080,4	6785,3 6776,5-6794	6867,9 6729-7005,6	
IL-6	12,1 10,1-14,2	20,4 * 17,9-22,9	9,2 9,1-9,3	13,2 11,6-14,9	121,4 97,7-145,2	2593,9 #/o 2140,5-3047	1821,9 o 1492,1-2150	1731,3 o 1674,3-1788	1790,6 o 1571-2010,4	
IL-1 $\beta$	1,34 1,25-1,42	1,17 1,16-1,17	1,06 0,99-1,11	1,17 1,08-1,24	43,69 38,19-49,18	124,07 #/o 93,29-168,38	72,56 ** 66,19-78,92	42,86 34,82-66,99	76,97 ** 59,0-94,93	
TNF $\alpha$	0,13 0,12-0,14	0,22 0,12-0,32	0,14 0,07-0,21	0,13 0,07-0,19	1,85 1,71-1,99	1,48 1,41-1,54	1,17 0,86-1,47	1,33 1,18-1,48	1,67 ** 1,15-2,19	
IL-10	0,19 0,19-0,21	0,40 */** 0,34-0,45	0,22 0,15-0,29	0,25 0,22-0,29	21,63 20,11-23,14	18,72 17,14-20,29	18,54 18,33-18,75	16,56 &/o 14,36-18,75	15,77 &/o 15,68-15,86	

Примечания: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой HUVEC без стимуляции;

\*\* -  $p < 0,05$  внутри стимулированных сокультур;

o -  $p < 0,05$  по сравнению с группой МНФ без стимуляции;

# -  $p < 0,05$  по сравнению с группами стимулированных сокультур;

& -  $p < 0,05$  по сравнению с нестимулированной сокультурой.

## CHARACTERISTICS OF CYTOKINE SECRETION BY ENDOTHELIUM AND BLOOD MONONUCLEAR FRACTION IN ISOLATED AND JOINT CULTURE UNDER ENDOTHELIAL PRE-STIMULATION

Matveeva V. G., Antonova L. V., Golovkin A. S.

*FSBI "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Disease" SB RAMS, Kemerovo, Russia*

A comparative study of secretory activity of isolated cells and coculture from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with HUVEC after pre-stimulation of HUVEC with IL-1 $\beta$ , lipopolysaccharide (LPS) and atrial appendage lysate (AAL). Isolated HUVEC monolayer increased synthesis of IL-6, IL-8 and IL-10 in response to IL-1 $\beta$  stimulation. AAL and LPS don't have any stimulating effect. Proinflammatory activity of unstimulated coculture was higher compared to unstimulated PBMC. At the same time, PBMC cocultured with a stimulated HUVEC promoted a decrease in IL-6 and IL-10 synthesis compared to unstimulated coculture. It suggests a mutual influence of HUVEC and PBMC on each other, provoking changes in cytokine production properties.

*Keywords: cytokines, inflammation, endothelium, mononuclear cells.*

---

---

## ИЗМЕНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ СЛИЗИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН ПОД ВЛИЯНИЕМ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН И МУЖЧИН С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НИЖНЕГО ОТДЕЛА УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

Маякова В. Б., Савельева А. А., Курносенко И. В.

*ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России; кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, Россия, Челябинск*

В настоящее время хорошо изучены факторы местного иммунитета цервикальной слизи женщины, которые обеспечивают защиту женской репродуктивной системы и поддерживают благоприятную среду для успешного оплодотворения, имплантации и вынашивания беременности. В данном исследовании проведен сравнительный анализ влияния семенной жидкости, полученной от здоровых мужчин и мужчин с воспалительными заболеваниями нижнего отдела уrogenитального тракта, на нейтрофильные гранулоциты цервикального секрета здоровых женщин. Установлено, что сперма больных мужчин повышает кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов цервикальной слизи и активирует внеклеточный механизм защиты данных клеток путем образования нейтрофильных внеклеточных ловушек.

*Ключевые слова: Нейтрофилы, уrogenитальный тракт, функциональная активность.*

**Введение.** На сегодняшний день бесплодие остается важной медико-социальной проблемой современного общества, влияющей на демографическую ситуацию в целом, на здоровье, качество жизни, социальную и психологическую адаптацию. В последние годы по данным

ВОЗ причина бесплодия в браке остается невыясненной в 10–15%, частота бесплодных браков не имеет тенденции к снижению [1]. Инфекционный фактор указывается многими авторами как причина снижения мужской и женской фертильности [2,3].

У мужчин воспалительный процесс уrogenитального тракта приводит к нарушению его проходимости, а воспаление в придаточных железах вызывает изменение физико-химических свойств секрета, обуславливая снижение подвижности сперматозоидов [4]. Поражение сперматогенного эпителия микроорганизмами приводит к образованию патологических форм сперматозоидов с нарушенной подвижностью [5]. Патогены способны повреждать ДНК сперматозоидов, вызывая их апоптоз, а также индуцировать выработку провоспалительных цитокинов и антиспермальных антител [6]. От местной иммунорезистентности женской половой системы, состоятельности и эффективности факторов противoinфекционной защиты напрямую зависит, в каких условиях будет происходить процесс зачатия, имплантации и развития плода. Именно шейка матки является тем барьером, который препятствует проникновению микроорганизмов из влагалища в полость матки. Многими авторами описано состояние местной антимикробной защиты репродуктивного тракта здоровых женщин, а также отмечено изменение иммунологических показателей цервикальной слизи у пациенток с воспалительными заболеваниями репродуктивного тракта [7, 8, 9].

Остается неизученными жизнеспособность и функциональная активность нейтрофилов цервикальной слизи здоровых женщин под влиянием

семенной жидкости здоровых мужчин и мужчин с воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта (ВЗНОУТ). Так же ввиду открытия нового свойства главных «стражей порядка» на пути восходящей инфекции – нейтрофильных гранулоцитов, а именно их способности к образованию из собственного хроматина нейтрофильных внеклеточных ловушек [10], нам показалось особенно важным изучить, как меняется данный показатель цервикальной слизи при встрече со спермой здоровых мужчин и мужчин с ВЗНОУТ.

**Материалы и методы.** Для исследования использовалась цервикальная слизь здоровых женщин, которая помещалась в 1,0 мл раствора Хенкса, тщательно суспензировалась. По итогам микроскопического, бактериологического, серологического, молекулярно-биологического методов исследования обследованные мужчины были разделены на 2 группы: относительно здоровые мужчины и мужчины с ВЗНОУТ. Нам было интересно посмотреть, как меняется местный иммунный ответ нейтрофилов цервикальной слизи при их встрече с семенной жидкостью здоровых мужчин и мужчин с ВЗНОУТ. Для этого мы инкубировали цервикальную слизь и семенную жидкость в течение 30 мин при температуре 37°C в соотношении 1:1. В контрольную группу вошли 22 здоровых женщины и 22 здоровых мужчины. В опытную группу 19 здоровых женщин и 19 мужчин с ВЗНОУТ. По-

**Таблица 1.** Сравнительный анализ иммунологических показателей нейтрофилов цервикального секрета при взаимодействии со спермой здоровых мужчин и мужчин с воспалительными заболеваниями нижнего отдела уrogenитального тракта, (M ± m)

Показатели	Группы	
	Контроль n = 22	Опыт n = 19
Живые, %	32,80 ± 4,51	28,67 ± 4,56
Мертвые, %	34,15 ± 3,80	30,00 ± 3,37
Апоптоз, %	25,70 ± 3,04	24,17 ± 2,92
Ловушки, %	6,25 ± 1,29	16,25 ± 3,89*
Лизосомальная активность нейтрофилов, у.е.	89,80 ± 17,94	123,30 ± 32,98
Спонтанный НСТ-тест нейтрофилов, %	14,62 ± 3,05	33,00 ± 7,86*
Спонтанный НСТ-тест нейтрофилов, у.е.	0,17 ± 0,04	0,36 ± 0,09*
Индукцированный НСТ-тест нейтрофилов, %	15,95 ± 3,29	31,91 ± 7,15*
Индукцированный НСТ-тест нейтрофилов, у.е.	0,18 ± 0,04	0,34 ± 0,08
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов	0,35 ± 0,04	0,42 ± 0,10
Активность фагоцитоза нейтрофилов, %	23,00 ± 2,58	27,27 ± 5,18
Фагоцитарное число	1,42 ± 0,10	1,43 ± 0,10

Примечание: \* - Достоверные отличия показателей опытной группы от группы контроля, P ≤ 0.05.

сле инкубации оценивали их жизнеспособность и функциональная активность (кислородзависимый метаболизм на модели спонтанного и индуцированного НСТ-восстановления, способность к поглощению частиц латекса, лизосомальная активность), а также определяли нейтрофильные внеклеточные ловушки цервикального секрета. Результаты представлены в таблице 1.

**Результаты и обсуждение.** При оценке функциональной активности нейтрофилов цервикального секрета здоровых женщин при взаимодействии со спермой здоровых мужчин и мужчин с ВЗНОУГ установлено, что сперма мужчин с ВЗНОУГ приводит к повышению спонтанного и индуцированного НСТ-теста нейтрофилов цервикального секрета, а также к увеличению количества нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Таким образом, наибольшая функциональная активность нейтрофилов цервикальной слизи наблюдается при взаимодействии со спермой мужчин с ВЗНОУГ.

**Выводы.** Семенная жидкость мужчин с ВЗНОУГ повышает кислородзависимый метаболизм нейтрофилов цервикальной слизи и приводит к увеличению образования нейтрофильных внеклеточных ловушек.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгов В. В., Луговская С. А., Миронова И. И. и др. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. М.; Тверь: Триада, 2006. 146 с.
2. Корнеева И. В., Лопатина Т. В. Общая концепция диагностики и классификации форм бесплодия. В руководстве для врачей.: Бесплодный брак. Под ред. В. И. Кулакова. М: ГЭОТАР Медиа, 2006. – с. 19-50
3. Кулаков В. И., Лопатина Т. В. Репродуктивное здоровье населения России.. В руководстве для врачей: Бесплодный брак. Под ред. В. И. Кулакова. М: ГЭОТАР Медиа, 2006. – с. 10-18.
4. Gdoura R., Kchaou W., Chaary C. et al. Ureaplasma urealiticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium and semen quality of infertile men// BMC Infections Diseases, 2007, 7, 129.
5. Wan C. C., Wang H., Yao B. J. et al. Infection of Chlamidia trachomatis and apoptosis of spermatogenic cells// Zhonghua Nan Ke Xue, 2003, 9 (5), 350-351, 354.
6. Rybar R., Prinosilova P., Kopecka V., et al., The effect of bacterial contamination of semen on sperm chromatin integrity and standart semen parameters in men from infertile couples// Andrologia, 2012, 44 (1), 410-418
7. Долгушина, В. Ф. Диагностика, лечение воспалительных заболеваний нижнего отдела половых органов, прогнозирование и профилактика их осложнений у беременных (клинико-иммунологическое исследование): Дис. ... д-ра мед. наук / В. Ф. Долгушина. – Харьков, 1991. – 439 с.
8. Телешева, Л. Ф. Иммунологические факторы секретов репродуктивного тракта женщины: дис. ... д-ра мед. наук / Л. Ф. Телешева. – Челябинск, 2000. – 324 с.
9. Савочкина, А. Ю. Иммунологические показатели в диагностике хронического цервицита и при его сочетании с хроническим эндометритом: дис. ... канд. мед. наук / А. Ю. Савочкина. – Челябинск, 2006. – 142 с.
10. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann et al. // Science. – 2004, 303, 1532-1535.
11. Долгушин, И. И. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова, А. Ю. Савочкина. – Москва: РАМН, 2009. – 203 с.

### CHANGING OF VIABILITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEALTHY WOMEN'S CERVICAL MUCUS NEUTROPHILS UNDER THE INFLUENCE OF SEMINAL FLUID OF HEALTHY MEN AND THOSE WITH INFLAMMATORY DISEASES OF THE LOWER UROGENITAL TRACT

Mayakova V. B., Savelyeva A. A., Kurnosenko I. V.

*GBOU VPO YUUGM of Ministry of Health of Russia; chair of microbiology, virology, immunology and clinical laboratory diagnostics; Chelyabinsk, Russia*

The factors of local immunity of the cervical mucus of women which protect the female reproductive system and maintain comfortable environment for successful fertilization, implantation and gestation of pregnancy are already well understood. Our study shows the comparative analysis of the influence of seminal fluid of healthy men and those with inflammatory diseases of the lower genital tract to the local immune response of the cervical mucus of healthy women. It is found that the sperm of male patients with inflammatory process elevates neutrophil oxygen-dependent metabolism of cervical mucus and activates extracellular mechanism to protect these cells by the formation of neutrophil extracellular traps

## ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА (ЖКТ) В УСЛОВИЯХ АРКТИКИ

Морозова О. С., Филиппова О. Е., Сергеева Т. Б.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН, Архангельск, Россия*

Проведена экспедиция в пос. Пинега Архангельской области (март 2011 г.), обследовано 30 женщин 34-71 года, страдающих заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). В периферической крови определяли: фенотипы лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CDHLADR<sup>+</sup>. У женщин с заболеваниями желудочно-кишечного тракта выявлено повышенное среднее содержание цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) у 62,06±2,61% лиц; повышенные уровни натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>) выявлены в 30,43±1,82% случаев в группе больных. Отмечены пониженные концентрации активированных Т-клеток с рецепторами к трансферрину (CD71<sup>+</sup>), низкие значения характерны для 61,53±2,60% обследованных.

*Ключевые слова:* заболевания желудочно-кишечного тракта, фенотипы лимфоцитов, Арктика.

**Введение.** Экстремальные климатоэкологические условия Севера препятствуют разворачиванию процессов саморегуляции, возвращающих системы к оптимальному режиму функционирования, что приводит к активации и напряжению клеточного и гуморального звеньев иммунитета и, в конечном счете – к сокращению резервных возможностей организма [6,7]. Специфические черты иммунных реакций приспособления на действие климатических факторов холодной географической зоны Севера обусловлены значительным дефицитом тепла и УФ-излучения. Процесс оптимизации функций в жестких дискомфортных условиях Севера сопровождается формированием компенсаторных реакций, свидетельствующих о напряжении как энергетических, так и пластических процессов, оканчивающихся в ряде случаев развитием декомпенсации. С последней во многом связаны более высокая заболеваемость северян, своеобразие клиники, тенденции к хронизации ряда патологических форм и сокращение продолжительности жизни [1, 3, 4, 5, 7, 8].

Заболеваемость населения г. Архангельска практически всеми нозологическими формами превышает средние показатели по Архангельской области в 2 раза, а по Российской

Федерации – в 2,5 раза, что в свою очередь не могло не отразиться на иммунологической реактивности организма человека на Европейском Севере [7].

Поселок Пинега расположен в экстремально дискомфортной зоне Архангельской области, между 63°08' и 65°18' северной широты и между 41°47' и 47°16' восточной долготы, с характерным субарктическим климатом [1].

За последнее столетие частота заболеваний желудочно-кишечного тракта возросла в 100 раз. Проблема заболеваемости желудочно-кишечного тракта является актуальной в связи с тем, что чаще болеют лица наиболее трудоспособного и активного возраста. Российскими и зарубежными учеными установлена зависимость возникновения заболеваний от конкретных экзогенных и эндогенных факторов. Большое значение придается таким факторам риска, как наличие стрессов, особенности питания, хронические заболевания [2].

Представляло интерес определение содержания концентрации фенотипов лимфоцитов в периферической крови людей с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, в условиях Арктики.

**Цель работы:** определить особенности иммунного статуса у женщин с заболеваниями

желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в возрасте 34-71 года, в условиях Арктики.

**Материалы и методы.** Проведена экспедиция в пос. Пинега Архангельской области (март 2011 г.), обследовано 30 женщин 34-71 года, страдающих заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

В периферической крови определяли: содержание фенотипов лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CDHLADR<sup>+</sup>. Содержание фенотипов лимфоцитов определяли методом двойной иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител (НПЦ «МедБиоСпектр», Россия). Использован пакет прикладных программ математической статистики «Statistica 6.0».

**Основные результаты.** Концентрации Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) у обследованных больных в среднем составляют  $0,49 \pm 0,03 \times 10^9$  кл/л., пониженные уровни которых регистрируются у 33,33 ± 1,91% обследованных лиц. Повышенные концентрации натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>) выявлены в 30,43 ± 1,82% случаев в группе больных, среднее содержание зафиксировано выше границы общепринятых физиологических норм и составляет  $0,54 \pm 0,05 \times 10^9$  кл/л.

Регистрируются повышенные средние концентрации цитотоксических Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup>, которые в среднем составляют  $0,46 \pm 0,03 \times 10^9$  кл/л. Повышенные концентрации CD8<sup>+</sup> отмечены у 62,06 ± 2,61% обследованных лиц.

Отмечены положительные корреляционные взаимосвязи между CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> ( $r=0,72$ ;  $p<0,05$ ), CD8<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> ( $r=0,57$ ;  $p<0,05$ ).

Отмечено пониженное содержание активированных Т-клеток с рецепторами к трансферрину (CD71<sup>+</sup>), которое составило в среднем  $0,48 \pm 0,04 \times 10^9$  кл/л., пониженные значения характерны для 61,53 ± 2,60% обследованных больных. Содержание Т-лимфоцитов, с рецепторами к антигенам главного комплекса гистосовместимости класса II (CDHLADR<sup>+</sup>) составило  $0,44 \pm 0,04 \times 10^9$  кл/л., при этом у 27,58 ± 1,74% лиц показатели зафиксированы ниже общепринятой границы нормы.

Выявлена статистически достоверная прямая зависимость между содержанием CD71<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> ( $r=0,72$ ;  $p<0,05$ ), CD16<sup>+</sup> и CDHLADR<sup>+</sup> ( $r=0,58$ ;  $p<0,05$ ), CD71<sup>+</sup> и CDHLADR<sup>+</sup> ( $r=0,76$ ;  $p<0,05$ ).

В данном исследовании пролиферативная активность CD10<sup>+</sup> в среднем равна  $0,46 \pm$

$0,04 \times 10^9$  кл/л., при этом у  $24,13 \pm 1,62\%$  больных отмечены средние повышенные значения выше общепринятых границ.

В результате анализа отмечена прямая сильная зависимость между концентрацией CD10<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> ( $r=0,62$ ;  $p<0,05$ ); CD10<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> ( $r=0,77$ ;  $p<0,05$ ).

Интересные взаимосвязи выявлены между содержанием CD71<sup>+</sup> и CD10<sup>+</sup> ( $r=0,72$ ;  $p<0,05$ ); CDHLADR<sup>+</sup> и CD10<sup>+</sup> ( $r=0,63$ ;  $p<0,05$ ).

Работа выполнена при поддержке грантов: Проект фундаментальных исследований «Арктика 2012–2014» УрО РАН № 12–4–5–025–АРКТИКА.

**Выводы:** Особенности иммунного статуса у женщин с заболеваниями желудочно-кишечного тракта в возрасте 34-71 года, в условиях Арктики являются повышенное среднее содержание цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) у 62,06 ± 2,61% лиц; повышенные уровни натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>) выявлены в 30,43 ± 1,82% случаев. Отмечены пониженные концентрации активированных Т-клеток с рецепторами к трансферрину (CD71<sup>+</sup>), низкие значения характерны для 61,53 ± 2,60% обследованных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добродеева Л. К. Иммунологическая реактивность, состояние здоровья населения Архангельской области/ Л. К. Добродеева, Л. П. Жилина. – Екатеринбург: УрОРАН, 2004. – 230с.
2. Горбачев М. В. Медико-социальная оценка факторов риска язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки в условиях Крайнего Севера Западной Сибири: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 2002. – 17с.
3. Иммунологическая реактивность человека на севере: Сб. науч. тр. / Под ред. Л. К. Добродеевой. – Архангельск, 1993. – 128с.
4. Кандрор И. С. Очерки по физиологии и гигиене человека на Крайнем Севере/ И. С. Кандрор. – М.: Медицина, 1968. – 280с.
5. Пастухов В. В. Иммунореактивность жителей Западной Сибири / В. В. Пастухов, Т. Ф. Соколова, Ю. В. Редькин, Д. Н. Тарасевич. – Омск: Изд-во мед. Ин-та, 1992. – 90с.
6. Хаитов Р. М. Физиология иммунной системы/ Р. М. Хаитов. – М., 2001. – 223с.
7. Щеголева Л. С. Резервные возможности иммунного гомеостаза у человека на Севере/ Л. С. Щеголева. – Екатеринбург: УрОРАН, 2007. – 207с.
8. Щеголева Л. С. Формирование иммунологической недостаточности человека на Севере: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Архангельск, 1996. – 14с.

## IMMUNOLOGICAL REACTIVITY IN WOMEN WITH CHRONIC PATHOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT (GIT) IN ARCTIC CONDITIONS

Morozova O. S., Filippova O. E., Sergeeva T. B.

Held the expedition in the village Pinega Arkhangelsk region (March 2011), surveyed 30 women 34-71 years suffering from diseases of the gastrointestinal tract (GIT). In the peripheral blood was determined: phenotypes of lymphocytes CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CDHLADR<sup>+</sup>. In women with diseases of the gastrointestinal tract characterized by a high average content of cytotoxic T-lymphocytes (CD8<sup>+</sup>) 62,06±2,61% of persons; elevated levels of natural killer cells (CD16<sup>+</sup>) identified in 30,43±1,82% of cases in the group of patients. Marked lower the concentration of activated T-cells with receptors for transferrin (CD71<sup>+</sup>), low values are typical for 61,53±2,60% of the surveyed.

*Keywords: diseases of a gastrointestinal path, phenotypes of lymphocytes, Arctic.*

---

---

## ЗАЖИВЛЕНИЕ СТРЕССОВЫХ ЯЗВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

Никольский И. С., Семенова Я.-М. А., Никольская В. В.

*Институт генетической и регенеративной медицины АМН, Киев, Украина*

Исследовали влияние МСК на образование язв желудка при стрессе у крыс. Использовали модель иммобилизационного водно-иммерсионного стресса. При пролонгированном стрессе наблюдается более выраженное язвообразование, чем при остром, а также более глубокое снижение клеточности тимуса, селезенки и существенное увеличение количества лейкоцитов в периферической крови. Введение МСК костного мозга за 24 часа до последнего воспроизведения стрессового воздействия в модели пролонгированного стресса значительно снижает интенсивность язвообразования и вызванные стрессом количественные клеточные изменения в органах иммунной системы.

*Ключевые слова:* Мультипотентные стромальные клетки, стресс, желудочные язвы, репарация.

**Введение:** Одним из перспективных способов влияния на регенерацию и репарацию является использование стволовых клеток различных типов, среди которых особое внимание в настоящее время уделяется мультипотентным стромальным клеткам (МСК), благодаря их способности к миграции в патологические очаги, мультилинейной дифференцировке, продукции комплекса цитокинов, экспрессии адгезивных и других молекул, обуславливающих возможность мультиорганного хоминга. Они также оказывают метаболическое, иммуномодулирующее, главным образом толерогенное, и активирующее врожденный иммунитет действие, и в конце концов осуществляют определенное влияние на эндокринный статус,

что и определяет актуальность исследования влияния МСК на развитие стресса и образование стрессовых язв желудка.

Отдельные литературные данные свидетельствуют о клинической эффективности трансплантации костномозговых клеток при язвах и других повреждениях эпителия желудка [1].

**Материалы и методы.** В опытах использовали самцов нелинейных крыс массой 220–260 г. Стресс вызывали методом иммобилизационного водно-иммерсионного стресса. Иммобилизованных животных выдерживали 3 часа в воде (23 °С), которая доходила до уровня мечевидного отростка. За сутки до проведения опытов животных не кормили, и давали воду *ad libitum*.

Модель стресса воспроизводили в двух вариантах: острый и пролонгированный стресс. Для получения острого процесса стресс воспроизводили однократно. Для моделирования пролонгированного стресса крыс стрессировали трижды с интервалом в 24 часа, затем через 96 часов стресс индуцировали еще раз.

МСК изолировали механическим методом из стромы костного мозга бедренной кости крыс. Адгезирующую к пластику фракцию клеток, культивировали при 37 °С и 5% атмосфере CO<sub>2</sub> и пересевали до 10 пассажа (питательная среда DMEM/F12 (Sigma, США), 10% ЭТС (Sigma, США), 4 нг/мл основного фактора роста фибробластов (Sigma, США), 0,5 мг/мл L-глутамина (Sigma, США), 1 мкг/мл фунгицина, 50 мкг/мл гентамицина).

МСК в количестве 4×10<sup>6</sup> вводили внутривенно за 24 часа до острого стресса или последнего воспроизведения стрессовой реакции при моделировании пролонгированного стресса. Животных брали на исследования сразу после прекращения действия стрессовых факторов в соответствии с рекомендациями международных правил проведения работ с экспериментальными животными.

Для осмотра язвенных поражений желудок промывали 2% раствором формалина и оставляли в этом растворе на 10 мин. Затем его разрезали по большой кривизне и визуально подсчитывали количество и площадь язв.

Для определения клеточности лимфоидных органов, тимус и селезенку взвешивали, а клетки ресуспендировали в питательной среде. Количество кариоцитов тимуса и селезенки и количество лейкоцитов периферической крови подсчитывали в 3% растворе уксусной кислоты в камере Горяева.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Стьюдента (t) и непараметрического критерия Вилкоксона-Мана-Уитни (U).

Таблица – Площадь (мм<sup>2</sup>) и количество язвенных поражений желудка у крыс после пролонгированного стресса при введении МСК

Статистические показатели	Площадь язвенных поражений желудка		Количество язвенных поражений желудка	
	без введения МСК	с введением МСК	без введения МСК	с введением МСК
М	20,45	4,37	25,3	8,0
±m	3,92	1,67	5,0	3,0
n	6	6	6	6
ГК	10-32,66	0-11,03	15-46	0-19
p (t, U)	-	< 0,05	-	< 0,05

**Результаты и обсуждение.** После воспроизведении острого и пролонгированного стресса осмотр слизистой оболочки желудка животных показал две формы язвенных поражений: первая – с большим количеством небольших язв (около 0,5 мм<sup>2</sup>), вторая – с наличием больших по площади язв (более 4 мм<sup>2</sup>) и меньшим количеством малых язв. При этом первая форма язвенных поражений преобладала в группах животных с острым стрессом (91% случаев) и у стрессированных животных после введения МСК (все животные). Вторая форма преобладала у животных после пролонгированного стресса (67% случаев).

Площадь язвенных поражений желудка крыс после пролонгированного стресса была существенно больше (20,45±3,92 мм<sup>2</sup>) по сравнению с таковой у животных после острого стресса (10,17±1,19 мм<sup>2</sup>; p<0,05), а количество язвенных поражений у животных после пролонгированного стресса имело тенденцию к росту.

Одним из важных патогенетических механизмов, который может влиять на образование и заживление язв может быть функциональная несостоятельность фибробластов слизистой оболочки желудка [2], а также цитотоксическое влияние на эти клетки естественных киллеров и Т-лимфоцитов, связанное с изменением ультраструктуры фибробластов и фибробластоидных клеток [3]. Известно также, что имеющиеся в эпителии желудка взрослых животных МСК играют важную роль в обновлении этой ткани [4, 5]. В проведенных экспериментах введение МСК влияло на язвообразование в зависимости от варианта стресса. У животных с острым стрессом МСК существенно не влияли на заживление язв. Но, как можно увидеть из таблицы, введение МСК при пролонгированном стрессе приводило к значительному снижению количества и площади язв.

Общеизвестными последствиями стресса являются снижение относительного веса

и клеточности тимуса и селезенки, а также лейкоцитоз. Действительно, воспроизведение пролонгированного стресса приводило к существенному снижению относительного веса тимуса и селезенки и к уменьшению их клеточности. В результате введения МСК клеточность тимуса и селезенки существенно увеличивалась (соответственно: с  $1,27 \pm 0,32$  до  $1,60 \pm 0,15 \times 10^6/\text{мг}$  и с  $0,19 \pm 0,06$  до  $0,29 \pm 0,06 \times 10^6/\text{мг}$ ;  $p < 0,05$ ).

Пролонгированный стресс также приводил к существенному увеличению количества лейкоцитов в периферической крови крыс, а введение МСК несколько снижало эти показатели.

**Вывод.** Таким образом, при пролонгированном стрессе наблюдается более выраженное, чем при остром, язвообразование, а также более глубокое снижение клеточности тимуса, селезенки и увеличение количества лейкоцитов в крови. Введение МСК костного мозга за 24 часа до последнего воспроизведения стресса в мо-

дели пролонгированного стресса существенно снижает интенсивность язвообразования и вызванные стрессом количественные клеточные изменения в иммунной системе, что связано, видимо, с одной стороны, с непосредственным регенеративным влиянием МСК на слизистую оболочку желудка, а с другой, с известным общим метаболическим действием МСК.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аскарлов М. Б. Автореф. дис. ... д.м.н. – Москва, 2009, 20 с.
2. Логинов А. С., Потапова В. Б., Соколова Г. Н., Ульянова В. В. Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 1996, 4, 33-38.
3. Логинов А. С., Гудкова Р. Б., Потапова В. Б. Иммунология, 1992, 2, 11-14.
4. Bjercknes M., Cheng H. Am. J. Gastrointest. Liver Physiol, 2002, 283 (3), 767-777.
5. Okumura T., Wang S.S.W., Takashi S. et al. Laboratory Investigation, 2009, 89, 14101422.

### HEALING OF THE STRESS STOMACH ULCERS TREATED WITH BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Nikolskiy I. S., Semenova Y.-M., Nikolskaya V. V.

*Institute of genetic and regenerative medicine of AMN, Kiev, Ukraine*

BM-MSCs influence on stress stomach ulceration has been studied in rats. A model of water immersion-restraint stress was used. The prolonged stress resulted in more prominent stomach ulceration than acute stress. Moreover, thymic and spleen cell number was greatly decreased and leukocyte cell number in peripheral blood was significantly increased under prolonged stress. BM-MSCs transplantation 24 hours prior to the last stress reproduction in a model of prolonged stress considerably reduces the intensity of the stress-induced ulceration and quantitative cellular changes in the organs of the immune system.

*Key words: mesenchymal stromal cells, MSCs, stress, stomach ulcers, reparation.*

### УЧАСТВУЕТ ЛИ ГАМК-ЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТАХ ПЕПТИДОВ ТИМУСА?

Новоселецкая А. В.<sup>1</sup>, Киселева Н. М.<sup>2</sup>, Зими́на И. В.<sup>3</sup>, Иноземцев А. Н.<sup>1</sup>, Арион В. Я.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>МГУ им. М. В. Ломоносова, <sup>2</sup>ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрав России, <sup>3</sup>ФГБУН НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

В последнее время большое внимание уделяется изучению взаимодействия иммунной и нервной систем в патогенезе тревожных расстройств. Цель данной работы – изучение влияния препарата пептидов тимуса – тактивина – на коррекцию тревожных состояний и выявление участия ГАМК-ергической системы в эффектах препарата. По результатам проведенных опытов установлено, что препарат снижает тревожность у крыс, но фармакологический эффект тактивина не зависит от состояния ГАМК-А рецепторов в гипоталамусе и фронтальной коре интактных животных.

*Ключевые слова:* пептиды тимуса, ГАМК, стресс-система, анксиолитический эффект.

**Введение.** В последнее время интенсивно изучается взаимодействие нервной и иммунной систем, что привело к созданию нового направления исследований, получившего название нейроиммунофизиологии [1]. Известно, что тимические лимфоциты и ткань головного мозга имеют общие антигены [2]. Получены доказательства общности пептидной регуляции нейронов и иммунокомпетентных клеток [3–5].

Воздействие ЦНС на активность иммунной системы через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковые структуры и работу вегетативной нервной системы в настоящее время не подлежит сомнению [6–10].

Тревожные состояния и стрессовые воздействия приводят к выраженным нарушениям в иммунной и нейроэндокринной системах. Коррекция последствий таких воздействий с помощью фармакологических препаратов является важнейшей задачей при лечении этих патологий. Наиболее распространенными средствами лечения таких расстройств остаются бензодиазепины, основным механизмом действия которых является влияние на ГАМК(A)-бензодиазепиновый рецепторный комплекс. Несмотря на значительный терапевтический потенциал данных соединений, их применение сопровождается развитием нежелательных побочных эффектов (седации, толерантности, лекарственной зависимости и др.) [11]. Работы последних лет сосредоточены на поиске новых средств, лишенных указанных недостатков [12–14]. Кандидатами на эту роль предлагаются иммуотропные препараты, однако в настоящее время в литературе имеются лишь единичные сообщения об их антистрессорных свойствах [15].

**Целью** данной работы явилось изучение влияния препарата пептидов тимуса – тактивина на коррекцию тревожных состояний и выявление участия ГАМК-ергической системы в эффектах препарата.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили на 40 крысах Wistar весом 180–200 г. Крысы содержались в пластиковых клетках при постоянной температуре (21–22 °С), при 12-часовом световом дне и имели неограниченный доступ к воде и пище. Опыты выполнены в соответствии с этическими требованиями, предъявляемыми к работе с лабораторными животными. Опытным животным вводили препарат пептидов тимуса – тактивин (полу-

чен в Лаборатории молекулярной иммунологии и биохимии ФГБУН «НИИ ФХМ» ФМБА России). Препарат вводили внутрибрюшинно пятикратно один раз в сутки в дозе 0,5 мг/кг. Контрольным животным вводили физиологический раствор объемом 0,5 мл.

В 1-й серии экспериментов проводили тестирование животных в приподнятом крестообразном лабиринте [16]. Правомерность использования теста в качестве модели тревожности оправдывается тем, что он основан на тех же природных стимулах, которые способны вызвать тревожность и у людей. Так, предполагается, что в приподнятом крестообразном лабиринте используется баланс естественного страха животных (перед новизной (неофобия), открытым пространством и, возможно, высотой) и одновременного стремления исследовать эти незнакомые условия, весьма характерного для грызунов.

Во 2-й серии экспериментов проводили радиолигандный анализ ГАМКА-рецепторов в структурах мозга через 24 часа после последней инъекции веществ. После декапитации из головного мозга выделяли гипоталамус, который является центральной фигурой стресс-системы, и фронтальную кору. В эксперименте использовали меченный тритием лиганда ГАМКА-рецептора. Инкубационная смесь содержала [G-<sup>3</sup>H] SR95531 в Tris-цитратном буфере (рН 7.1), суспензию мембран, для неспецифического связывания добавляли немеченый лиганд. Процедуру радиорецепторного изучения связывания ГАМКА-рецепторов проводили по методу Ito Y. et al. [17].

Для анализа насыщения и получения характеристик связывания  $B_{max}$  (плотность мест связывания с рецептором) и  $K_d$  (степень сродства рецептора к лиганду) измеряли специфическое связывание [G-<sup>3</sup>H] -SR95531 в диапазоне концентраций от 0,01 до 30 нМ. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого лиганда (20 мкМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием.

**Результаты.** В приподнятом крестообразном лабиринте на фоне тактивина наблюдалось значимое увеличение количества посещений темных рукавов в сравнении с контрольной группой (рис. 1), статистически значимое увеличение посещения светлых рукавов и центрального сектора ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что на фоне тактивина не происходило увели-

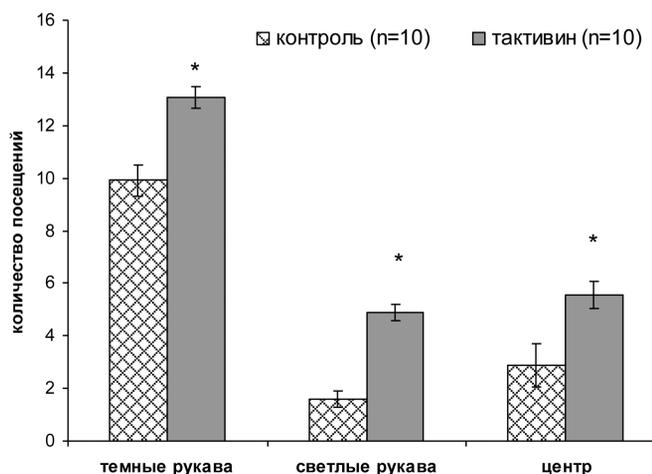


Рис. 1. Поведение животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (приведены средние значения и стандартные отклонения ( $\pm$  SD), n – число животных в группе). \* –  $p < 0,05$  относительно контроля.

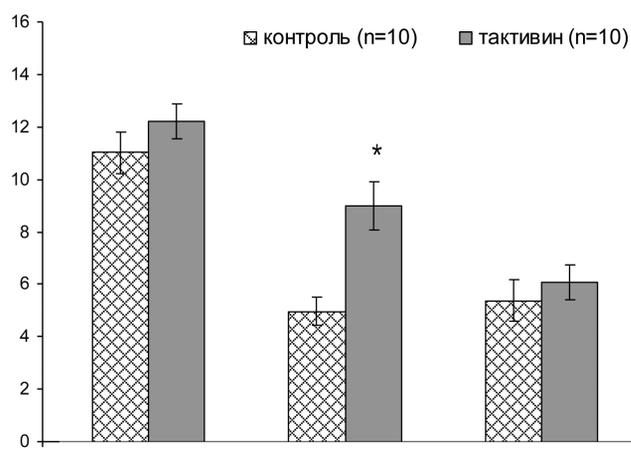


Рис. 2. Количество актов, совершенных животными в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (приведены средние значения и стандартные отклонения ( $\pm$  SD), n – число животных в группе). \* –  $p < 0,05$  относительно контроля.

количество посещений	контроль (n=10)	тактивин (n=10)
темные рукава	9,91	13,06*
светлые рукава	1,59	4,88*
центр	2,88	5,55*
стандартное отклонение		
темные рукава	0,6	0,4
светлые рукава	0,3	0,3
центр	0,8	0,5

количество актов	контроль (n=10)	тактивин (n=10)
стойки	8,33	9,21
свешивания	3,75	6,78*
выглядывания	4,07	4,60
стандартное отклонение		
стойки	0,6	0,5
свешивания	0,4	0,7
выглядывания	0,6	0,5

чения количества стоек, а количество свешиваний статистически значимо увеличивалось ( $p < 0,05$ ). Количество выглядываний во всех группах было сопоставимо (рис. 2). Отдельно анализировался груминг, в котором Я. Вишоу с соавторами выделял 7 стадий [18]: 1 – лизание передних лап; 2 – умывание носа и мордочки; 3 – умывание головы; 4 – умывание туловища; 5 – чесание туловища; 6 – умывание задних лап и хвоста; 7 – умывание гениталий.

Существует четкая последовательность этих стадий. Стрессирование проявляется либо в выпадении отдельных стадий, либо в нарушении их последовательности. На тактивине мы наблюдали четкий последовательный груминг, который носил выраженный комфортный характер и достигал финальных стадий. Таким образом, исходя из полученных данных, можно говорить о снижении тактивинном тревожности крыс.

Для того, чтобы ответить на вопрос, участвует ли ГАМК-ергическая система в анксио-

литическом эффекте препарата пептидов тимуса мы провели радиолигандный анализ.

Полученные результаты не выявили достоверных различий в количестве исследуемых рецепторов в гипоталамусе между контрольными и опытными группами (F-критерий Фишера,  $p = 0,30$ ). В контрольной группе величина  $K_d$  составила  $15 \pm 3,6$  нМ, а величина  $V_{max}$   $2000 \pm 196$  фмоль/мг белка. На фоне тактивина величина  $K_d$  составила  $12 \pm 3,0$  нМ, а величина  $V_{max}$   $2305 \pm 173$  фмоль/мг белка. Во фронтальной коре между контрольными и опытными группами животных различий также не обнаружено (F-критерий Фишера,  $p = 0,30$ ). В контрольной группе величина  $K_d$  составила  $8 \pm 1$  нМ, а величина  $V_{max}$   $1059 \pm 71$  фмоль/мг белка. На фоне тактивина величина  $K_d$  составила  $8 \pm 1$  нМ, а величина  $V_{max}$   $1168 \pm 65$  фмоль/мг белка. На основании полученных данных можно заключить, что фармакологический эффект тактивина не зависит от состояния ГАМК-А

рецепторов в гипоталамусе и фронтальной коре интактных животных.

Встает вопрос о механизме действия тактивина на центральную нервную систему. На основе ранее проведенного нейрохимического анализа [19] и литературных данных [20–22] можно высказать предположение о возможном воздействии тактивина на центральную нервную систему через цитокиновые каскады. Известно, что пептиды тимуса активируют Т-клеточное звено иммунитета, при этом увеличивается продукция различных цитокинов: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО $\alpha$ , ИФ $\gamma$  [20–22]. ИЛ-1 повышает уровень таурина в гипоталамусе [23], что было также показано на фоне тактивина [24]. Увеличивая продукцию ИЛ-1, тактивин, согласно нашим данным [19], повышает уровень норадреналина в гиппокампе. Таким образом, тактивин, с одной стороны, нормализует иммунологические показатели в случае их отклонения от нормы в ту или иную сторону, не вызывая критических нарушений [25], а с другой стороны, увеличивает уровень тормозных аминокислот в структурах, связанных с эмоциональной реакцией [24]. Но фармакологический эффект тактивина не зависит от состояния ГАМК-А рецепторов в гипоталамусе и фронтальной коре интактных животных.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пальцев М. А., Кветной И. М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии. Медицина, Москва 2008, 512 с.
2. Белокрылов Г. А. Влияние гомогенатов серого и белого вещества сингенного головного мозга на иммунный ответ у интактных и тимэктомированных мышей. Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 1978, 9, 55-60.
3. Blalock J. V., Harbour-McMenamin D. D., Smith E. M. Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic system. J. Immunol. 1985, 135, 2, 41-58.
4. Garber S. L. Peptide hormones and their receptors in the immune system: immunomodulation and the neuro-immune axis. Einstein Quart. 1986, 4 (3), 112-116.
5. Roszman T. L., Jackson J. C., Cross R. J., Titus M. J., Markesbery W. R. et al. Neuroanatomic and neurotransmitter influence on immune function. J. Immunol. 1985, 135 (2), 769-772.
6. Абрамов В. В. Взаимодействие иммунной и нервной систем. Наука, Сиб. отд-ние, Новосибирск 1988, 166 с.
7. Абрамов В. В., Абрамова Т. Я., Егоров Д. Н., Вардосанидзе К. В. Высшая нервная деятельность и иммунитет. Типография СО РАМН, Новосибирск 2001, 123 с.
8. Гриневич В. В., Акмаев И. Г., Волкова О. В. Основы взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной системы. Symposium, Санкт-Петербург 2004, 159 с.
9. Крыжановский Г. Н., Магаева С. В., Макаров С. В., Сепиашвили Р. И. В кн.: Нейроиммунопатология. Руководство. НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва 2003, 67-132.
10. Savino W., Dardenne M. Neuroendocrine Control of Thymus Physiology. Endocrine Rev. 2000, 21 (4), 412-443.
11. Atack J. R. Anxiolytic compounds acting at the GABA (A) receptor benzodiazepine binding site. Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. 2003, 2 (4), 213-232.
12. Atack J. R. GABA receptor subtype-selective modulators. I.  $\alpha 2/\alpha 3$ -selective agonists as non-sedating anxiolytics. Curr. Top Med. Chem. 2011, 11 (9), 1176-1202.
13. Swanson C. J., Bures M., Johnson M. P., Linden A. M., Monn J. A. et al. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. Nat. Rev. Drug Discov. 2005, 4, 131-144.
14. Wang J., Tsirka S. E. Tuftsin fragment 1–3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. Stroke 2005, 3, 613-618.
15. Киселева Н. М., Новоселецкая А. В., Зимина И. В., Иноземцев А. Н., Арион В. Я. Влияние тактивина на функциональное нарушение реакции избегания у крыс. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2009, 147 (1), 75-77.
16. Воронина Т. А., Середенин С. Б. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Москва 2000, 126-130.
17. Ito Y., Koo Lim D., Hayase Y., Murakoshi Y., Ho I. Effects of Bicuculline on [ $^3\text{H}$ ] SR 9531 binding in discrete regions of rat brains. Neurochem. Res. 1992, 4, 307-313.
18. Whishaw I. Q., Haun F., Kolb B. Analysis of behavior in laboratory rodents. In: Modern techniques in neuroscience. Windhorst U. and Johansson H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin 1999, 1243-1268.
19. Киселева Н. М., Новоселецкая А. В., Иноземцев А. Н., Кудрин В. С., Клодт П. М. и др. Нейрохимическое изучение механизма действия полипептидного препарата тимуса (тактивина) при эмоциональном стрессе. Вестник РУДН, серия Медицина 2011, 4, 143-148.
20. Новиков Д. К., Сергеев Ю. В., Новикова В. И. Характеристика иммунофармакотерапевтических препаратов. Иммунопатология, иммунология, аллергология 2002, 4, 7–27.
21. Оковитый С. В. Клиническая фармакология препаратов пептидных и синтетических иммуностимуляторов. «ФАРМиндекс-Практик» (Журн. по клинич. фармакол. и рациональной фармако-терапии) 2005, 8, 13-29.

22. Киселева Н. М., Иноземцев А. Н. Возможная роль тимуса в работе стресс-лимитирующей системы. Иммунология, аллергология, инфектология 2010, 3, 13-20.
23. Feleder C., Refojo D., Nacht S., Moguilevsky J. A. Interleukin-1 stimulates hypothalamic inhibitory amino acid neurotransmitter release. Neuroimmunomodulation 1998, 5 (1-2), 1-4.
24. Новоселецкая А. В., Киселева Н. М., Иноземцев А. Н., Зими́на И. В., Белова О. В. и др. Влияние препарата полипептидов тимуса (тактивина) на содержание возбуждающих и тормозных аминокислот в структурах мозга крыс. Росс. иммунол. журн. 2012, 6 (4), 395-398.
25. Арион В. Я., Зими́на И. В., Москвина С. Н., Быстрова О. В. Тактивин-природный иммунокорректор. Клиническое применение. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2007, 4, 11-26.

## DOES GABAERGIC SYSTEM TAKE PART IN ANXIOLYTIC EFFECTS OF THYMIC PEPTIDES?

Novoseletskaia A. V.<sup>1</sup>, Kiseleva N. M.<sup>2</sup>, Zimina I. V.<sup>3</sup>, Inozemtsev A. N.<sup>1</sup>, Arion V. Ya.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, <sup>2</sup>N.I. Pirogov Russian National Re-search Medical University, <sup>3</sup>Scientific Research Institute for Physical-Chemical Medicine

Many recent studies have focused on exploring immune system-nervous system interaction in the pathogenesis of anxiety disorders. This project's objective was to explore the influence of the thymic peptide preparation tactivin on reducing anxiety and detecting the GABAergic system's contribution to the preparation's effects. The tests have established that the preparation does reduce anxiety in rats, but tactivin's pharmacological effect does not depend on the condition of the GABA-A receptors in the hypothalamus or the frontal cortex of intact rats.

*Keywords: thymic peptides, GABA, stress, anxiolytic effect.*

## ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕЛАТОНИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСИНХРОНОЗЕ В УСЛОВИЯХ СВЕТОДИОДНОГО ИСКУССТВЕННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Осиков М. В., Гизингер О. А., Огнева О. И.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Научно-образовательный центр «Проблемы фундаментальной медицины», Россия, Челябинск

В статье продемонстрированы иммунотропные эффекты экзогенного мелатонина при экспериментальном десинхронозе. Выявлено стимулирующее влияние экзогенного мелатонина препарата «Мелаксен» на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови лабораторных животных, находящихся в условиях экспериментального десинхроноза.

*Ключевые слова:* Мелатонин, десинхроноз, нейтрофильные гранулоциты.

**Введение.** Применение в современном обществе искусственного освещения в ночное время изменило световой режим и продолжительность воздействия света на человека, что привело к нарушению правильной регуляции циркадианных ритмов [1]. Адаптационные перестройки, связанные с действием искус-

ственного света в условиях изменённых циркадных ритмов, затрагивают практически все стороны жизнедеятельности, влияя на физиологические, биохимические и структурные изменения органов и систем [2, 3]. Ранее нами установлено, что при десинхронозе в условиях светодиодного освещения в динамике 10-30

суток изменяется врождённый иммунитет: абсолютное число нейтрофилов повышается, моноцитов снижается, усиливается поглотительная способность фагоцитов и снижается интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста. Предполагаем, что данные изменения вызваны снижением ночного пика уровня мелатонина – гормона, участвующего в контроле органных, тканевых и клеточных реакций. С целью коррекции иммунологических изменений и профилактики клинических последствий нарушений иммунитета можно рассматривать вопрос о применении экзогенного мелатонина.

Цель работы – оценить влияние экзогенного мелатонина на количественный состав и функ-

цию фагоцитов периферической крови при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного искусственного освещения.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на 40 половозрелых морских свинках массой  $300 \pm 50$  г, которых содержали в стандартных помещениях вивария. Животные случайным образом были распределены на 2 основные группы. Группа 1 ( $n=20$ ) – десинхроноз в условиях светодиодного освещения (ДесСДО), цветовая температура 4500 К. Группа 2 ( $n=20$ ) – животные, которым на фоне действия круглосуточного светодиодного освещения вводили экзогенный мелатонин (ДесСДО+Мел). в составе препарата «Мелаксен» (МНН: мелатонин Юнифарм. Инк., США)

**Таблица 1.** Влияние мелатонина на количественный состав лейкоцитов и функциональная активность фагоцитов при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения. ( $M \pm m$ )

Группы / Показатели	10 суток		20 суток		30 суток	
	Группа 1 ДесСДО ( $n=6$ )	Группа 2 ДесСДО + Мел ( $n=6$ )	Группа 3 ДесСДО ( $n=8$ )	Группа 4 ДесСДО + Мел ( $n=6$ )	Группа 5 ДесСДО ( $n=8$ )	Группа 6 ДесСДО + Мел ( $n=6$ )
Лейкоц. $\cdot 10^9/\text{л}$	11,00 $\pm$ 0,52	10,27 $\pm$ 0,63	11,13 $\pm$ 0,66	9,60 $\pm$ 0,33	9,23 $\pm$ 0,27	9,60 $\pm$ 0,22
Эоз. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,09 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,001	0	0,06 $\pm$ 0,001	0	0
Н.ф п/я $\cdot 10^9/\text{л}$	0,66 $\pm$ 0,14	0,42 $\pm$ 0,15	0,48 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,19	0,47 $\pm$ 0,13	0,36 $\pm$ 0,08
Н.ф. с/я $\cdot 10^9/\text{л}$	5,92 $\pm$ 0,45	6,18 $\pm$ 0,49	6,35 $\pm$ 0,23	3,71 $\pm$ 0,68 $p_{3-4} < 0,05$ (U)	4,56 $\pm$ 0,64	2,96 $\pm$ 0,55 $p_{5-6} < 0,05$ (U)
Н.ф всего, $\cdot 10^9/\text{л}$	6,59 $\pm$ 0,31	6,60 $\pm$ 0,51	6,83 $\pm$ 0,22	4,73 $\pm$ 0,87 $p_{3-4} < 0,05$ (U)	5,03 $\pm$ 0,64	3,32 $\pm$ 0,62 $p_{5-6} < 0,05$ (U)
Лимф. $\cdot 10^9/\text{л}$	3,96 $\pm$ 0,44	3,13 $\pm$ 0,15	3,87 $\pm$ 0,7	3,52 $\pm$ 0,64	3,77 $\pm$ 0,42	5,63 $\pm$ 0,42 $p_{5-6} < 0,05$ (U)
Моно, $\cdot 10^9/\text{л}$	0,40 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,10	0,43 $\pm$ 0,11	1,31 $\pm$ 0,24 $p_{3-4} < 0,05$ (U)	0,43 $\pm$ 0,07	0,64 $\pm$ 0,06 $p_{5-6} < 0,05$ (U)
АФ, %	26,00 $\pm$ 1,89	27,67 $\pm$ 1,17	30,67 $\pm$ 0,76	31,67 $\pm$ 2,78	32,00 $\pm$ 1,75	28,67 $\pm$ 0,56
ИФ, у.е.	0,98 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,05	1,27 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,05
ФЧ, у.е.	3,73 $\pm$ 0,11	3,84 $\pm$ 0,29	3,73 $\pm$ 0,20	4,07 $\pm$ 0,39	3,75 $\pm$ 0,19	3,97 $\pm$ 0,22
НСТ-тест спонт., акт, %	43,67 $\pm$ 3,94	49,67 $\pm$ 0,42 $p_{1-2} < 0,05$ (WW)	27,33 $\pm$ 0,92	37,00 $\pm$ 4,12 $p_{3-4} < 0,05$ (U)	37,75 $\pm$ 2,78	39,33 $\pm$ 1,28
НСТ-тест спонт., инт., у.е.	0,57 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,03 $p_{1-2} < 0,05$ (U)	1,42 $\pm$ 0,15	1,03 $\pm$ 0,12	1,18 $\pm$ 0,03	1,30 $\pm$ 0,06 $p_{5-6} < 0,05$ (U)
НСТ-тест инд., акт, %	83,67 $\pm$ 1,65	73,33 $\pm$ 4,77	74,67 $\pm$ 6,45	84,67 $\pm$ 5,49	60,00 $\pm$ 4,45	71,33 $\pm$ 3,06 $p_{5-6} < 0,05$ (U)
НСТ-тест инд., инт., у.е.	0,96 $\pm$ 0,06	1,10 $\pm$ 0,05	1,54 $\pm$ 0,12	1,69 $\pm$ 0,22 $p_{3-4} < 0,05$ (WW)	1,41 $\pm$ 0,17	1,60 $\pm$ 0,09

Примечание:  $p$  – показатель значимости различий между группами по критерию Манна-Уитни (U) и Вальда-Вольфовица (WW), лейкоц. – общее количество лейкоцитов, эоз. – эозинофилы, н.ф. п/я – нейтрофилы палочкоядерные, н.ф. с/я – нейтрофилы сегментоядерные, лимф. – лимфоциты, моно. – моноциты, АФ- активность фагоцитоза, ИФ-интенсивность фагоцитоза, ФЧ- фагоцитарное число.

per os из расчета 1 мг/кг с 1 суток от начала эксперимента в течение 30 дней. Животным группы ДесСДО вводили эквивалентное количество изотонического раствора NaCl 0,9%. Световой десинхроноз создавали содержанием лабораторных животных при круглосуточном освещении в течение 30 суток [4]. Оценку иммунологических показателей осуществляли на 10 сутки, 20 сутки, 30 сутки эксперимента. Для исследования врожденного иммунитета в крови общепринятыми методами определяли общее количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу и функциональную активность фагоцитов по показателям кислород-зависимого метаболизма и поглотительной способности. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica v. 10.0 for Windows».

**Основные результаты.** Применение мелатонина при экспериментальном десинхронозе выявило, что в группе на 10 сутки количество лейкоцитов не изменяется, усиливается активность спонтанного НСТ-теста (табл. 1). На 20 сутки снижается абсолютное количество сегментоядерных нейтрофилов и повышается абсолютное содержание моноцитов, усиливается НСТ-тест спонтанный и индуцированный. На 30 сутки в абсолютное содержание нейтрофилов сохраняется сниженным, повышается количество лимфоцитов и моноцитов, сохраняются повышенными показатели кислород-зависимого метаболизма.

**Обсуждение.** Таким образом, применение мелатонина при экспериментальном десинхронозе приводит к изменению количественного состава фагоцитирующих клеток в периферической крови: снижению количества сегментоядерных нейтрофилов и повышению моноцитов на 20 и 30 сутки, повышению количества лимфоцитов на 30 сутки. Изменения функциональной активности фагоцитов проявляются в подавлении кислород-зависимого метаболизма на 10 сутки и активацией производства кислородных радикалов нейтрофилами на 20 и 30 сутки. Как видно, эффект экзогенного мелатонина носит нормализующий характер: курсовое применение мелатонина восстанавливает количественный состав и функциональную активность фагоцитов периферической крови до уровня у интактных животных. Полагаем, что обнаруженные эффекты мелатонина вызваны с одной стороны, специфическим Toll-рецепторным взаимодействием с фагоцитами перифериче-

ской крови, которое обусловлено наличием рецепторов к мелатонину на иммунокомпетентных клетках (лимфоцитах, нейтрофилах) [5]. С другой стороны сами лимфоциты способны синтезировать мелатонин, что является дополнительным свидетельством участия мелатонина в регуляции иммунной системы [6]. Действие мелатонина на производство моноцитов может быть связано с его прямым действием через рецепторы к мелатонину или за счет увеличения чувствительности моноцитов к стимуляторам, таким как IL-3, IL-4, IL-6 или гранулоцито-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) [7]. Таким образом, эффекты экзогенного мелатонина на клеточный состав лейкоцитарной формулы и функциональную активность фагоцитов периферической крови реализуются за счет специфических рецепторы на мембранах клеток.

**Выводы.** Курсовое применение мелатонина при экспериментальном десинхронозе приводит к перераспределению популяций лейкоцитов периферической крови: снижению количества нейтрофилов и повышению количества лимфоцитов и моноцитов, усилению НСТ-теста спонтанного и индуцированного.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов, В. Н. Мелатонин роль в организме, применение в клинике. – СПб.: Издательство «Система», 2007. – 40 с.
2. Агаджанян, Н. А. Проблемы адаптации и учение о здоровье / Н. А. Агаджанян, Р. М. Баевский, А. П. Берсенева. – М.: Изд-во Рос. ун-та дружбы народов, 2006. – 284 с.
3. Гизингер, О. А. Сравнительный анализ влияния света, генерируемого различными источниками освещения, на функциональную активность нейтрофилов *in vitro* / О. А. Гизингер, М. В. Осиков, Л. Ф. Телешева, О. И. Огнева // Вестник Южно-Уральского государственного университета. – 2013. – Т. 13. – № 3. – С. 94–98. – (Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура»).
4. Труфакин, В. А. Лимфоидная система – циркадианная временная организация и десинхроноз / В. А. Труфакин, А. В. Шурлыгина, С. В. Мичурин // Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 32. – № 1. – С. 5–12.
5. Garcia-Maurino, S. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines / S. Garcia-Maurino, D. Pozo, J. R. Calvo, J. M. Guerrero // J Pineal Res. – 2000 – № 29. – P. 129-137.

6. Carrillo-Vico, A. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance / A. Carrillo-Vico, J.R. Calvo, J.M. Guerrero and al. // *Faseb journal.* – 2004. – № 18 (3). – P. 537-539.
7. Currier, N. L. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity / N. L. Currier, L. Z. Sun, S. C. Miller // *J Neuroimmunol.* – 2000. – № 104. – P. 101-108.

## IMMUNOTROPNYE EFFECTS OF MELATONIN AT EXPERIMENTAL ДЕСИНХРОНОЗЕ IN THE CONDITIONS OF LED ARTIFICIAL LIGHTING

Osikov M. V., Gizinger O. A., Ogneva O. I.

*GBOU VPO Southern Ural state medical university of Ministry of Health of Russia, Scientific and educational center "Problems of Fundamental Medicine" Russia, Chelyabinsk*

The article demonstrated immunotropnye effects of exogenous melatonin in an experimental the process of disadaptation relative to the circadian rhythm. Revealed stimiliruyuschee influence of exogenous melatonin (drug melaxen) on the functional activity of neutrophils in peripheral blood of laboratory animals in conditions of experimental desynchronization.

*Keywords: Melatonin, experimental the process of disadaptation relative to the circadian rhythm, neutrophilic granulocytes.*

## РОЛЬ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ НАРУШЕНИЙ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Осиков М. В.<sup>1</sup>, Телешева Л.Ф.<sup>1</sup>, Агеев Ю. И.<sup>2</sup>, Никушкина К. В.<sup>3</sup>,  
Сумеркина В. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Научно-образовательный центр «Проблемы фундаментальной медицины», <sup>2</sup>кафедра патофизиологии, <sup>3</sup>центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

В эксперименте на 24 нелинейных крысах исследовано состояние процессов свободно-радикального окисления (СРО) в крови и их связь с изменением иммунного статуса при хронической почечной недостаточности (ХПН). Модель ХПН создавали путем двухэтапной оперативной резекции 5/6 почечной ткани. В плазме и в лимфоцитах экстрационно-спектрофотометрическим методом оценивали содержание первичных ( $E_{232}/E_{220}$ ), вторичных ( $E_{278}/E_{220}$ ) и конечных ( $E_{400}/E_{220}$ ) продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). В сыворотке определяли активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). Установлено, что в плазме происходит накопление первичных и вторичных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фракциях, снижение активности СОД и каталазы, в изопропанольной фракции лимфоцитов периферической крови увеличивается содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ. Содержание продуктов ПОЛ в плазме нарастает по мере снижения активности СОД и каталазы. Выраженность Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа при ХПН снижается по мере накопления продуктов ПОЛ в лимфоцитах.

*Ключевые слова:* иммунитет, хроническая почечная недостаточность, свободно-радикальное окисление.

Ранее нами показано, что при хронической почечной недостаточности (ХПН) наблюдается активация врожденного и депрессия адаптивного иммунитета [1–3]. Полагаем, что процессы свободно-радикального окисления (СРО) могут иметь значение в изменении количественного состава и функциональной активности иммунокомпетентных клеток и тем самым оказывать влияние на формирование иммунного статуса при ХПН. Учитывая, что баланс процессов СРО складывается из активности прооксидантных и антиоксидантных факторов, была сформулирована цель работы – исследовать содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность ферментов антиокислительной защиты в плазме и в лимфоцитах при экспериментальной ХПН в сопоставлении с выраженностью иммунного ответа.

**Материалы и методы исследования.** Работа выполнена на 24 нелинейных крысах массой 180–220 г, находящихся в стандартных условиях вивария на типовом рационе, манипуляции выполнялись по «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г.) и положениям Хельсинской Декларации ВОЗ (1997). Контрольная группа – ложнооперированные животные; опытная – животные с ХПН; модель ХПН создавали путем двухэтапной оперативной резекции 5/6 почечной ткани [4]. Терминальная стадия ХПН развивалась через 21 сутки, критериями служили повышение в сыворотке концентрации креатинина ( $> 60$  мкмоль/л), мочевины ( $> 5$  ммоль/л). Лимфоциты из крови выделяли на двойном градиенте плотности фикола и урографина («ДНК-технология», Россия, плотность 1,077), концентрацию клеток в суспензии доводили до  $3 \cdot 10^6$ /л. Использовали экстрационно-спектрофотометрический метод определения продуктов ПОЛ в плазме и суспензии лимфоцитов [5]. Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.):  $E_{232}/E_{220}$  (относительное содержание диеновых конъюгатов – ДК),  $E_{278}/E_{220}$  (уровень кетодиенов и сопряженных триенов – КД и СТ) и  $E_{400}/E_{220}$  (уровень оснований Шиффа – ШО). В сыворотке определяли активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). Статистический анализ проведен с использованием пакета программ Statistica for Windows v.10.0. Для оценки значимости различий использо-

вали критерий Манна – Уитни, наличия связи между признаками – коэффициент корреляции Спирмена (R).

**Результаты исследования и их обсуждение.** При экспериментальной ХПН происходит накопление продуктов ПОЛ в плазме. В гептановой фракции липидного экстракта плазмы происходит накопление первичных и вторичных продуктов ПОЛ, соответственно диеновых конъюгатов ацилгидроперексидов и кетодиенов и сопряженных триенов. В изопропанольной фракции липидного экстракта плазмы повышено содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ как в абсолютных величинах, так и в единицах индексов окисления. Отмечено увеличение абсолютного содержания оснований Шиффа в изопропанольной фракции, однако пересчет показателя на индекс окисления  $E_{400}/E_{220}$  не подтвердил этого факта. Процессы СРО включают не только прооксидантные системы, активность которых фиксируется по содержанию продуктов ПОЛ, но и систему антиоксидантной защиты с многочисленными представителями, как в плазме, так и в клетках организма. Рядом авторов указывается, что оксидативный стресс при ХПН связан в значительной мере не только с активацией продукции свободных радикалов, но и со снижением активности антиоксидантной системы [6]. При экспериментальной ХПН в плазме снижается активность каталазы и Cu, Zn – зависимой СОД. Отметим преимущественное снижение активности СОД (в среднем на 46%) по сравнению с каталазой (в среднем на 29%). Корреляционный анализ позволил установить, что содержание продуктов ПОЛ в плазме увеличивается по мере падения активности ферментов антиокислительной системы, статистически значимые связи больше характерны для СОД, чем для каталазы. Установлена корреляция между содержанием первичных продуктов в гептановой фракции и активностью каталазы ( $R = -0,47$ ;  $p < 0,05$ ) и СОД ( $R = -0,71$ ;  $p < 0,05$ ); активность СОД значимо коррелирует с уровнем вторичных ( $R = -0,63$ ;  $p < 0,05$ ) и конечных ( $R = -0,49$ ;  $p < 0,05$ ) продуктов в гептановой фракции и конечных продуктов в изопропанольной ( $R = -0,54$ ;  $p < 0,05$ ). По данным литературы, при уремии изменяется состояние всех основных компонентов антиоксидантной системы и маркеров процессов липоперок-

Таблица. Показатели СРО в крови при экспериментальной ХПН ( $M \pm m$ )

Показатели	Л/оперирир. (n=12)	ХПН (n=12)	Значение p
$E_{232}/E_{220}$ (г/плазма), е.и.о.	0,18±0,04	0,36±0,01	<0,005 (U)
$E_{278}/E_{220}$ (г/плазма), е.и.о.	0,013±0,005	0,081±0,011	<0,001 (U)
$E_{400}/E_{220}$ (г/плазма), е.и.о.	0,047±0,017	0,017±0,005	>0,05
$E_{232}/E_{220}$ (и/плазма), е.и.о.	0,25±0,03	0,39±0,01	<0,001 (U)
$E_{278}/E_{220}$ (и/плазма), е.и.о.	0,204±0,011	0,261±0,007	<0,001 (U)
$E_{400}/E_{220}$ (и/плазма), е.и.о.	0,017±0,005	0,016±0,002	>0,05
$E_{232}/E_{220}$ (г/лц), е.и.о.	0,69±0,09	0,66±0,02	>0,05
$E_{278}/E_{220}$ (г/лц), е.и.о.	0,39±0,04	0,36±0,05	>0,05
$E_{400}/E_{220}$ (г/лц), е.и.о.	0,09±0,02	0,09±0,01	>0,05
$E_{232}/E_{220}$ (и/лц), е.и.о.	1,33±0,05	8,39±2,58	<0,005 (U)
$E_{278}/E_{220}$ (и/лц), е.и.о.	0,22±0,03	0,42±0,04	<0,001 (U)
$E_{400}/E_{220}$ (и/лц), е.и.о.	0,035±0,010	0,13±0,02	<0,001 (U)
СОД плазмы, Ед/мл	1,61±0,07	0,87±0,14	<0,001 (U)
Каталаза плазмы, мкат/л	20,40±0,89	14,38±0,85	<0,001 (U)

Примечание. г-гептановая, и-изопропанольная фракция липидного экстракта плазмы или лимфоцитов (лц).

сидации, повышение активности НАДФН-оксидазы и депрессия функции СОД в ряде работ рассматривается как универсальный механизм окислительного стресса при ХПН [7]. Далее нас интересовала возможность накопления продуктов ПОЛ в суспензии лимфоцитов, полученных из крови экспериментальных животных с ХПН. Прежде всего, отметим, что при сравнении содержания продуктов ПОЛ в плазме и в лимфоцитах наблюдается меньшее количество продуктов ПОЛ в лимфоцитах в гептановой фракции и большее – в изопропанольной. При оценке содержания продуктов ПОЛ в гептановой фракции лимфоцитов обнаружено увеличение абсолютного количества общих липидов, первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ, однако после пересчета показателей на индексы окисления не установлено статистически значимых различий с группой ложнооперированных животных. В изопропанольной фракции лимфоцитов, несмотря на снижение абсолютного количества общих липидов и единичное увеличение абсолютного содержания кетодиенов и сопряженных триенов, обнаружено в пересчете на индексы окисления значимое повышение первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ.

По всей видимости, пусковым фактором активации процессов пероксидации мембранных фосфолипидов в лимфоцитах являются свободные радикалы, источником которых являются фагоциты, тромбоциты и эндотелиоциты, принимая во внимание тот факт, что в лимфоцитах отсутствуют системы генерации АФК. Полагаем, что окислительный стресс в крови при ХПН может инициировать гибель лимфоцитов путем апоптоза или некроза и тем самым изменять количественное представительство лимфоцитов в кровотоке и как следствие выраженность иммунного ответа. Для исследования связи между содержанием продуктов ПОЛ в липидном экстракте лимфоцитов и показателями адаптивного иммунитета при экспериментальной ХПН проведен корреляционный анализ. Установлена обратная сильная связь между содержанием диеновых конъюгатов ацилгидроперекисей в гептановой фракции и кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольной фракции липидного экстракта лимфоцитов и показателями Th1-зависимого ( $R=-0,82$ ;  $p<0,05$ ) и Th2-зависимого иммунного ответа ( $R=-0,39$ ;  $p<0,05$ ), а также отрицательная средней силы связь между содержанием кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольной фракции

ции и показателем Th1-зависимого иммунного ответа ( $R = -0,61$ ;  $p < 0,05$ ).

Таким образом, при экспериментальной ХПН в плазме происходит накопление первичных и вторичных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фракциях, снижение активности СОД и каталазы, в изопропанольной фракции лимфоцитов периферической крови увеличивается содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ. Содержание продуктов ПОЛ в плазме нарастает по мере снижения активности СОД и каталазы. Выраженность Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа снижается по мере накопления продуктов ПОЛ в лимфоцитах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. В. Осиков, Ю. И. Агеев, В. Ю. Ахматов. Российский иммунологический журнал. – 2013. – № 7 (16). – С. 204.
2. М. В. Осиков, Л. Ф. Телешева, Ю. И. Агеев, Д. А. Черепанов, А. А. Федосов. Современные проблемы науки и образования [Электронный ресурс]. – 2013. – № 5. – URL: [www.science-education.ru/111-9998](http://www.science-education.ru/111-9998). – дата обращения: 04.09.2013.
3. Ю. И. Агеев, М. В. Осиков, Л. Ф. Телешева, А. А. Федосов. Современные проблемы науки и образования [Электронный ресурс]. – 2014. – № 3; URL: [www.science-education.ru/117-13594](http://www.science-education.ru/117-13594) (дата обращения: 21.06.2014).
4. L. S. Santos, E. W. Chin et al. Acta Cir Bras. – 2006. – Vol. 21, № 4. – P. 252-257.
5. И. А. Волчегорский, И. И. Долгушин, О. Л. Колесников и др. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Изд-во ЧелГПУ, 2000. – 167 с.
6. M. Morena, S. Delbosc, A. M. Dupuy et al. Hemodial. Int. – 2005. – Vol. 9, № 1. – P. 37-46.
7. N. D. Vaziri. Semin. Nephrol. – 2004. – Vol. 24, № 5. – P. 469-473.

### THE ROLE OF FREE-RADICAL OXIDATION PROCESSES IN THE PATHOGENESIS OF IMMUNE IMPAIRMENTS IN EXPERIMENTAL CHRONIC RENAL FAILURE

<sup>1</sup>Osikov M.V., <sup>1</sup>Telesheva L.F., <sup>2</sup>Ageev Ju.I., <sup>3</sup>Nikushkina K. V., <sup>3</sup>Sumerkina V.A.

<sup>1</sup>Research and Education Center of Basic Medicine Issues, <sup>2</sup>Department of pathophysiology, <sup>3</sup>Central Research Laboratory of South Ural State Medical University, Russian Ministry of Health  
Chelyabinsk

The study investigates the processes of free-radical oxidation (FRO) in the blood and their relationship to the immune status changes in case of chronic renal failure (CRF) in the experiment on 24 non-linear rats. CRF model was created by a two-stage operative resection of 5/6 renal tissue. The amount of primary ( $E_{232}/E_{220}$ ), secondary ( $E_{278}/E_{220}$ ) and end ( $E_{400}/E_{220}$ ) products of lipid peroxidation (LPO) was evaluated in plasma and lymphocytes by extractive spectrophotometric method. The catalase and superoxide dismutase (SOD) activity was determined in serum. Plasma was found to accumulate primary and secondary products of lipid peroxidation in heptane and isopropanol fractions as well as to decrease the activity of SOD and catalase; amount of primary, secondary and end products of lipid peroxidation in isopropanol fraction of peripheral blood lymphocytes was increased. The amount of lipid peroxidation products in plasma increases with decreasing activity of SOD and catalase. The expression of Th1- and Th2-dependent immune response in CRF is reduced as lipid peroxidation products in lymphocytes are being accumulated.

*Keywords: immunity, chronic renal failure, free radical oxidation.*

## УРОВЕНЬ СПОНТАННОЙ И СТИМУЛИРОВАННОЙ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНОМ ЭКСПРЕССИИ CD69 НА Т-ЛИМФОЦИТАХ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Пашнина И. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Отдел клинической иммунологии, Областная детская клиническая больница,

<sup>2</sup>Лаборатория иммунологии воспаления, Институт иммунологии и физиологии УрО,  
Екатеринбург, Россия

Уровень экспрессии активационных маркеров лимфоцитов, таких как CD69, является индикатором состояния иммунной системы. Целью работы явилась оценка количества Т-лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> при стимуляции *in vitro* у детей с аутоиммунными заболеваниями соединительной ткани. Обследованы дети и подростки 6–17 лет с системной красной волчанкой (n=13), с ювенильной склеродермией (n=14), с идиопатическим ювенильным артритом (n=61), с реактивным артритом (n=11), а также здоровые дети соответствующего возраста (n=31). Методом проточной цитометрии выявлено, что после 4-х часовой инкубации (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) спонтанный уровень экспрессии CD69 на Т-клетках в исследованных группах не различался. При стимуляции фитогемагглютинином количество CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> во всех группах больных было значительно ниже контрольного уровня. Таким образом, стимуляция митогеном позволила выявить скрытый дефицит экспрессии CD69 при аутоиммунных заболеваниях и реактивном артрите.

**Ключевые слова:** экспрессия CD69, аутоиммунные заболевания.

**Введение.** Оценка экспрессии маркеров активации лимфоцитов является инструментом исследования состояния иммунной системы. Стимуляция поликлональными активаторами *in vitro* позволяет исследовать общую реактивность той или иной популяции клеток, и может быть использована как универсальный метод для исследования различных патологических процессов, независимо от их этиологии и патогенетических особенностей. Спонтанная экспрессия большинства активационных маркеров в норме не высока, или даже может отсутствовать [1], а при использовании стимуляции может быть выявлено снижение экспрессии исследуемой молекулы в ответ на стимулирующий сигнал. Так, в работе А. Lisowska и соавторов [2] не было зафиксировано различий между больными с хронической почечной патологией и здоровыми донорами по количеству Т-хелперов, экспрессировавших CD25, CD28, CD69, CD95 и HLA-DR, а при стимуляции антителами к CD3 у больных обнаружено снижение экспрессии CD25 и CD69 относительно контрольного уровня.

Наиболее удобными объектами исследования при стимуляции являются рецепторы лимфоцитов, экспрессия которых увеличивается за короткий промежуток времени, например, CD69. Это молекула ранней активации лимфоцитов, которая начинает экспрессироваться на мембране клетки спустя полчаса после взаимодействия с индуцирующим агентом, детекцию CD69 с помощью проточной цитометрии можно проводить уже через 4 часа [3]. CD69 является членом семейства лектиноподобных сигнальных рецепторов, его функции до сих пор четко не определены, но известно, что он играет роль в регулировании уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и может принимать участие в процессах выхода тимоцитов из тимуса и перемещения периферических Т-клеток [4].

Целью настоящей работы явилась оценка экспрессии CD69 на Т-лимфоцитах при стимуляции *in vitro* у детей с аутоиммунной патологией соединительной ткани.

**Материалы и методы.** Обследованы дети и подростки 6–17 лет с аутоиммунными заболеваниями в стадии активности: с системной

красной волчанкой (СКВ, n=13), с ювенильной склеродермией (ЮСД, n=14), с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, n=61), а также больные с реактивным артритом (РеА, n=11). В качестве группы сравнения (контрольной) обследован 31 условно здоровый ребенок (УЗД) без признаков наличия аутоиммунных заболеваний. Для оценки спонтанной и индуцированной экспрессии CD69 на Т-лимфоцитах образцы цельной периферической крови разводили глутамин-содержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия) в соотношении 1:9 и инкубировали в течение 4-х часов (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) без стимулятора и при стимуляции фитогемагглютинином (ФГА, Sigma) в конечной концентрации 20 мкг/мл. Подсчет количества CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> проведен методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA). Для анализа данных использовали унифицированный аппарат теории общих линейных моделей (GLM). Эффекты половой принадлежности и возраста обследованных детей оценивали в качестве ковариат; принадлежность к определенной исследуемой группе параметризовали как номинальную переменную, группа УЗД служила референтным уровнем. Для преобразования мультипликативных эффектов в аддитивные и стабилизации дисперсий для долей (процентов) использовали логит-преобразование, для абсолютного количества клеток – логарифмирование. Приведение в исходную шкалу ожидаемых значений и их 95% доверительных интервалов (95% ДИ) выполняли с помощью соответствующего обратного преобразования (антилогит- или потенцирование). Для апостериорных (post hoc) сравне-

ний использован критерий Тьюки для выборок не равного размера.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что возраст обследованных пациентов и половая принадлежность не были взаимосвязаны с уровнем спонтанной и стимулированной экспрессии CD69 на Т-лимфоцитах, а также с величиной индекса стимуляции у обследованных детей. Спонтанное количество CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> после 4-х часовой инкубации было невелико, во всех исследованных группах в среднем оно не превышало 5% и не различалось между собой (Таблица). После инкубации клеток с ФГА содержание Т-лимфоцитов, экспрессировавших CD69, было наиболее высоким у условно здоровых детей (Таблица). Эта группа значительно отличалась от всех групп больных. Индекс стимуляции также был наиболее высоким у УЗД, при сравнении с больными с СКВ различия были значимы (Таблица).

Поскольку во всех группах с аутоиммунными заболеваниями и с РеА количество CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> при инкубации с ФГА было ниже контрольных значений, можно заключить, что при аутоиммунной патологии наблюдался дефицит ответа Т-клеток на стимуляцию митогеном. Снижение экспрессии CD69 в ответ на различные стимулы у взрослых больных с СКВ, при отсутствии различий в спонтанном уровне экспрессии этого маркера, продемонстрировано в работах ряда авторов [5, 6]. Полученные нами данные свидетельствуют, что у детей с СКВ и с другой аутоиммунной патологией (ЮСД и ЮИА), наблюдается аналогичное снижение ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию ФГА по сравнению со здоровыми детьми соответствующего возраста. Количество CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> у больных с РеА после стимуляции

**Таблица** – Количество Т-лимфоцитов, экспрессировавших CD69 (% от CD3<sup>+</sup>) после 4-х часовой инкубации в спонтанном и стимулированном вариантах, и индексы стимуляции у детей в норме и при патологии

Группа	Спонтанный уровень			Стимуляция ФГА					
	CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>			CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>			Индекс стимуляции		
	М	95%ДИ		М	95%ДИ		М	95%ДИ	
СКВ	2,38	1,67	3,38	45,5*	30,1	61,9	17,1**	10,9	26,8
ЮСД	1,88	1,34	2,61	33,9**	17,5	55,3	18,1	9,5	34,4
ЮИА	1,43	1,22	1,68	49,4**	41,9	56,9	30,3	24,6	37,4
РеА	1,19	0,82	1,74	36,9**	22,5	54,2	25,5	15,8	41,0
УЗД	1,62	1,30	2,03	73,7	64,1	81,5	43,4	32,0	59,0

Примечания: М – среднее значение; 95%ДИ – 95% доверительный интервал; различия с группой УЗД: \* – p<0,05; \*\* – p<0,01.

митогеном также было ниже, чем в контрольной группе. То есть, реакция Т-лимфоцитов на стимуляцию при РеА, заболевании смешанного инфекционно-аутоиммунного генеза, была схожа с реакцией этих клеток при аутоиммунной патологии.

В ранних работах, посвященных роли CD69 в развитии и функционировании Т-клеток, указывалось на провоспалительное действие данного рецептора и его участие в процессах пролиферации Т-лимфоцитов [7, 8]. Однако в последнее время рядом авторов была высказана гипотеза о супрессорной роли Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD69, подтвержденная данными, полученными на экспериментальных животных [9, 10]. Принимая во внимание это предположение, можно сделать заключение, что стимуляция митогеном позволяет выявить скрытый дефицит экспрессии CD69, который может играть роль в нарушении толерантности к собственным антигенам. Следует отметить, что недостаточность экспрессии CD69 на Т-лимфоцитах становится очевидной только в условиях стимуляции, тогда как спонтанный уровень Т-клеток, экспрессировавших CD69, у обследованных больных с аутоиммунной патологией не отличался от контрольного.

Автор приносит искреннюю благодарность врачам ОДКБ№ 1 Козловой Е. С. и Скоробогатовой О. В. за подбор пациентов для исследования и с.н.с. Института экологии растений и животных УрО РАН Кшняеву И. А. за помощь в статистическом анализе данных.

## THE LEVEL OF SPONTANEOUS AND STIMULATED WITH PHYTOGEMAGGLUTININ CD69 EXPRESSION ON T-LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH AUTOIMMUNE DISEASES

<sup>1,2</sup>Pashnina I. A.

<sup>1</sup>Regional Children's Clinical Hospital №1, <sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch of the Russian Acad. Sci., Yekaterinburg, Russia

The level of expression of lymphocytes activation molecules like CD69 indicates immune system condition. The aim of present study was to investigate of the amount of the T-lymphocytes with phenotype CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> under stimulation in vitro in children with autoimmune diseases of connective tissue. Children and teenagers of 6–17 years old with systemic lupus erithematosus (n=13), with systemic sclerosis (n=14), with juvenile idiopathic arthritis (n=61), with reactive arthritis (n=14) and conditionally healthy children of corresponding age (n=31) were investigated. It was revealed by flow cytometry that the spontaneous level of CD69 expression on T-lymphocytes after 4 hours incubation was similar in investigated groups. The amount of CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> under stimulation with phytohemagglutinin in all groups of patients was lower than in healthy children. Thus the mitogen stimulation allowed to discover latent deficiency of CD69 expression in children with autoimmune diseases and reactive arthritis.

*Key words:* CD69 expression, autoimmune diseases.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В., Ярилин А. А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 352 с.
2. Lisowska K. A., Dębska-Ślizień A., Jasiulewicz A., Heleniak Z., Bryl E., Witkowski J. M. J. Clin. Immunol., 2012, 32, 189–200.
3. Simms P. E., Ellis T. M. Utility of Flow Cytometric Detection of CD69 Clinical and diagnostic laboratory immunology, 1996, 3, 3, 301–304.
4. Feng C., Woodside K. J., Vance B. A., El-Khoury D., Canelles M., Lee J., Gress R., Fowlkes B. J., Shores E. W., Love P. E. Int. Immunol., 2002, 14, 535–544.
5. Crispin J. C., Martinez A., de Pablo P., Velasquillo C., Alcocer-Varela J. Scand. J. Immunol., 1998, 48 (2), 196–200.
6. Baranda L., de la Fuente H., Layseca-Espinosa E., Portales-Perrez D., Nino-Moreno P., Valencia-Pacheco G., Abud-Mendoza C., Alcocer-Varela J., Gonzalez-Amaro R. Rheumatology, 2005, 44, 1507–1513.
7. Cebrian M., Yague E., Rincon M., Lopez-Botet M., De Landazuri M. O., Sanchez-Madrid F. J. Exp. Med., 1988, 168, 1621–1637.
8. Testi R., Phillips J. H., Lanier L. L. The Journal of Immunology, 1989, 143, 4, 1123–1128.
9. Esplugues E., Sancho D., Vega-Ramos J., Martínez-A C., Syrbe U., Hamann A., Engel P., Sánchez-Madrid F., Lauzurica P. J. Exp. Med., 2003, 197, 1093–1106.
10. Cruz-Adalia A., Jimenez-Borreguero L. J., Ramirez-Huesca M., Chico-Calero I., Barreiro O., Lopez-Conesa E., Fresno M., Sanchez-Madrid F., Martin P. Circulation, 2010, 122, 1396–1404.

## ЭКСПРЕССИЯ CD5 НА В-ЛИМФОЦИТАХ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ЮВЕНИЛЬНОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА

Пашнина И. А.<sup>1,2</sup>, Кшняев И. А.<sup>3</sup>, Козлова Е. С.<sup>1</sup>,  
Скоробогатова О. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Отдел клинической иммунологии, Областная детская клиническая больница № 1,

<sup>2</sup>Лаборатория иммунологии воспаления, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,

<sup>3</sup>Лаборатория экологической экспертизы, Институт экологии растений и животных УрО РАН, Россия, Екатеринбург

Оценка экспрессии CD5 на В-лимфоцитах в настоящее время признана диагностически значимой при многих аутоиммунных заболеваниях. Исследовано количество CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> у детей и подростков (6–17 лет) с различной активностью ювенильного идиопатического артрита. Обследованы 74 больных в стадии активности заболевания и 14 – с ремиссией, получавших болезнь-модифицирующую терапию, 12 детей со стойкой ремиссией, не получавших лечение, а также 32 условно здоровых ребенка (контроль). Методом проточной цитометрии выявлено увеличение количества CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> в среднем в 2,2 (95% ДИ 1,4–3,4) раза у больных, независимо от активности заболевания и приема лекарственных препаратов, по сравнению с контролем. То есть, развитие ремиссии и отмена медикаментозной терапии не приводили к заметному снижению экспрессии CD5 у пациентов с ювенильным идиопатическим артритом.

*Ключевые слова:* В-лимфоциты, ювенильный идиопатический артрит.

Роль В-лимфоцитов в патогенезе аутоиммунных заболеваний не вызывает сомнений, поскольку эти клетки являются продуцентами антител, в том числе имеющих специфичность к аутоантигенам. Однако при аутоиммунной патологии, в частности, при аутоиммунных поражениях суставов, далеко не всегда происходит изменение количества этих клеток. В работах ряда авторов указывается, что общее количество В-лимфоцитов ни при ревматоидном артрите (серонегативном и серопозитивном), ни при ювенильном идиопатическом артрите (ЮИА) не отличалось от контрольного уровня [1, 2]. Поэтому несомненный интерес представляет исследование субпопуляций В-лимфоцитов, экспрессирующих различные маркеры, участвующие в клеточной активации, костимуляции и адгезии. Одной из перспективных для исследования является субпопуляция В-лимфоцитов с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>. Трансмембранный гликопротеин CD5 экспрессируется частью В-клеток и участвует в ответе на антигенную стимуляцию, выживании и пролиферации [3]. Оценка числа CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клеток признана диагностически

значимой при многих аутоиммунных заболеваниях: системной красной волчанке, синдроме Шегрена, ревматоидном артрите, инсулиннезависимом диабете, миастении и т.д. [3].

Целью нашей работы явилось исследование количества В-лимфоцитов, экспрессировавших CD5, при различной активности ювенильного идиопатического артрита.

Обследованы дети и подростки 6–17 лет с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, n=100): 74 больных в стадии активности заболевания (ЮИА-а) и 14 пациентов в стадии ремиссии (медикаментозная ремиссия, ЮИА-р) получали болезнь-модифицирующую терапию (метотрексат и/или сульфасалазин и/или циклоспорин А) и нестероидные противовоспалительные средства по потребности; пациенты со стойкой ремиссией (12 детей) не принимали лекарственных препаратов (ремиссия, ЮИА-р). В качестве группы сравнения (контрольной) обследовано 32 условно здоровых ребенка (УЗД). Подсчет относительного и абсолютного количества CD19<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> проведен на проточном цитофлюориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA)

с использованием моноклональных антител и счетных частиц Flow-Count (Beckman Coulter, USA). Данные анализировали с помощью статистического аппарата теории общих линейных моделей (GLM). Для преобразования мультипликативных эффектов в аддитивные и стабилизации дисперсий для долей (процентов) использовали логит-преобразование, для абсолютного количества клеток – логарифмирование. Оценивали частные эффекты следующих предикторов: пол, возраст (в годах, предварительно центрирован средним), исследуемые группы параметризованы как категориальная переменная, причем УЗД служили референтным уровнем ( $b_0$ ). Для приведения в исходную шкалу ожидаемых значений и их 95% доверительных интервалов (95% ДИ), выполняли соответствующие обратное преобразование (антилогит- или потенцирование).

Согласно полученным результатам, абсолютное количество В-клеток (CD19<sup>+</sup>) клеток было выше у мальчиков в 1,31 (95%ДИ 1,03–1,67) раза. Как относительное, так и абсолютное количество В-клеток снижалось с возрастом в 1,02 (95%ДИ 1,01–1,04) раза и в 1,08 (95%ДИ 1,05–1,10) в год соответственно. Наблюдаемое снижение количества В-лимфоцитов с возрастом согласуется с литературными данными [4], хотя в некоторых литературных источниках [5] для возраста от 6 до 18 лет указываются общие нормативные значения. По относительному и абсолютному количеству В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>) между исследованными группами не обнаружено статистически значимых различий (Таблица), но контраст {ЮИА-а} – {ЮИА-мр, ЮИА-р, УЗД} признан значимым: для груп-

пы с активной стадией ЮИА получены в 1,65 (95%ДИ 1,08–2,50) и 1,55 (95%ДИ 1,07–2,25) раза более низкие оценки средних соответственно. Следует отметить, что в группе с активной стадией заболевания, в отличие от всех остальных групп, средние значения относительного и абсолютного количества CD19<sup>+</sup> были ниже нормативных значений, которые согласно [5] составляют: 12–22%; 0,3–0,5\*10<sup>3</sup>/мкл.

Обнаружено, что у больных с ЮИА, независимо от активности патологического процесса, относительное и абсолютное количество В-лимфоцитов с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> было повышено по сравнению с уровнем УЗД (Таблица). Таким образом, развитие ремиссии и отмена медикаментозной терапии не приводили к снижению экспрессии CD5. Это противоречит некоторым опубликованным данным [3], согласно которым при успешном лечении аутоиммунной патологии, исходно увеличенное число CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> снижается. Однако у обследованных детей с ЮИА изменения субпопуляционного состава В-клеток носили стойкий характер: – даже при длительной ремиссии не происходило его восстановления. Возможно, для снижения экспрессии CD5 на В-лимфоцитах необходим более продолжительный период времени. Вероятно и другое предположение: – повышенное количество В-лимфоцитов с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> у детей с ремиссией ЮИА свидетельствует о неполном выздоровлении. Для решения этого вопроса необходимо более длительное катамнестическое наблюдение.

Увеличение содержания CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> лимфоцитов сопровождается множеством различных аутоиммунных заболеваний [6, 7].

Таблица – Относительное и абсолютное количество CD19<sup>+</sup>лимфоцитов и CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>лимфоцитов у детей в норме и при различной активности ЮИА

Группа	CD19 <sup>+</sup>						CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup>					
	% от лимфоцитов			*10 <sup>3</sup> /мкл			% от CD19 <sup>+</sup>			*10 <sup>3</sup> /мкл		
	М	95%ДИ		М	95%ДИ		М	95%ДИ		М	95%ДИ	
ЮИА-а	10,5	9,0	12,3	0,27	0,23	0,32	33,6***	28,4	39,3	0,09***	0,07	0,10
ЮИА-мр	12,5	8,7	17,6	0,30	0,21	0,43	33,1**	22,1	46,3	0,09*	0,06	0,13
ЮИА-р	15,6	10,7	22,3	0,47	0,32	0,69	27,3*	17,1	40,7	0,12***	0,08	0,19
УЗД	14,4	11,4	18,0	0,34	0,27	0,43	12,5	9,0	17,1	0,04	0,03	0,05

Примечания: М – среднее значение; 95%ДИ – 95% доверительный интервал; различия с группой УЗД: \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001.

В соответствии с одной точкой зрения, клетки с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> являются В1-клетками, то есть не требуют кооперации с Т-лимфоцитами и способны к спонтанной секреции IgM, а при аутоиммунных нарушениях – к выработке аутоантител [3]. Существует альтернативное мнение, согласно которому рецептор CD5 может служить для характеристики В1-лимфоцитов у мышей, но не у человека, и что в последнем случае CD5-позитивные В-лимфоциты могут синтезировать высокий уровень IL10 и участвовать в супрессии иммунного ответа [8, 9, 10]. Принимая во внимание гипотезу о супрессорной функции CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, можно предположить, что повышение количества этих клеток при аутоиммунной патологии, в том числе выявленное и в нашей работе, носило компенсаторный характер: возможно, увеличение количества В-лимфоцитов, экспрессирующих CD5, происходит в противовес развитию аутоагрессии. Однако полученные данные не позволяют дискриминировать гипотезы о роли CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> лимфоцитов в качестве фактора развития или сдерживания аутоиммунного патологического процесса. Это делает необходимым мониторинг количества и исследование функциональных свойств этих клеток у больных на всех стадиях развития аутоиммунных заболеваний, начиная с максимально ранних.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corcione A., Ferlito F., Gattorno M., Gregorio A., Pistorio A., Gastaldi R., Gambini C., Martini A., Traggiai E., Pistoia V. *Arthritis Research & Therapy*, 2009, 11: R150.
2. Michelutti A., Gremese E., Morassi F., Petricca L., Arena V., Tolusso B., Alivernini S., Peluso G., Bosello S. L., Ferraccioli G. *Mol. Med.*, 2011, 17 (9–10), 901–909.
3. Зурочка А. В., Хайдуков С. В., Кудрявцев И. В., Черешнев В. А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. УрО РАН, Екатеринбург, 2013, 552.
4. Топтыгина А. П., Семикина Е. Л., Копыльцов Е. А., Алешкин В. А. *Медицинская иммунология*, 2012, 14, 4–5, 289–294.
5. Иммунология детского возраста: практическое руководство по детским болезням / под ред. А. Ю. Щербины, Е. Д. Пашанова. ИД ПРАКТИКА-М, Москва, 2006, 432.
6. Cantaert T., Doorenspleet M. E., FrancoSalinas G., Paramarta J. E., Klarenbeek P. L., Tiersma Y., van der Loos C. M., De Vries N., Tak P. P., Baeten D. L. *Arthritis & Rheumatism*, 2012, 64, 6, 1859–1868.
7. Furuzawa-Carballeda J., Hernández-Molina G., Lima G., Rivera-Vicencio Y., Férrez-Blando K., Llorente L. *Arthritis Research & Therapy*, 2013, 15: R68.
8. Berthelota J.– M., Jamin C., Amrouche K., Le Goffa B., Maugars Y., Youinou P. *Joint Bone Spine*, 2013, 80, 18–22.
9. Buc M. *Mediators of Inflammation*, 2013, Article ID 963748.
10. Garaud S., Dantec C. Le, de Mendoza A. R., Maheed R. A., Youinou P., Renaudineau Y. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009, 1173, 280–285.

## CD5 EXPRESSION ON B-LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH DIFFERENT ACTIVITY OF JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS

<sup>1,2</sup> Pashnina I. A., <sup>3</sup> Kshnyasev I. A., <sup>2</sup> Kozlova E. S., <sup>2</sup> Skorobogatova O. V.

<sup>1</sup>Regional Children's Clinical Hospital №1, <sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch of the Russian Acad. Sci., <sup>3</sup>Institute of Plants and Animals Ecology, Urals Branch of the Russian Acad. Sci., Yekaterinburg, Russia

The CD5 antigen expression on B-lymphocytes currently recognized as diagnostically significant in many autoimmune diseases. We analyzed by flow cytometry for CD5 expression within the B cell subpopulation from peripheral blood of children and teenagers (6–17 years old) with different activity of juvenile idiopathic arthritis: 74 with active arthritis and 14 with remission were treated with disease modifying therapy, 12 children with persistent remission and 32 apparently healthy children were without medications. The increase in 2,2 (95% CI 1,4–3,4) times in average number of CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> were revealed in patients, regardless of disease activity or medications. These results suggest that the development of remission and therapy cancellation did not lead to detectable decrease in the CD5 expression.

*Key words: B-lymphocytes, juvenile idiopathic arthritis.*

## ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА ДЕТЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ В РАМКАХ НАЦИОНАЛЬНОГО КАЛЕНДАРЯ ПРИВИВОК

Попов Е. А., Злакоманова О. Н., Москвичева М. Г.,  
Мезенцева Е. А.

*Научно-исследовательский институт иммунологии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава  
России, Челябинск, Россия*

Исследованы показатели иммунитета и защитных антител к дифтерии, коклюшу и столбняку у детей. Выявленные изменения поствакцинального иммунитета могут свидетельствовать о неэффективности вакцинопрофилактики и необходимости разработки мер по ее повышению.

**Введение.** Актуальность проблемы вакцинопрофилактики управляемых инфекций у детей обусловлена тем, что в течение последних десяти лет в Российской Федерации регистрируется рост первичной заболеваемости инфекционной патологией в 1,7 раза, увеличение первичного выхода на инвалидность, обусловленного инфекционными болезнями на 9,3%. Инвалидность у детей в 24% случаев является следствием инфекционных и паразитарных болезней, а в 14,6% случаев – результатом вирусных инфекций центральной нервной системы ([1]).

Инфекции остаются важнейшей проблемой здравоохранения. В условиях мегаполиса, с выраженными процессами миграции и скученностью населения, риск эпидемических вспышек инфекционных заболеваний чрезвычайно высок. Наиболее предрасположены к различным инфекциям дети, чья иммунная система находится в стадии формирования. Кроме того, нельзя игнорировать и влияние на динамику эпидемического процесса фактора «перемешивания» в организованных коллективах, который на всех этапах социальных изменений в жизни ребенка проявляется повышением риска заболевания. Иммунопрофилактика является единственным реальным средством, дефорсирующим инфекционную заболеваемость. Несмотря на высокий уровень охвата иммунизацией детей декретированных возрастов (по данным зарубежных авторов более 95%, а по нашим данным 88,5%), не у всех детей присутству-

ет напряженный поствакцинальный и постинфекционный иммунитет. Так по данным Роспотребнадзора по Челябинской области более 50% детей имели низкие уровни защитных антител ([2]).

**Целью** исследования явилось изучение параметров иммунной системы и уровня протективных специфических антител у детей, посещающих организованные коллективы города Челябинска.

**Материалы и методы.** На базе МБУЗ ДГКП № 8 г. Челябинска были обследованы 87 детей (из них 52 мальчика и 35 девочек) в возрасте от 2 до 5 лет, посещающие детские дошкольные образовательные учреждения. Средний возраст составил  $3,71 \pm 0,24$  года.

Вакцинальный статус детей, принимавших участие в исследовании, включал 3 вакцинации и 1 ревакцинацию АКДС – 95% детей, 3 вакцинации АКДС – 5% детей. Все 100% детей получили вакцины против кори и паротита. Исследование параметров иммунной системы и уровня протективных специфических антител проведено через год после вакцинации. Информированное согласие родителей на проведение иммунологического исследования у детей получено.

Для оценки напряженности противокорревого, противостолбнячного и противокклюшного иммунитета определяли титр антител методом твердофазного иммуноферментного анализа, с использованием наборов реагентов «Anti-Diphtheria» ToxidELISA, «Anti-Tetanus» ToxidELISA (производство фирмы

EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Германия), RIDASCREEN\* Bordetella IgG» (производство фирмы R-Biopharm AG, Германия). Оценка иммунного статуса детей осуществлялась методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител фирмы Beckman Coulter.

Интерпретация результатов осуществлялась в соответствии с Методическими указаниями МУ 3.1.1760-03 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета против управляемых инфекций (дифтерия, столбняк, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит)». Серопозитивными к дифтерии, столбняку и коклюшу считались лица, в сыворотке которых определялись специфические IgG-антитела. Охват прививками анализировали на основании истории развития ребенка или амбулаторной карты.

Полученные данные обработаны с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics v.19. Статистически были вычислены средняя арифметическая вариационного ряда ( $M$ ), ошибка средней арифметической ( $m$ ), среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ). О достоверности различий средних величин судили по  $t$ -критерию Стьюдента с использованием таблиц граничных значений по Вебер.

**Результаты.** По уровню напряженности поствакцинального постинфекционного иммунитета было выделены по три группы с высоким, средним и низким уровнем протективных антител.

**Дифтерия.** В группу с высокими титрами противодифтерийных антител вошли 17 детей, что составило 19,8%. Средняя концентрация защитных антител –  $1,445 \pm 0,073$  МЕ/мл, что обеспечивает данным детям долговременную поствакцинальную защиту.

Вторую группу составили 54 ребенка (62,8%) со средними показателями противодифтерийных антител  $0,461 \pm 0,04$  МЕ/мл, которым также рекомендован повторный серологический контроль.

В третью группу вошли 15 серонегативных по дифтерии детей (17,4%) с отсутствием защитных титров антител (средняя концентрация  $0,033 \pm 0,006$  МЕ/мл, т.е. ниже  $0,1$  МЕ/мл), что указывает на отсутствие поствакцинального иммунитета.

**Столбняк.** Первую группу составили 46 детей (53,5%), имевших высокий титр антител

(АТ >  $1,0$  МЕ/мл), что свидетельствует о долговременной поствакцинальной противостолбнячной защите. Средний уровень протективных антител –  $2,83 \pm 0,32$  МЕ/мл.

Во вторую группу включены 32 ребенка (37,2%) с уровнем протективных антистолбнячных антител  $0,673 \pm 0,04$  МЕ/мл, которым был рекомендован повторный серологический контроль.

В третью группу вошли 8 серонегативных по столбняку пациентов (9,3%) с отсутствием защитных титров антител (средняя концентрация  $0,054 \pm 0,01$  МЕ/мл, т.е. ниже  $0,1$  МЕ/мл), что говорит о неэффективном иммунном ответе на столбнячный анатоксин.

**Коклюш.** Высокий титр противокклюшных IgG со средним показателем  $169,1 \pm 10,3$  Ед/мл (больше  $100$  Ед/мл) регистрировался лишь у 7 детей, что составило 8,14% – первая группа.

Во вторую группу вошли 37 детей (43%) с величиной защитных антител  $41,5 \pm 3,8$  Ед/мл, которым был рекомендован повторный серологический контроль.

Самой многочисленной оказалась третья группа 42 ребенка (48,8%) не имевших защитных уровней IgG к коклюшу (средняя концентрация составила  $12,23 \pm 0,6$  Ед/мл), что свидетельствует о неэффективности противокклюшного поствакцинального иммунитета.

С позиции возможного эпидемиологического неблагополучия нами выделено 2 группы детей с отсутствием защитных титров антител к изучаемым инфекциям:

I группа – с титром противодифтерийных антител ниже  $0,1$  МЕ/мл (15 детей – 17,4%). Пациенты данной группы не имели протективного уровня не только противодифтерийных антител, но и противокклюшных антител (средний уровень составил  $22,72 \pm 8,55$  МЕ/мл). IgG к столбнячному анатоксину достигал защитного уровня ( $1,307 \pm 0,7$  МЕ/мл), однако был достоверно ниже, чем у детей с высокими и средними уровнями противодифтерийных АТ.

Оценивая показатели иммунного статуса пациентов с отсутствием протективных АТ к дифтерии следует отметить:

- увеличение абсолютного количества Т-лимфоцитов с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>;
- высокое содержание абсолютного и относительного количества В-лимфоцитов;
- снижение процента естественных киллеров (CD16<sup>+</sup>);

- достоверно более низкое содержание Т-клеток (CD3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>), чем у детей с защитными титрами АТ.
- низкое% соотношение Т-лимфоцитов с маркерами ранней активации на фоне роста относительного содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих HLA (поздняя активация).
- увеличение активности и индекса спонтанного НСТ-теста нейтрофилов

Характеризуя изменения параметров иммунной системы детей данной группы можно заключить, что наиболее вероятной причиной неэффективности поствакцинального иммунного ответа является дефицит НК-клеток, ответственных за ранние этапы антигенспецифического взаимодействия через продукцию ИНФ- $\gamma$  и активацию практически всех клеток врожденного и адаптивного иммунитета.

II группа – пациенты с титром противостолбнячных АТ ниже 0,1 МЕ/мл (8 детей – 9,3%). Все пациенты данной группы получили вакцинацию АКДС (3 вакцинации + 1 ревакцинация), однако не имели протективного уровня не только противостолбнячных АТ, но и противокклюшных антител (средний уровень составил  $14,42 \pm 2,29$  МЕ/мл). Ig G к дифтерийному анатоксину не достигал защитного уровня ( $0,21 \pm 0,08$  МЕ/мл), что могло обеспечить лишь кратковременную защиту, с обязательной ревакцинацией.

В иммунном статусе пациентов с отсутствием протективных АТ к столбняку выявлены следующие особенности:

- увеличение абсолютного количества Т-лимфоцитов с фенотипом CD45<sup>+</sup>3<sup>+</sup>;
- снижение иммунорегуляторного индекса,
- увеличение абсолютного количества ТНК-клеток;
- высокое содержание абсолютного количества В-лимфоцитов;
- снижение процента клеток, экспрессирующих рецепторы к ИЛ-2 (CD25<sup>+</sup>), что отражает низкий активационный потенциал Т-лимфоцитов;
- низкая фагоцитарная активность нейтрофилов, на фоне увеличения активности и индекса их спонтанного НСТ-теста.

Снижение иммунорегуляторного индекса у детей с отсутствием протективных IgG к столбняку, коклюшу и дифтерии свидетельствует о дисбалансе ведущих Т-клеточных субпопуляций (3), и может быть объяснено фактом падения экспрессии молекул главного комплекса

гистосовместимости II, а также функциональными сдвигами CD4<sup>+</sup> – Т-хелперных лимфоцитов, затрагивающими направленность цитокиновой продукции и соотношение Th1/Th2 (4).

На основании проведенного анализа напряженности поствакцинального иммунитета нами выделены группы детей различного уровня эпидемиологического риска. К группе высокого риска отнесены дети с отсутствием противодифтерийного, противокклюшного и противостолбнячного поствакцинального иммунитета, что составило 10% от всех обследованных детей. В целом, в соответствии с полученными нами данными, у 48,84% детей, посещающих организованные детские коллективы, вакцинированных в соответствии с Национальным календарем прививок, не достигнут планируемый уровень протективных антител, что свидетельствует о недостаточной эффективности вакцинопрофилактики. Непродуктивное антителообразование обусловлено, на наш взгляд, наличием изменений в исходных показателях иммунного статуса, что было продемонстрировано на примере иммунограмм пациентов с отсутствием защитных титров АТ. Нельзя также исключать и отрицательное влияние бактериальных и вирусных инфекций, присоединяющихся в поствакцинальном периоде.

Таким образом, большой удельный вес серонегативных детей, вакцинированных в рамках Национального календаря прививок, свидетельствует о необходимости оценки превакцинального иммунитета и разработке дифференцированных от уровня и характера риска мер по повышению продукции протективных антител, что позволит обеспечить клиническую результативность, а также эпидемиологическую и экономическую эффективность вакцинопрофилактики у детей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов А. А., Альбицкий В. Ю., Фаррахов А. З., Модестов А. А., Иванова А. А., Косова С. А. Особенности состояния здоровья детского населения Российской Федерации, тенденции его изменений. Общественное здоровье и здравоохранение 2012, 4,18-24.
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Челябинской области в 2012 году» под ред. А. И. Семенова 2013, 69-75.
3. Steinau M, Unger ER, Vernon SD, Jones JF, Rajeevan MS. Differential-display PCR of peripheral blood for biomarker discovery in chronic fatigue syndrome.

4. Varela-Calvino R, Skowera A, Arif S, Peakman M. Identification of a naturally processed cytotoxic CD8 T-cell epitope of coxsackievirus B4, presented by HLA-A2.1 and located in the PEVKEK region of the P2C nonstructural protein. *J. Virol* 2004 Dec; 78 (24).

## INDICATORS OF IMMUNITY OF CHILDREN VACCINATED IN A FRAMEWORK NATIONAL CALENDAR OF INOCULATIONS

Popov E. A., Zlakomanova O. N., Moskvicheva M. G.,  
Mezentseva E. A.

*Immunology research institute GBOU VPO YUUGM of Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia*

Summary. Investigated parameters of immunity and protective antibodies to diphtheria, tetanus and pertussis in children. Identified changes postvaccination immunity may indicate inefficiency of vaccination and the need to develop measures to improve its.

---

## ВОЗДЕЙСТВИЕ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ С ПОВЫШЕННОЙ ВЯЗКОСТЬЮ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН

Савочкина А. Ю., Савельева А. А., Маякова В. Б.,  
Орнер И. Ю., Мезенцева Е. А.

*ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России; кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии  
и клинической лабораторной диагностики; Россия, Челябинск*

Попадание семенной жидкости в женский репродуктивный тракт сопровождается многочисленными реакциями женского организма, в том числе со стороны иммунной системы. Повышенная вязкость эякулята распространена среди мужчин. В данном исследовании показано увеличение функциональной активности (лизосомальная активность и внутриклеточный кислородзависимый метоболизм) нейтрофилов, выделенных из периферической крови, под действием семенной жидкости с повышенной вязкостью по сравнению с группой нейтрофилов, инкубированных с семенной жидкостью, полученной от здоровых мужчин.

*Ключевые слова:* нейтрофилы, функциональная активность, семенная жидкость, вискозитация.

**Введение.** Согласно литературным данным встречаются разрозненные сведения по распространенности такой патологии как вискозитация среди бесплодных мужчин от 0,1% [6] до 52% [7]. Большинство исследователей обнаруживают данное отклонение примерно у 30% мужчин с нарушением фертильности. Однако авторы многих исследований сходятся во мнении, что повышенная вязкость эякулята является составным компонентом субфертильности в совокупности с другими нарушениями [2]. Семенная жидкость (СЖ) при попадании

в репродуктивный тракт женщин неизбежно взаимодействует с клеточными и гуморальными факторами. Установлено, что воздействие СЖ на компоненты урогенитальных секретов у женщин реализуется благодаря многофакторному влиянию. О воздействии на иммунологические компоненты свидетельствуют немногие публикации. [1] Подавляющее большинство иммунокомпетентных клеток цервикального и вагинального секретов – это нейтрофильные гранулоциты – 95% и более. Стоит отметить, что в секретах урогенитального тракта жен-

щин встречается большое число жизнеспособных функционально активных нейтрофилов, которые благодаря богатому рецепторному аппарату чутко реагируют на малейшие изменения в окружении. [3,4] Данные обстоятельства определили цель данной работы – оценить воздействие семенной жидкости с повышенной вязкостью на функциональные свойства нейтрофилов, выделенных из периферической крови женщин.

**Материалы и методы.** Проведена оценка функциональных свойств нейтрофилов, выделенных из периферической крови 24 здоровых женщин (средний возраст  $26,3 \pm 2,1$  года) в первую фазу менструального цикла, под действием семенной жидкости (СЖ) здоровых мужчин (заключение спермиологического анализа – нормозооспермия) и мужчин, семенная жидкость которых характеризуется повышенной вязкостью (средний возраст обследуемых мужчин  $27,4 \pm 3,5$  года), *in vitro*. Спермиологический анализ включал стандартные показатели согласно рекомендациям ВОЗ. Вязкость эякулята определялась по методу R. Hotchkiss. Отсутствие инфекций половых путей среди мужчин подтверждалось методом ПЦР в реальном времени. Исследуемыми показателями функциональных свойств нейтрофилов явились: лизосомальная и фагоцитарная актив-

ность, внутриклеточный кислородзависимый метаболизм данных клеток. В качестве контроля (группа 1) использовали взвесь нейтрофилов, выделенных из периферической крови и инкубированных с физиологическим раствором. Группа 2 представлена нейтрофилами, выделенными из периферической крови и инкубированными с СЖ здоровых мужчин, характеризующейся нормозооспермией. Группа 3 представлена нейтрофильными гранулоцитами, выделенными из периферической крови и инкубированными с СЖ с повышенной вязкостью. Данные анализировали с применением непараметрического метода U-критерий Манна-Уитни для расчета уровня значимости.

**Результаты и обсуждение.** Полученные результаты представлены в таблице 1. Лизосомальная активность нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из периферической крови, группы 2 выше на 56,5 усл.ед., чем в группе 1. При сравнении групп 2 и 3 установлено, что под действием СЖ с повышенной вязкостью увеличивается лизосомальная активность на 78 усл.ед., что выражается в изменении текучести и поляризации цитоплазматической мембраны нейтрофилов. При сравнении значений кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, выделенных из периферической крови, групп 1 и 2 статистически значимых различий

Таблица 1. Функциональная активность нейтрофилов, выделенных из периферической крови, под действием СЖ

Показатель \ Исследуемые группы, № группы		1 Контроль Медиана (LQ – UQ)	2 Под влиянием СЖ здоровых мужчин Медиана (LQ – UQ)	$p^{*}_{1-2}$	3 Под влиянием СЖ с повышенной вязкостью Медиана (LQ – UQ)	$p^{*}_{1-3}$ $p^{*}_{2-3}$
Лизосомальная активность, усл.ед.		316,5 [254,5;351,5]	260 [223; 282,5]	0,037	338 [290; 338]	>0,05 0,046
НСТ-тест спонтанный	Активность,%	25 [16,5;35]	17 [13; 32]	>0,05	38 [26; 38]	0,091 0,044
	Интенсивность, усл.ед.	0,29 [0,2; 0,37]	0,18 [0,14; 0,32]	>0,05	0,38 [0,26; 0,38]	>0,05 0,025
НСТ-тест индуцированный	Активность,%	24 [19; 36]	21 [10; 23]	>0,05	38 [26; 38]	0,038 0,028
	Интенсивность, усл.ед.	0,26 [0,21; 0,36]	0,21 [0,11; 0,29]	>0,05	0,38 [0,26; 0,38]	0,04 0,038
Фагоцитарная активность	Интенсивность фагоцитоза, усл.ед.	0,23 [0,16; 0,32]	0,07 [0,03; 0,08]	0,001	0,08 [0,06; 0,08]	0,001 >0,05
	Фагоцитарная активность,%	16 [14; 20,5]	6 [3; 7]	0,001	8 [4; 8]	0,001 >0,05
	Фагоцитарное число	1,36 [1,16; 1,55]	1,2 [1; 1,32]	0,044	1,14 [1; 1,14]	>0,05 >0,05

Примечание: p – различия между сравниваемыми группами

не выявлено. Однако при сравнении группы 3 с группами 1 и 2 обнаружено увеличение всех изучаемых показателей НСТ-теста. Увеличение НСТ-теста свидетельствует о готовности нейтрофилов к респираторному взрыву, что является обязательным, но не единственным условием для осуществления этими клетками защитных функций. При сравнении показателей фагоцитарной активности нейтрофилов группы 1 с группами 2 и 3 установлено снижение интенсивности фагоцитоза и фагоцитарной активности. Статистически значимое снижение фагоцитарного числа наблюдается только при сравнении группы 1 и 2. Возможно, значительное снижение показателей фагоцитоза связано с наличием компонентов, адсорбированных на эякулированных сперматозоидах, таких как скафферин и ингибитор пролиферации лимфоцитов. [5]

**Вывод.** Под действием семенной жидкости с повышенной вязкостью возрастает лизосомальная активность и внутриклеточный кислородзависимый метаболизм нейтрофилов, выделенных из периферической крови.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабаян А. А., Смольникова В. Ю., Николаева М. А., Степанова Е. О., Калинина Е. А. Влияние иммунорегуляторных свойств семенной плазмы на репродуктивную функцию женщин. Гинекология 2012, Т 4, 4, 80-82
2. Михайличенко В. В., Есипов А. С. Клиническая значимость повышенной вязкости эякулята. Проблемы репродукции 2000, 4, 48-53
3. Савочкина А. Ю. Иммунологические показатели в диагностике хронического цервицита и при его сочетании с хроническим эндометритом: дис. канд. мед. наук. Челябинск, 2006. 148 с.
4. Телешева Л. Ф. Иммунологические факторы секретов репродуктивного тракта женщин: дис. д-ра мед. наук. Челябинск, 2001. 41 с.
5. Хонина Н. А., Пасман Н. М., Черных Е. Р. Иммунная дисфункция при бесплодии неясного генеза (обзор литературы). Проблемы репродукции 2010, 1, 57-62
6. Dubin L., Amelar R.D. Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. Fertil Steril 1971, 22 (8), 469-474.
7. Munuce M. J., Bregni C., Carrizza C., Mendeluk G. Semen culture, leukocytospermia, and the presence of sperm antibodies in seminal hyperviscosity. Arch Androl 1999, 42 (1), 21-28

## EFFECT OF SEMINAL FLUID OF HIGHER VISCOSITY ON THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF NEUTROPHILS ISOLATED FROM PERIPHERAL BLOOD

Savochkina A. Y., Savelyeva A. A., Mayakova V. B., Orner I. Y., Mezentseva E. A.

*GBOU VPO YUUGM of Ministry of Health of Russia; chair of microbiology, virology, immunology and clinical laboratory diagnostics, Chelyabinsk, Russia*

Getting semen into the female reproductive tract is accompanied by numerous reactions of the female body, including on the part of the immune system. The increased viscosity of the ejaculate is common among men. This study showed an increase in the functional activity (lysosomal activity and intracellular metabolism of oxygen-dependent) of neutrophils isolated from peripheral blood, under the action seminal fluid with high viscosity as compared with a group of neutrophils incubated with semen obtained from healthy men.

*Keywords: neutrophils, functional activity, seed liquid, viskozopatiya.*

## РОЛЬ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА И ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА В РАЗВИТИИ ПАРОДОНТИТА

Саркисян Н. Г.<sup>1,2</sup>, Тузанкина И. А.<sup>1</sup>, Григорьева Ю. В.<sup>1</sup>, Мальчиков И. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, <sup>2</sup>ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрова России, <sup>3</sup>ФГУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций», Екатеринбург, Россия

В статье описано исследование 318 пациентов с пародонтитом и здоровым пародонтом у которых был проведен анализ слизистой полости рта на наличие простого герпеса и цитомегаловируса методом иммунофлюоресцентной микроскопии. Было выявлено, что у пациентов с пародонтитом наличие герпесвирусной инфекции в эпителии слизистой полости рта составил 31.3%, а у пациентов со здоровым пародонтом-51.6%. Цитомегаловирус в эпителии слизистой полости рта выявлен в равном количестве как у пациентов с пародонтитом, так и здоровым пародонтом.

**Ключевые слова:** хронический генерализованный пародонтит, герпес, цитомегаловирус.

**Введение.** Герпетическая инфекция – пожизненная оппортунистическая инфекция, которой заражены 90% населения мира. Простой герпес – вирусное заболевание, возникающее у людей обоего пола во всех возрастных группах. К 13-14 летнему возрасту уже 70–83% инфицированы вирусом простого герпеса. ДНК-содержащий дерматонейротропный вирус поражает слизистую оболочку. Иммунные механизмы организма сдерживают реактивацию вируса и предупреждают его клиническое проявление у иммунокомпromетированных пациентов [1,5].

Хронический пародонтит, обусловленный инфекционными факторами разной природы, возникает и протекает на фоне измененного иммунного статуса больных и нарушения местных механизмов иммунной защиты ротовой полости [2,4].

В настоящее время считается, что деструктивные процессы в пародонте связаны с патогенным действием относительно небольшой группы бактерий, среди которых наиболее заметными являются *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* [Григорьян А.С., 2004; Царев В.Н., 2002-2005; Шмагель К.В., 2004; Mombelli A., 2001; Bauermeister C.– D., 2003; Armitage G. C., 2004]. В зарубежной литературе представлены обширные данные о роли членов семейства *Herpesviridae* в развитии тяжелых форм пародонтита (Slots J. et al, 2003, 2004). Ак-

тивно обсуждается вопрос о влиянии вирусных инфекций в прогрессировании деструктивных процессов пародонта (Saygun I. et al, 2004). Выделение бактерий из пародонтального кармана сочетается с герпес – ассоциированным повреждением пародонта [Contreras A., 1996, 2000; Hung S-L, 2002; Kamra JJ, Slots J., 2003]. Механизмы неспецифической иммунологической резистентности в этом случае оказываются несостоятельными. Предполагается, что переход латентной фазы в активную вирусную инфекцию может приводить к транзиторной локальной иммуносупрессии и частично объяснять природу эпизодического прогрессирования деструктивных процессов в пародонте.

По мнению исследователей (3) основной иммунитет при простом герпесе клеточный, НК-клетки играют важную роль в противомикробной защите. Организм пораженного реагирует на липопротеины вируса, продуцируя цитотоксические Т-лимфоциты (CD8), а также Т-хелперы (CD4), активирующие В-лимфоциты с последующей продукцией специфических антител.

При носительстве цитомегаловируса формируется гуморальный и клеточный иммунитет, однако вирусонейтрализующие антитела не препятствуют сохранению вируса в организме [6].

Диагноз В00 Инфекции, вызванные вирусом простого герпеса по МКБ 10 ставят на основании анамнеза, клинической картины, лабо-

раторных методов диагностики. В настоящее время установлено участие бактериальной инфекции в разитии пародонтита. Роль вирусной инфекции в этиологии генерализованного пародонтита до настоящего времени в достаточной степени не установлена. В отечественной литературе отсутствуют данные о возможной локализации вирусов семейства *Herpesviridae* в пародонтальных карманах больных с различными формами пародонтита. Остается также открытым вопрос о характере изменений иммунного статуса больных пародонтитом при персистенции вирусов.

**Цель исследования.** Определение влияния бактериальной микрофлоры при пародонтите на активность герпес вирусной инфекции.

**Материалы и методы.** С целью определения наличия вируса в тканях слизистой полости рта проведено исследование в котором приняло участие 318 пациентов средний возраст которых составляет 46,7 лет из них 215 женщин и 103 мужчины. С диагнозом хронический генерализованный пародонтит легкой, средней, тяжелой, степени было выявлено 137 пациентов. При исследовании было определено, что 43,4% пациентов имели хронический генерализованный пародонтит, не имели патологию пародонта 56,6% обследованных.

С диагнозом хронический генерализованный пародонтит в стадии обострения выявлено 28,5%, в стадии ремиссии 71,5% пациентов. По степени тяжести определено, что пациентов с легкой степенью составило 20,0%, со средней степенью тяжести 57,3%, с тяжелой 22,7% пациентов.

Проведено комплексное стоматологическое обследование: заполнение амбулаторной карты формы 043У, сбор жалоб, анамнеза жизни, заболевания, осмотр с индексной оценкой гигиенического состояния полости рта. Лабораторная диагностика включала определение наличия представителей семейства *Herpesviridae* – вирус простого герпеса (ВПГ-1 типа) и цитомегаловируса (ЦМВ) путем флюорисцентного свечения. Эпителий щеки наносили на предметное стекло, фиксировали химическими соединениями и окрашивали, клетки приобретали характерный цвет и флюоресценцию оценивали с помощью микроскопа [5]. Анализ проводился в ФГУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций».

**Результаты и обсуждения.** В эпителии слизистой полости рта при анализе у пациен-

тов, выявлен вирус простого герпеса 1 типа в 29,2%, из всех обследованных, с наличием цитомегаловируса составили 4,4. Пациентов с заболеванием пародонта и наличием вируса простого герпеса в эпителии слизистой полости рта составило 31,3%. Пациенты, у которых был и пародонтит, и цитомегаловирус составили 1,8%, от всех обследованных пациентов. Пациенты с хронической формой пародонтита, у которых выявлено одновременно вирус простого герпеса и цитомегаловирус составил 1,6%. Пациенты со здоровым пародонтом составили 56,6% из них с наличием в эпителии слизистой полости рта вируса простого герпеса 1 типа 51,6%, с цитомегаловирусом- 4,4%.

Таким образом, в половине случаев вирус простого герпеса в эпителии слизистой полости рта выявлен у пациентов со здоровым пародонтом. При этом при наличии хронического генерализованного пародонтита вирус герпеса в эпителии слизистой полости рта выявлен только в 31,3%. Цитомегаловирус у пациентов со здоровым пародонтом определяли в 4,4%, так же как у пациентов с хроническим пародонтитом. Можно предположить, что несмотря на высокий процент заболеваемости герпесом, при наличии пародонтита в полости рта инфицирование вирусом герпеса снижается.

Вероятно, это обусловлено тем, что пародонтит поддерживает местную иммунологическую активность и является дополнительным барьером для внедрения вируса герпеса 1 типа. А для цитомегаловируса данный иммунологический ответ не является препятствием.

Исследование наводит на мысль взаимосвязи микрофлоры полости рта на активность внедрения герпесвирусной инфекции в эпителий слизистой оболочки. Необходимо более глубокое лабораторное изучение вопросов взаимодействия вируса герпеса и микрофлоры полости рта, что даст нам возможность ответить на многие вопросы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новикова Анна Сергеевна. Диагностика и лечение хронического генерализованного пародонтита, ассоциированного с цитомегало- и герпесвирусной инфекцией: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.00.21 / Новикова Анна Сергеевна; [Место защиты: ГОУВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет»]. – Москва, 2006. – 127 с.: ил.

2. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. Под редакцией А. С. Быкова, А. А. Воробьева, В. В. Зверева; Е. П. Пашков, А. В. Караулов, С. А. Быков, М. Я. Корн. – 2-изд. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 272с.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов/ Под редакцией А. А. Воробьева. – 2-изд., испр. и доп. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012. – 704с.: ил., табл.
4. Соболева Л. А., Булкина Н. В., Шульдяков А. А., Поспелов А. Н. Новый подход в терапии воспалительных заболеваний полости рта // Саратовский научно-медицинский журнал, Vol. 9, Issue 3, 2013, pp. 467-469
5. Dominguez A., Gomez., Garcia-Kass A. et al. IL-1beta, TNF-alpha, total antioxidative status and microbiological findings in chronic periodontitis treated with fluorescence-controlled Er:YAG laser radiation // Laser Surg. Med. 2010. – Vol. 42. – № 1. – P. 4-31.
6. Garlet G. P., Giozza S. P., Silveira E. M. et al. Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection // Clin. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 50. – № 3. – P. 11-18.

## THE ROLE OF HERPES SIMPLEX VIRUS AND CYTOMEGALOVIRUS IN THE DEVELOPMENT OF PERIODONTAL DISEASE

<sup>1,2</sup>Sarkisian N.G., <sup>1</sup>Tuzankina I.A., <sup>2</sup>Grigorieva J.V., <sup>3</sup>Malchikov I.A.,

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, <sup>2</sup>Ural State Medical University, <sup>3</sup>FSSI Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, Ekaterinburg

The article describes a clinical study of 318 patients suffering from periodontitis and with healthy parodontium. Mucous tunic of mouth of studied patients was tested for herpes simplex and cytomegalovirus by means of immunofluorescent assay. The results show that existence of a herpes virus infection in oral epithelium of periodontitis infected patients was 31.3%, whereas in case of healthy parodontium – 51.6%. Cytomegalovirus in oral epithelium is equal both in case of periodontitis and healthy parodontium.

*Keywords: chronic generalized periodontitis, herpes, cytomegalovirus.*

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ КЛЕТОК CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> И CD16<sup>+</sup> У ЖИТЕЛЕЙ ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРА В ВОЗРАСТЕ 19-40 ЛЕТ

Сергеева Т. Б.

*Лаборатория физиологии иммунокомпетентных клеток, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии природных адаптаций Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия*

Представляло интерес изучить уровень клеточно-опосредованной цитотоксической активности у жителей Европейского Севера в возрасте 19-40 лет. Среди лиц 19-40 лет, родившихся и проживающих в климато-географических экстремальных условиях Европейского Севера РФ наиболее распространен повышенный уровень содержания цитотоксических лимфоцитов в среднем до 57,33%; особенно у женщин – 63,04%. Полученные данные свидетельствуют об участии киллерной активности в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета у северян; хелперно-супрессорное соотношение контролируется концентрациями клеток CD16<sup>+</sup> (p<0,01).

*Ключевые слова:* Север, иммунный статус, цитотоксические клетки, киллерная активность.

Климатические условия на Севере являются для человека дискомфортными, социальные условия жизни во многом уступают тем, которые имеют люди, проживая в централь-

ных и южных регионах страны [1, 2]. Проблема адаптации человека к экстремальным условиям среды обитания до настоящего времени остаётся актуальной [3].

Высокая фоновая активность со стороны ряда иммунологических параметров у человека на Севере приводит, с одной стороны, к торможению возрастного развития иммунной системы, с другой к сокращению резервных возможностей регуляции иммунного гомеостаза [4, 5, 6].

Физиологическая роль цитотоксических клеток, их влияние на развитие иммунного ответа до сих пор остаётся спорным, а единичные сведения немногочисленны и противоречивы.

Адекватное хелперно-супрессорное соотношение является не только диагностическим, прогностическим, но и физиологическим показателем, уравнивающим активизацию и подавление иммунных реакций организма человека. Нет сведений о возможной иммуностимулирующей роли клеточно-опосредованной цитотоксичности. В последнее время стали появляться единичные сведения о механизмах, через которые ЦТЛ (цитотоксические лимфоциты) способны стимулировать клеточный и гуморальный иммунные ответы, влиять на содержание провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Представляло интерес изучить уровень клеточно-опосредованной цитотоксической активности у жителей Европейского Севера в возрасте 19-40 лет.

Проведено иммунологическое обследование 78 человек, жителей Европейского Севера, проживающих в п. Пинега Архангельской области и п. Несь Ненецкого автономного округа. Из них 47 женщин и 31 мужчина в возрасте от 19 до 40 лет. Все люди на момент иммунологического обследования были практически здоровы по данным медицинских карточек и заключению поселковых врачей-терапевтов.

Изучено содержание фенотипов лимфоцитов ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD16^+$ ) в периферической крови с помощью непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител (НПЦ «МедБиоСпектр», Москва) на препаратах лимфоцитов типа «высушенной капли».

Кровь для анализа иммунного статуса брали из локтевой вены в объеме 6 мл в 9–10 часов утра, натощак. Забор крови осуществляли в вакутайнеры с литий-гепарином

фирмы «IMPROVACUTER». Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием прикладных программ «Statistica 6.0» («StatSoft», США), «Microsoft Excel.7.» (США). Корреляционный анализ проводился с определением коэффициентов линейной корреляции Пирсона ( $r$ ).

Анализ показал, что уровень содержания Т-лимфоцитов хелперов/индукторов ( $CD4^+$ ) в среднем составил  $0,51 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л, что находится в пределах общепринятых физиологических норм, причем у женщин данный показатель выше, чем у мужчин ( $0,54 \pm 0,04$  и  $0,48 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л соответственно). Дефицит хелперов/индукторов ( $CD4^+$ ) встречался в 46,99% случаев, причем у женщин достоверно реже, чем у мужчин (соответственно 39,13% и 54,84% случаев,  $p < 0,001$ ). Повышенные значения указанного параметра встречались в 15,68% случаев, без достоверной разницы по полу (у женщин – 15,22% и у мужчин – 16,13%).

Средний уровень супрессоров/киллеров ( $CD8^+$ ) составляет  $0,51 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л, с достоверной разницей между женщинами и мужчинами (соответственно  $0,56 \pm 0,04$  и  $0,45 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л,  $p < 0,001$ ). Недостаточность в содержании клеток с рецепторами к  $CD8^+$  выявлена у 4,35% женщин и в 9,68% случаев у мужчин. Высокие уровни цитотоксических лимфоцитов  $CD8^+$  в среднем встречались у 57,33% обследуемых лиц, причем у женщин чаще, чем у мужчин (соответственно в 63,04% и 51,61%).

Уровень содержания Т-клеток естественных киллеров ( $CD16^+$ ) в среднем составляет  $0,51 \pm 0,04 \cdot 10^9$  кл/л. У женщин указанный показатель достоверно выше, чем у мужчин (соответственно  $0,56 \pm 0,03$  и  $0,45 \pm 0,04 \cdot 10^9$  кл/л,  $p < 0,001$ ). Пониженные уровни содержания естественных киллеров ( $CD16^+$ ) встречались в 12,36% случаев, причем у женщин достоверно реже (соответственно 2,13% и 22,58%,  $p < 0,05$ ). Повышенные значения указанного параметра встречались в 43,79% случаев, с достоверной разницей по полу (соответственно 55,32% и 32,26%;  $p < 0,01$ ).

Проведен корреляционный анализ между уровнями содержания цитотоксических клеток. Результаты корреляционного анализа показали наличие сильных взаимосвязей между клетками  $CD4^+/CD8^+$  ( $r=0,86$ ),  $CD4^+/CD16^+$  ( $r=0,76$ ) и  $CD8^+/CD16^+$  ( $r=0,72$ ),  $p < 0,001$ . Уме-

ренные и слабые корреляционные взаимосвязи выявлены не были.

Таким образом, среди лиц 19-40 лет, родившихся и проживающих в климато-географических экстремальных условиях Европейского Севера РФ наиболее распространен повышенный уровень содержания цитотоксических лимфоцитов в среднем до 57,33%; особенно у женщин – 63,04%.

Полученные данные свидетельствуют об участии киллерной активности в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета у северян; хелперно-супрессорное соотношение контролируется концентрациями клеток CD16<sup>+</sup> ( $p < 0,01$ ).

Работа поддержана грантом: № 12-4-5-025-Арктика УрО РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефремов А. А., Ткачев А. В. О существующих подходах к районированию северных территорий России // Материалы Всерос. конф. «Стратегия развития северных регионов России». Архангельск, 2003. С. 48-58.
2. Филиппова О. Е. Состояние иммунной защиты у жителей мегаполиса О. Е. Филиппова // Российский иммунологический журнал. – 2013 – С. 155.
3. Пашина Н. А. Физиологические особенности иммунного статуса коренного (малочисленного) населения Ямало-Ненецкого автономного округа: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н. А. Пашина – Надым, 2009.
4. Щёголева Л. С. Формирование иммунологической недостаточности человека на Севере: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л. С. Щёголева. – Архангельск, 1996. – 14 с.
5. Щёголева Л. С. Резервные возможности иммунного гомеостаза у человека на Севере / Л. С. Щёголева. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 207 с.
6. Добродеева Л. К. Регуляция метаболических процессов при сахарном диабете II типа / Под общей ред. Докт. Мед. Наук Л. К. Добродеевой. – Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. – 204 с.

### PHYSIOLOGICAL ROLE OF CAGES OF CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> AND CD16<sup>+</sup> AT INHABITANTS OF THE EUROPEAN NORTH AT THE AGE OF 19-40 YEARS

Sergeyeva T. B.

*Laboratory of physiology of immunocompetent cages, science Federal state budgetary institution  
Institute of physiology of natural adaptations of the Ural office of the Russian Academy of Sciences,  
Arkhangelsk, Russia*

It was interesting to study the level of cell-mediated cytotoxic activity among residents of the European North aged 19-40 years. Among those 19-40 years old, born and living in favorable climate-geographical extreme conditions of the European North of the Russian Federation is the most widespread and increased levels of cytotoxic lymphocytes in average up to 57,33%; especially in women – 63,04%. The obtained data testify to participation killer activity in the reactions of innate and adaptive immunity in northerners; helper-suppressor ratio is controlled by the concentration of cells CD16<sup>+</sup> ( $p < 0.01$ ).

*Keywords: North, immune status, cytotoxic cages, killerny activity.*

## ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ БТШ70 ЛЕЙКОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Сертакова О. В.<sup>1</sup>, Бахманова Е. Н.<sup>1</sup>, Стручков П. В.<sup>2</sup>, Балякин Ю. В.<sup>3</sup>,  
Хомякова Н. Ф.<sup>4</sup>, Родоман Г. В.<sup>1</sup>, Сапожников А. М.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «ГКБ№ 24 ДЗМ», <sup>2</sup>ФГБУЗ Клиническая больница № 85 ФМБА России, ФГБОУ ДПО ИПК ФМБА России, <sup>3</sup>ГБОУ ВПО РНИМУ им Н. И. Пирогова, <sup>4</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Ранее было показано, что внутриклеточное содержание БТШ70 в популяциях лейкоцитов периферической крови человека изменяется и отражает клиническую картину при протекании в организме человека патологических процессов, в частности у пациентов с острым инфарктом миокарда. Проведенное нами исследование было направлено на изучение возможной связи уровня экспрессии БТШ70 лейкоцитами периферической крови больных с колоректальным раком (КРР) с результатами лечения до и после хирургического удаления опухоли. Полученные результаты свидетельствуют о достоверной связи лейкоцитарного уровня БТШ70 с опухоленосительством и с хирургическим лечением. Оказалось, что больные с КРР характеризуются пониженным уровнем экспрессии БТШ70 лейкоцитами по сравнению с контрольной группой пациентов. Зарегистрированная динамика внутриклеточного содержания БТШ70 в лимфоцитах, моноцитах и гранулоцитах указывала на отчетливую тенденцию к послеоперационному восстановлению экспрессии этих протеинов клетками крови. Данные проведенных экспериментов указывают на существование неизученных механизмов реакции циркулирующих иммунокомпетентных клеток на развитие рака толстого кишечника и на проведение оперативной терапии этой опухоли.

**Введение.** Белками теплового шока (БТШ) называют обширную группу клеточных протеинов, синтез которых возрастает при стрессе. БТШ присутствуют во всех клетках и организмах, изученных на сегодняшний день, и обладают очень высоким уровнем гомологии, что свидетельствует о консервативности этих протеинов. Наряду с консервативностью структуры БТШ, разнообразие стрессирующих факторов, вызывающих индукцию экспрессии белков теплового шока, говорит об универсальности этого клеточного ответа на стресс. Важно отметить, что БТШ присутствуют в клетках, как в условиях стресса, так и в нормальных физиологических условиях, участвуя во многих внутриклеточных процессах в качестве так называемых шаперонов, т.е. молекул, обладающих сервисными функциями по отношению к другим протеинам. В частности, они участвуют в фолдинге синтезируемых полипептидов, ренатурируют другие белки, если они приняли неправильную конформацию, и способствуют

деградации необратимо денатурированных протеинов протеазами. Наряду с шаперонной активностью БТШ обладают протективными функциями, способствующими выживанию клеток в условиях воздействия не только высоких температур, но и иных повреждающих факторов, таких как воспаление, гипоксия, ишемия, токсины, свободные радикалы и др. [1, 2].

На сегодняшний день наиболее изученным является белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа – БТШ70. Его протективные функции продемонстрированы в целом ряде моделей *in vitro* и *in vivo*, а также у пациентов с различными патологиями. В частности, было показано, что БТШ70 защищает синаптические процессы в ЦНС, повышает устойчивость клеток организма к тепловому, болевому, психоэмоциональному стрессу, физической нагрузке, лихорадке, сепсису, эндо- и экзотоксинам [3]. В последние годы изучаются протективные свойства БТШ70 при повреждениях, вызванных ишемией и ре-

перфузией [4]. В настоящее время активно исследуются функции БТШ70 при различных состояниях и заболеваниях в кардиологии, а также выявляется взаимосвязь уровня экспрессии этого протеина с клинической картиной, продолжительностью болевого приступа, общим числом электрокардиографических отведений с патологическим Q, длительностью лейкоцитоза и максимальной активностью КФК [5]. Результаты исследований показали корреляцию между уровнем БТШ70 и стадией инфаркта миокарда.

Наряду с перечисленным выше, опубликованы многочисленные данные о повышенной экспрессии БТШ70 в раковых клетках при различных опухолевых заболеваниях человека, таких как рак груди [6], рак яичника [7], карцинома цервикального канала [8], рак легких [9] и другие виды рака. Авторы приведенных работ отмечают существенную значимость связи уровня экспрессии БТШ70 с выживаемостью пациентов.

Как и остальные белки данного семейства, БТШ70 до недавнего времени считался типично внутриклеточным протеином, но в последние годы было обнаружено, что разные типы клеток способны секретировать этот белок в окружающую среду. Было установлено, что циркулирующий в организме внеклеточный пул БТШ70 обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами [10]. Измерение уровня сывороточного БТШ70 оказалось очень важным для изучения патомеханизма сердечно-сосудистых болезней [4]. Ряд авторов рассматривает увеличение концентрации сывороточного БТШ70 как диагностический показатель у онкологических больных [12]. В работе Kocsis J. [13] была выявлена связь между повышением уровня БТШ70 в сыворотке периферической крови пациентов и стадией заболевания колоректальным раком.

Изложенное свидетельствует о том, что анализ связи до- и послеоперационной клинической картины онкологических заболеваний с уровнем экспрессии БТШ70 и изменениями уровня сывороточного пула этого протеина является новым предметом исследований, направленных на формирование достоверного прогноза результатов лечения и выживаемости пациентов. Целью работы было изучение связи уровня экспрессии БТШ70 лейкоцитами периферической крови больных с колоректальным раком (КРР) до и после хирур-

гического удаления опухоли. Наряду с этим, учитывая охарактеризованное нами ранее влияние кардиологических нарушений на содержание БТШ70 в мононуклеарах периферической крови человека [14], у пациентов, участвующих в исследовании, был проведен мониторинг электрокардиографической картины в до- и послеоперационный период.

**Материалы и методы исследования.** Обследовано 26 пациентов с колоректальным раком (КРР) 2–4 стадии, поступивших на плановое оперативное лечение в ГКБ № 24 г. Москвы. Из них женщин 12 (средний возраст 68 лет), мужчин 14 (средний возраст 72 года). Группу сравнения составили 20 доноров без колоректального рака. Из них женщин 9 (средний возраст 66 лет), мужчин 11 (средний возраст 70 лет). Забор крови проводился до операции и на 1-е, 7-е и 14-е сутки после операции из кубитальной вены. Фракции мононуклеаров и полиморфоядерных лейкоцитов периферической крови выделяли стандартным методом центрифугирования клеток в двойном градиенте плотности раствора фиколл-верографина. Изолированные клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 (“Sigma Aldrich”, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия), 2 mM L-глутамин (“Sigma Aldrich”, США).

Оценка внутриклеточного содержания БТШ70 осуществлялась после префиксации клеток 2% раствором параформальдегида в присутствии 0,5% Тритона X-100 в течение 30 минут при комнатной температуре и последующего окрашивания антителами с использованием PBS, дополненным 1% FCS и 0,1% Тритона X-100. Относительный уровень внутриклеточной концентрации БТШ70 определяли методом проточной цитофлуориметрии по средней интенсивности флуоресценции клеток в образцах, обработанных моноклональными антителами BRM22 (“Sigma Aldrich”, США) и вторыми ФИТЦ-мечеными антителами (“Sigma”, США). Все цитометрические измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACScan (“Becton Dickinson”, США). Анализировали не менее 10000 клеток в каждом образце. Обработку полученных данных проводили с помощью программы “Cell Quest” и WinMDI.

Были изучены особенности электрокардиограммы пациентов в 12-ти стандартных отведениях до операции, и на 1-е, 7-е и 14-е

сутки после операции. Регистрация электрокардиограммы до оперативного вмешательства производилась на двенадцатиканальном электрокардиографе «Bioset 9000» Normann, после операции применялся электрокардиограф Cardivit AT-1 Shiller

Результаты исследования и их обсуждение. Усредненные по группам онкологических и неонкологических больных результаты проточно-цитометрического анализа (табл. 1) свидетельствовали о том, что перед проведением операции содержание БТШ70 в клетках периферической крови пациентов с колоректальным раком было существенно ниже по сравнению с группой контроля. Среди включенных в исследование 26 пациентов, у 6 пациентов были выявлены метастазы в печень. Однако, достоверных различий в уровнях экспрессии БТШ70 в клетках пациентов с метастазами и без них не наблюдалось. На первые сутки после операции уровень внутриклеточного содержания БТШ70 был незначительно понижен по сравнению с дооперационным значением этого параметра. То есть удаление опухоли и стрессорное воздействие (оперативное вмешательство) не приводило к повышению уровня экспрессии БТШ70 лейкоцитами периферической крови. На 14 сутки у пациентов с отсутствием метастазов, было обнаружено достоверное повышение уровня БТШ70 во всех типах клеток; особенно большие изменения наблюдались в мононуклеарах. Это сопровождалось увеличением количества мононуклеаров в клиническом анализе крови. У пациентов с метастазами восстановление экспрессии БТШ 70 не наблюдалось.

Зарегистрированное в наших экспериментах пониженное содержание БТШ70 в клетках периферической крови онкологических пациентов по сравнению с группой контроля может быть связано с выбросом цитоплазматического пула этих белков в межклеточное пространство. Действительно, в работе Kocsis et al. [13] было продемонстрировано повышенное предоперационное содержание внеклеточной формы БТШ70 в сыворотке крови больных КРР, что может отражать усиление секреции лейкоцитами крови. В то же время, пониженный уровень экспрессии БТШ70 клетками крови онкологических больных может быть обусловлен недостаточностью внутриклеточных синтетических процессов, которая может быть следствием истощения адаптационных механизмов, вызванного продолжительным

воздействием стресса. Роль стрессового воздействия в условиях данного эксперимента может играть присутствие раковой опухоли.

Причины продемонстрированного нашими результатами отсутствия ожидаемого стрессиндуцированного (обусловленного хирургическим вмешательством) роста содержания БТШ70 в лейкоцитах пациентов на первые сутки после операции остаются пока непонятными. Однако эти данные согласуются с парадоксальной реакцией лимфоцитов на стресс, которая выражалась в снижении уровня БТШ70 в ответ на окислительный стресс и была описана у больных инфарктом миокарда на 7-е сутки заболевания [14].

В отличие от трудной интерпретации результатов проточно-цитометрических измерений уровня экспрессии БТШ70 у больных на первые сутки после операции, достоверный рост этого показателя (наиболее выраженный у мононуклеаров) на 14 сутки после удаления опухоли можно объяснить ожидаемой нормализацией экспрессии БТШ70 и снижением интенсивности секреции данного протеина лейкоцитами в отсутствие опухолевого роста. В пользу такого объяснения свидетельствуют литературные данные об уменьшении размера сывороточного пула БТШ70 у больных КРР, наблюдающегося после успешного противоопухолевого хирургического вмешательства [13].

Таким образом, наши результаты, полученные в данных экспериментах, указывают на то, что анализ уровня БТШ70 в клетках периферической крови онкологических больных, может иметь прогностический характер. Наряду с этим, изложенные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения механизмов взаимосвязи экспрессии БТШ70 циркулирующими в организме лейкоцитами с клинической картиной развития онкологических заболеваний, последствия проведения терапии и с рисками возникновения послеоперационных осложнений.

Кроме описанных выше проточно-цитометрических измерений внутриклеточного содержания БТШ70 в нашем исследовании были проанализированы электрокардиограммы у контрольной группы и ЭКГ группы сравнения до оперативного лечения (итого 46 пациентов) с учетом следующих характеристик: амплитуды зубцов P, Q, R, S, T, отклонения ST от изолинии, а также длительность P, PQ, QRS, QT. Результаты, полученные до проведения опе-

рации, представлены в таблице 2. Усредненные данные по группам онкологических и неонкологических больных свидетельствуют о том, что амплитуда зубцов P2 (V1), R (V3), T (III) была выше у пациентов с колоректальным раком. В отведениях I, aVR, V5, V6 у этих больных наблюдалось снижение амплитуды зубца P1. В данной группе наблюдалось также уменьшение длительности зубцов: P1 в отведениях aVR, V5, V6; P2 в отведении V1; S в отведении V2; интервала QT в отведении III, aVR, aVL и интервала P-R в отведении I, V5, V6.

Анализ послеоперационных изменений параметров ЭКГ показал, что у 24 пациентов с колоректальным раком изменений электрокардиографической картины на первые сутки после оперативного лечения и в последующие сроки не наблюдалось. Тем не менее у двух больных из группы 26 пациентов с КРР были отмечены существенные отличия от общей картины по некоторым регистрируемым параметрам. Так, на первые сутки после операции, у одного пациента (женщина) в отведениях V1, V2, V3 наблюдалось появление отрицательного T, которое было интерпретировано как снижение кровоснабжения. Депрессии ST не отмечалось. У данной пациентки электрокардиографическая картина нормализовалась к третьим суткам. Следует отметить, что на первые сутки после операции, у этой пациентки наблюдалось снижение экспрессии БТШ70 во всех популяциях лейкоцитов. На 7-е сутки уровень внутриклеточных БТШ70 оставался без изменений. И только к 14 суткам у данной больной произошло заметное повышение внутриклеточного содержания лейкоцитарного БТШ70, т.е. приближение данного параметра к контрольным значениям. У другого пациента (мужчина) ЭКГ на вторые сутки после операции имела отрицательную динамику: появилась косонисходящая депрессия ST, отрицательный T в отведении V1, V2, V3, V4. Электрокардиографическая картина была

инфарктоподобной, однако отсутствовала клиническая картина инфаркта миокарда и отсутствовали лабораторно-инструментальные признаки течения инфаркта миокарда. Нормализация «застывшей» электрокардиограммы произошла у этого больного лишь на 12 сутки. Интересно, что в отличие от остальных прооперированных больных, уровень экспрессии БТШ70 в лейкоцитах периферической крови данного пациента характеризовался значительным снижением на 7 и 14 сутки, т.е. в указанные сроки отсутствовала тенденция к восстановлению этого параметра.

Результаты нашего исследования доказывают, что течение онкологического процесса вызывает определенные изменения некоторых электрокардиографических показателей. Описанная связь между зарегистрированными отклонениями послеоперационной электрокардиографической картины у двух пациентов с отличиями по наблюдаемой послеоперационной динамике внутриклеточного содержания БТШ70 в лейкоцитах периферической крови вызывает значительный интерес (особенно для случая пациента с инфарктоподобной электрокардиографической картиной, но без лабораторно-инструментальных признаков инфаркта миокарда). Это связано с тем, что в наших предыдущих исследованиях подобные изменения уровня экспрессии БТШ70 мононуклеарами периферической крови были выявлены у больных, поступивших в клинику с диагнозом острый Q-образующий инфаркт миокарда [14]. Мы предполагаем, что указанная аналогия может отражать пока еще неизученные универсальные механизмы взаимосвязи внутриклеточных изменений в циркулирующих лейкоцитах периферической крови с течением онкологических и кардиологических заболеваний. Дальнейшее изучение указанной проблемы может привести к расширению существующих представлений о реакциях иммунной системы, в частности иммуноком-

Таблица 1. Динамика содержания БТШ70 в популяциях лейкоцитов периферической крови прооперированных больных с колоректальным раком.

Относительный уровень экспрессии БТШ 70 клетками крови пациентов без метастазов (в % от уровня в контрольной группе).			
	до операции	1 сутки после операции	14 сутки после операции.
нейтрофилы	66,4±24,1	54,3±18,9	78,3±13,2
моноциты	56,7±22,4	49,4±28,4	93,5±12,9
лимфоциты	75,8±14,3	71,4±26,3	84,3±11,3

Таблица 2. Результаты анализа электрокардиограмм, полученных в разных группах пациентов.

Параметры ЭКГ	Отведения	Неонкологические пациенты Медиана	Онкологические пациенты Медиана	P<0,05
P1a (мВ)	I a	0,065	0,05	0,049
	VR	-0,07	-0,05	0,042
	V5	0,05	0,03	0,017
	V6	0,05	0,035	0,007
P2a (мВ)	V1	-0,01	0,01	0,019
Ra (мВ)	V3	0,63	0,89	0,022
T1a (мВ)	III	-0,02	0,05	0,004
	aVL	0,07	0,03	
QT (мс)	III	376	359	0,017
	aVR	391	367	0,035
	aVL	374	355	0,029
P1d (мс)	aVR	116	106	0,03
	V5	109	102	0,014
	V6	108	103	0,023
P2d (мс)	V1	48	0,0	0,043
Sd (мс)	V2	56	49	0,044
P-R (мс)	I	155	148	0,049
	V5	159	147	0,048
	V6	156	146	0,022

петентных клеток крови, на патологические процессы различной этиологии и с различной локализацией в организме человека.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lindquist S, Craig EA The heat-shock proteins *Annu Rev Genet* 1988, 22:316-377.
- Маргулис Б. А., Гужова И. В. Белки стресса в эукариотической клетке.// *Цитология* 2000, т. 42 № 4 стр. 323-342.
- Пастухов Ю. Ф., Екимова И. В. Молекулярные, клеточные и системные механизмы протективной функции белка теплового шока 70 кДа.// *Молекулярная и клеточная нейробиология*, 2005 № 2 стр. 3-18
- Williams R. S., Benjamin I. J. Protective responses in the ischemic myocardium// *J. Clin. Invest.* -2000.-№ 106.- P. 426-433.
- Ивашкин В. Т., Драпкина О. М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. 2011 Москва Гэотар – Медиа стр.120-173.
- Takahashi S., Miakami T., Watanabe Y., Okazaki M. et al. Correlation of heat shock protein 70 expression with estrogen receptor levels in invasive human breast cancer. // *Am J. Clin. Pathol.* 101 (4):519.
- Elpek G. O., Karaveli S., Simsek T. et al. Expression of heat shock proteins hsp 27, hsp 70 and hsp 90 in malignant epithelial tumor of the ovaries.// *Arpmis*, 2003. 111 (4):523.
- Park C. S., Joo I. S., Song S. Y. et al. An immunohistochemical analysis of heat shock protein 70, p53, and estrogen receptor status in carcinoma of the uterine cervix.// *Gynecol. Oncol.*, 1999.-74 (1):53.
- Zhong L., Peng X., Hidalgo G. E. et al. Antibodies to HSP70 and HSP90 in serum in non-small cell lung cancer patients.// *Cancer Detect Prev.* -2003.-27 (4):285
- De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the stress observation system: a form of communication during injury, infection, and cell damage. *Cell Stress and Chaperones* (2011) 16:235-249.
- Pockley A. G., Georgiades A., Thulin T, et al. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension.// *Hypertension*, 2003, 42 (3):235-238
- Abe M., Manola J. B., Oh W. K. et al. Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer.// *Clin. Prostate Cancer* 2004. -3 (1):49
- Kocsis J., Madaras B., Katalin Toth E., et al. Serum level of soluble 70 kD heat shock protein in associated with high mortality in patient with colorectal cancer without distant metastasis// *Cell Stress and Chaperones* 2010. - 15:143-151
- Константинова Е. В., Хомякова Н. Ф., Константинова Н. А., Подколзина А. В., Сапожников А. М. Взаимосвязь апоптоза и экспрессии белков теплового шока у лимфоцитов периферической крови больных инфарктом миокарда. *Бюлл. экспер. биологии и медицины*, 2010, т. 150, № 12, с. 622-626

## SOME FEATURES OF KINETICS OF HSP70 EXPRESSION IN LEUKOCYTES FROM PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

<sup>1</sup>Sertakova O.V., <sup>1</sup>Bachmanova E.N., <sup>2</sup>Struchkov P.V., <sup>3</sup>Balyakin Yu.V., <sup>4</sup>Khomyakova N.F.,  
<sup>1</sup>Rodoman G.V., <sup>4</sup>Sapozhnikov A. M.

<sup>1</sup>24th City Hospital, <sup>2</sup>85th Clinical Hospital FMBA of Russia; <sup>3</sup>N.I.Pirogov State Russian Medical University,  
<sup>4</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

It was shown previously that intracellular content of HSP70 in leukocytes of human peripheral blood varied and reflected the clinical finding during some diseases, in particular for patients with acute myocardial infarction. Our study was aimed at analysis of possible relationship of level of HSP70 expression in peripheral blood leukocytes of patients with colorectal cancer before and after surgical removal of the tumor. The results demonstrated a significant dependence of the leukocyte level of HSP70 on presence of the tumor and on the surgical operation. It was revealed that the patients with colorectal cancer had a lower intracellular content of HSP70 in leukocytes as compared with patients without the cancer. Registered kinetics of intracellular level of HSP70 in lymphocytes, monocytes and neutrophils indicated a distinct tendency toward postoperative recovery of the protein expression. The experimental data suggest existence of some unknown mechanisms of reactions of circulating immunocompetent cells on colorectal cancer and on the surgical therapy.

## ОПЫТ ИЗМЕРЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОГО СТАТУСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 5-ЦВЕТНОГО АНАЛИЗА

Субботовская А. И.<sup>1</sup>, Кудрявцев И. В.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения  
имени академика Е. Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск;

<sup>2</sup>ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

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

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, многоцветный анализ, иммунофенотипирование лимфоцитов.

**Введение.** В настоящее время метод проточной цитометрии широко применяется для анализа клеточного состава периферической крови. Существенными преимуществами данного метода перед микроскопией являются высокая скорость и точность проводимых ис-

следований, а также статистическая достоверность получаемых результатов. Вместе с тем существуют некоторые трудности, связанные с правильностью настройки проточного цитометра, что в конечном итоге существенно влияет на получаемые результаты. С каждым годом все больше лабораторий, проводящих исследование иммунного статуса, оснащаются современными приборами, способными одновременно детектировать пять и более флуоресцентных сигналов. Безусловно, с увеличением количества используемых флуорохромов требуется увеличение квалификации персонала, проводящего исследование. Столь же актуальным является разработка стандартных подходов для решения задачи по оценке иммунного статуса и стандартизации данных исследований [1]. В понятие оценки иммунного статуса включено определение абсолютного и относительного количества Т-клеток ( $CD3^+CD19^-$ ), Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ), цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+$ ), В-клеток ( $CD3^-CD19^+$ ), НК-клеток ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ) и НКТ-клеток ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ). Каждая лаборатория выбирает для себя свой способ измерения указанных параметров, однако отмечается общая тенденция к использованию многоцветного анализа. Вместе с тем, в нашей стране самыми распространенными остаются проточные цитофлуориметры, предназначенные для определения пяти или шести флуоресцентных красителей одновременно. В связи с этим целью нашей работы было разработать и адаптировать панель для оценки иммунного статуса с использованием 5-цветного анализа.

**Материалы и методы.** В рамках проведения данного исследования использовали периферическую кровь условно здоровых доноров, полученную путем пункции локтевой вены. 50 мкл цельной ЭДТА-стабилизированной крови окрашивали следующими моноклональными антителами (все антитела производства Beckman Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя: CD45-FITC (кат. № A07782), CD16-PE (кат. № A07766), CD56-PE (кат. № A07788), CD4-ECD (кат. № 6604727), CD19-ECD (кат. № A07770), CD8-PC5.5 (кат. № A07758), CD3-PC7 (кат. № 737657). После внесения антител образцы тщательно перемешивали, затем инкубировали при комнатной температуре 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации при постоянном перемешивании добавляли 500 мкл ли-

зирующего раствора VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США), инкубировали еще 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Анализ образцов проводили на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов набирала не менее 5000 лимфоцитов.

Для настройки напряжения по каналам флуоресценции использовали образцы крови, окрашенные каждым из антител по отдельности. Напряжение по FITC – флуорохрому, с которым были конъюгированы антитела против CD45 – выставляли так, чтобы лимфоциты, обладающие самой высокой среди всех лейкоцитов периферической крови плотность CD45 на своей поверхности, находились по центру третьей декады логарифмической шкалы (рис. 1, А). Напряжение выставляли таким образом, чтобы популяции лимфоцитов, не связанные то или иное антитело, находились ровно по центру первой декады логарифмической шкалы (рис. 1, Б-Д). По завершении настройки напряжения на каналах флуоресценции проводили настройку цветовой компенсации. Для данной процедуры также использовали указанные выше образцы периферической крови, окрашенные каждым из антител по отдельности, и частицы Flow Set Pro (кат. № A63492, Beckman Coulter, США). Настройку проводили в автоматическом режиме с использованием приложения «AutoSetup Application Definition...» программного обеспечения Navios™ Software v1.2. Проверку корректности настройки параметров цветовой компенсации осуществляли по образцам периферической крови условно здоровых доноров и реагентам Immuno-Trol Cells (кат. № 6607077, Beckman Coulter, США), окрашенными всеми антителами одновременно. Анализ полученные результатов проводили при помощи программного обеспечения Navios™ Software v1.2 и Kaluza™ v1.2 (Beckman Coulter, США).

**Результаты и обсуждение.** Анализ образца периферической крови всегда начинается с обнаружения и выделения популяции клеток, которая в дальнейшем будет подвергаться детальному анализу. В случае исследования «иммунного статуса» такой популяцией являются лимфоциты. В соответствии с международными рекомендациями по клеточному анализу для более точного и воспроизводимого выделения лимфоидных клеток применяются антитела против CD45, получившего в литература

название «пан-лейкоцитарного» маркера [2]. Применение подобного подхода позволяет с высокой точностью идентифицировать лимфоциты вне зависимости от качества лизирования эритроцитов в образце крови. При этом выделение популяции лимфоцитов происходит в два этапа. В рамках первого этапа при помощи двух-параметрической гистограммы распределения клеток по боковому светорассеянию и уровню экспрессии CD45 (рис. 1, Е) необходимо выделить клетки с высоким уровнем экспрессии CD45 и низкими значениями бокового светорассеяния (рис. 1, Е, область «CD45+++»). На втором этапе также при помощи двух-параметрической гистограммы распределения клеток по прямому и боковому светорассеянию, на которой отображены клетки, отвечающие условиям области «CD45+++» предыдущей гистограммы, следует выделить популяцию клеток с низкими значениями по этим двум параметрам (рис. 1, Ж, область «лимфоциты»). При этом особое внимание следует уделить тому, что в области «лимфоциты» должно находиться на менее 95% всех клеток, определяемых при помощи данной гистограммы [3]. Если этих значений достигнуть не удалось, то следует проверить корректность выделения области «CD45+++». Применение антител против CD45 требует использования одного из каналов флуоресценции, при выборе которого следует учитывать несколько обстоятельств. Во-первых, флуорохром, с которым конъюгированы антитела, должен обладать минимальной засветкой в другие каналы для детекции флуоресценции от других флуорохромов. Во-вторых, данный флуорохром не должен быть очень ярким, так как уровень экспрессии молекулы CD45 крайне высок – до 200000 молекул на клетке [4]. В случае такого проточного цитофлуориметра как Cytomics™ FC 500 или Navios™ (при использовании в работе только лазера с длиной волны 488 нм) этим условиям отвечают каналы для регистрации флуоресценции и флуорохромы ФИТЦ, который был выбран нами в качестве примера, и PC7. Причем последний был использован нами для другой молекулы с высоким уровнем экспрессии – CD3, плотность которой достигает 124000 копий на поверхности Т-лимфоцита [5].

После того, как популяция клеток интереса – лимфоцитов – получена, имеет смысл переходить к ее анализу. Как уже отмечалось

выше, на качество анализа или чистоту выделения популяций лимфоцитов существенное влияние может оказывать выбор флуорохромов, с которыми конъюгированы антитела. На сайтах производителей антител и в зарубежной литературе приведены основные принципы формирования панелей для исследований [6, 7], на основании которых и была сформирована приводимая в данной статье комбинация антител. Во-первых, антитела для «пан-лейкоцитарных» маркеров (CD45) и маркеров, применяемых для выделения отдельных субпопуляций клеток (CD3), были конъюгированы с флуорохромами (ФИТЦ и PC7, соответственно), которые не обладают выраженной засветкой на остальные каналы флуоресценции, то есть коэффициенты компенсации минимальны (рис. 1, З). Во-вторых, пары взаимоисключающих маркеров, ко-экспрессия которых в норме на клетках не наблюдается или крайне редка (например, CD56 и CD19, CD19 и CD8 или CD4 и CD8), помещены на соседние каналы с сильной перекрестной засветкой (PE и ECD, ECD и PC5.5 или ECD и PC5.5). Соблюдение этих двух принципов формирования комбинаций антител для анализа позволяют существенно упростить как настройку цветовой компенсации, так и дальнейший контроль за стабильностью данных параметров настройки прибора при проведении серий исследований.

Для выделения основных популяций лимфоцитов периферической крови был использован следующий алгоритм («тактика гейтирования»), основанный на использовании двухпараметрических гистограмм «флуоресценция-против-флуоресценции» (рис. 2). В первую очередь была построена диаграмма, где по оси абсцисс приведена флуоресценция антител против CD3, а по оси ординат – флуоресценция антител против CD19 и CD4 (рис. 2, А). Использование данной гистограммы позволяет идентифицировать популяции В-лимфоцитов как негативные по экспрессии CD3, но позитивные по CD4<sup>+</sup>19 клетки (8,29% от общего числа лимфоцитов в приведенном примере исследования), а также популяцию Т-хелперов как дважды позитивные клетки (43,26% от общего числа лимфоцитов). Использование антител против поверхностных антигенов, характерных для разных популяций клеток (никогда не ко-экспрессирующихся ни в норме, ни при патологических состояниях – CD4 для Т-хелперов

и CD19 для В-лимфоцитов), но конъюгированных с одним и тем же флуорохромом (в нашем случае – ECD, для регистрации которого используется канал FL3), для регистрации которого используется один и тот же канал, возможно лишь в том случае, когда для разделения данных популяций клеток применяется как минимум еще одно антитело (CD3 как маркер для выделения популяции Т-хелперов), детектирование которого осуществляется по отдельному каналу флуоресценции (в нашем случае – канал FL5 для регистрации флуоресценции PC7). Примеры подобного рода исследований встречаются как на старых «малоцветных» приборах [8], для которых они, собственно, и были разработаны, так и не потеряли своей актуальности и в настоящее время при десяти- и более многоцветном анализе [9]. Хотя в нашей стране такой подход не получил должного распространения, особенно если принять во внимание приборную базу отечественных лабораторий. Особое внимание следует уделить тому, что при использовании на одном флуоресцентном канале антител против CD4 и CD19 крайне важно провести логическое гейтирование лимфоцитов с исключением примеси популяции моноцитов. Если этого сделано не будет то примесь моноцитов, которые слабо позитивны по CD4 и не несут CD3, будет ложно отнесена к В-клеткам.

На рисунке 2 также приведены примеры остальных гистограмм, которые используются для выделения основных популяций лимфоцитов периферической крови. На гистограмме Б выделяют популяции натуральных киллеров (22,76% от общего числа лимфоцитов), негативных по CD3 и позитивных по CD16 и CD56, а также так называемые НКТ-клетки, экспрессирующие одновременно CD3 и маркеры, характерные для НК-клеток. На гистограмме В (флуоресценция CD3 против флуоресценции CD8) выделяются цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, содержание которых в данном образце составляет 16,69% от общего числа лимфоцитов. Для определения общего числа Т-клеток в проанализированном образце можно использовать однопараметровую гистограмму (рис. 2, Г), где по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD3, а на оси ординат – количество клеток, обладающих тем или иным уровнем экспрессии CD3. Как уже отмечалось выше, при настройке напряжения негативные

клетки помещались в пределы первой декады логарифмической шкалы, поэтому особенно трудно выделить CD3-позитивные клетки не составляет (69,23% лимфоцитов).

Особое внимание при проведении иммунофенотипирования следует уделить подсчету контрольных сумм, характеризующих качество и достоверность проведенного исследования. Пожалуй, главное из них является сумма Т-, В- и НК-клеток [10], которая должна находиться в пределах 100% (100% ± 5%). В приведенном на рисунке 2 примере Т-лимфоциты составляют 69,23%, В-лимфоциты – 8,29%, натуральные киллеры – 22,76%. При помощи нехитрым подсчетов контрольная сумма будет равна 100,28%, что полностью соответствует нормативным значениям. Еще одним «внутренним» контролем может являться то положение, что сумма Т-хелперов, выделенных при помощи CD3 и CD4, и цитотоксических Т-клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> должна равняться общему числу CD3-позитивных клеток ± 5% [2]. В приведенном примере CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> составляют 43,26%, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> – 22,09%, а их сумма – 65,35% от общего числа лимфоцитов, что на 3,88% меньше общего числа Т-клеток. Хотя даже в рамках приведенных выше рекомендаций допускается расхождение не более 10% из-за присутствия в образце γδТ-клеток (увеличение числа дважды-негативных клеток в образце, что сопровождается уменьшением суммарного показателя Т-лимфоцитов) или наличия большого числа клеток, ко-экспрессирующих CD4 и CD8. В последнем случае сумма CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> может существенно превосходить общее число CD3<sup>+</sup> клеток и выходить за прописанные в рекомендациях нормативы. Поэтому, при помощи дополнительной гистограммы распределения Т-клеток по уровню экспрессии CD4 и CD8, можно более точно выделить не только Т-хелперы (рис.2, Д, область «Th») и цитотоксические Т-клетки (рис.2, Д, область «Tcyt»), но и популяции Т-лимфоцитов, несущие как оба антигена одновременно (область «CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>»), так и лишенные их обоих (область «DN»). Клиническая значимость этих параметров в настоящее время обсуждается при широком круге патологических состояний [11].

Таким образом, применение пяти-цветного цитофлуориметрического анализа с использованием 7 антител в одной пробирке позволяет выделить все основные популяции лимфоцитов, определение которых происходит

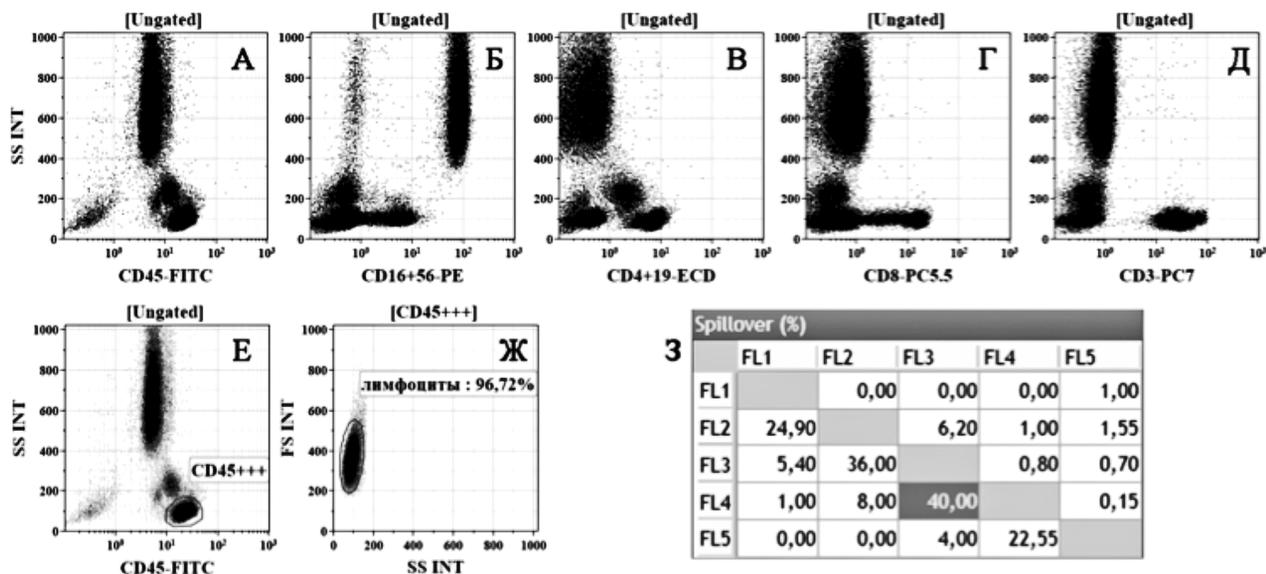


Рисунок 1. Настройка напряжения по каналам флуоресценции.

Гистограммы А-Д: по оси абсцисс – боковое светорассеяние (SS), по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против CD45, конъюгированных с ФИТЦ, против CD16 и CD56, конъюгированных с PE, против CD4 и CD19, конъюгированных с ECD, против CD8, конъюгированных с PC5.5, против CD3, конъюгированных с PC7, соответственно. На гистограмме А для CD45-FITC напряжение установлено так, чтобы популяция лимфоцитов – клеток, обладающих слабым боковым светорассеянием и имеющих высокую плотность CD45 – находилась в третьей декаде логарифмической шкалы; на гистограммах Б-Д напряжение выставлено таким образом, чтобы лимфоциты, не несущие соответствующих антигенов, находились в пределах первой декады. Гистограмма Е: выделение популяции лимфоцитов по параметрам бокового светорассеяния (ось ординат) и уровню экспрессии CD45 (ось абсцисс), выделенная область «CD45+++» содержит лимфоциты. Гистограмма Ж: по оси абсцисс – боковое светорассеяние, по оси ординат – прямое светорассеяние; показаны только клетки из области «CD45+++» гистограммы А; в области «лимфоциты» находятся клетки с низкой интенсивностью флуоресценции по FS и SS (при помощи этого региона из зоны анализа исключаются разрушенные и слипшиеся лимфоциты, а также большинство моноцитов). Рисунок 3 – пример матрицы цветовой компенсации, полученной при настройке проточного цитофлуориметра: каналы FL1, FL2, FL3, FL4 и FL5 предназначены для регистрации флуоресценции антител, конъюгированных с ФИТЦ, PE, ECD, PC5.5 и PC7, соответственно. По горизонтали в процентах показаны коэффициенты компенсации засветки флуорохромов из вертикальных столбцов в данный канал.

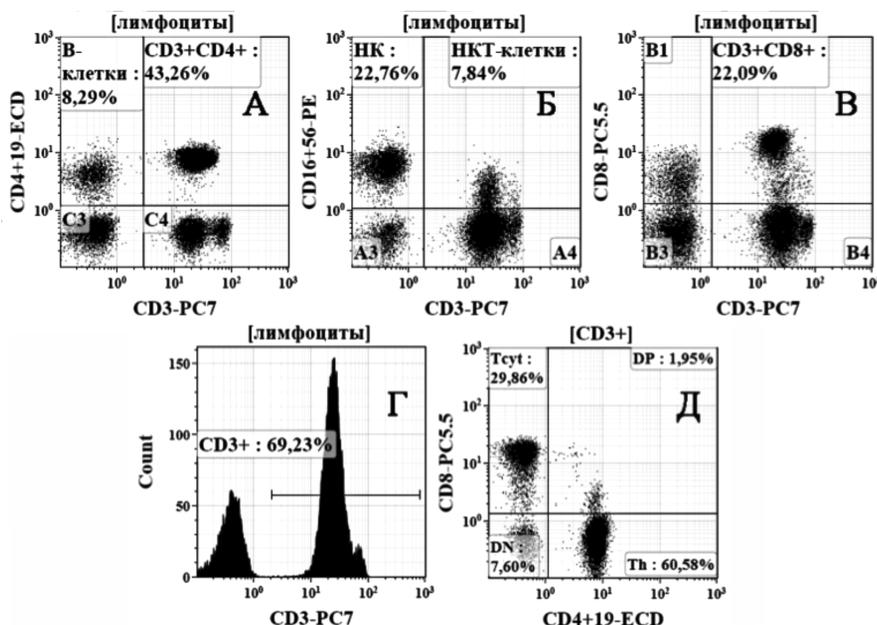


Рисунок 2. Гистограммы, необходимые для выделения основной популяция лимфоцитов периферической крови.

На гистограммах А-Г в процентах приведено содержание основных популяций лимфоцитов периферической крови от общего числа лимфоцитов, выделенных при помощи последовательного гейтирования, приведенного на рисунке 1 (гистограммы Е и Ж). Гистограмма Д – распределение Т-лимфоцитов (показаны только CD3-позитивные клетки, выделенные на гистограмме Д) по уровню экспрессии CD4 и CD8. Комментарии в тексте.

в клинико-диагностических лабораториях. Кроме того, использование описанного в работе подхода способно не только сократить время и себестоимость постановки реакции, но и увеличить пропускную способность лаборатории и существенно увеличить информативность результатов, получаемых при анализе всего одного образца. При этом в данной работе не рассматриваются такие показатели как экспрессия CD56 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках, равно как и экспрессия CD8 натуральными киллерами, имеющие в настоящее время больше научное, чем клинико-диагностическое значение.

Поддержано Министерством образования и науки РФ, проект № 1326.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байдун Л. А., Зурочка А. В., Тотолян Арег А., Хайдуков С. В. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект). Медицинская иммунология. 2012. 14. 255-268.
2. Mandy F. F., Nicholson J. K., McDougal J. S., CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4<sup>+</sup> T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm. Rep. 2003. 52 (RR-2). 1-13.
3. Nicholson J. K., Hubbard M., Jones B. M. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. Cytometry. 1996. 26. 16-21.
4. Glatting G., Muller M., Koop B., Hohl K., Friesen C., Neumaier B., Berrie E., Bird P., Hale G., Blumstein N. M., Waldmann H., Bunjes D., Reske S. N. Anti-CD45 monoclonal antibody YAM1568: A promising radioimmunoconjugate for targeted therapy of acute leukemia. J. Nucl. Med. 2006. 47. 1335-1341.
5. Ginaldi L., Matutes E., Farahat N., De Martinis M., Morilla R., Catovsky D. Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies: a quantitative study by flow cytometry. Br. J. Haematol. 1996. 93. 921-927.
6. Maecker H. T., Frey T., Nomura L. E., Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. Cytometry A. 2004. 62. 169-173.
7. Mahnke Y. D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. Clin. Lab. Med. 2007. 27. 469-485.
8. Horvatinovich J. M., Sparks S. D., Mann K. P. Establishing a pure lymphocyte gate for subset analysis by flow cytometry. Cytometry. 1996. 26. 172-177.
9. Autissier P., Soulas C., Burdo T. H., Williams K. C. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. Cytometry A. 2010. 77. 410-419.
10. Schenker E. L., Hultin L. E., Bauer K. D., Ferbas J., Margolick J. B., Giorgi J. V. Evaluation of a dual-color flow cytometry immunophenotyping panel in a multicenter quality assurance program. Cytometry. 1993. 14. 307-317.
11. А. В. Зурочка, С. В. Хайдуков, И. В. Кудрявцев, В. А. Черешнев. Проточная цитометрия в медицине и биологии. РИО УрОРАН, Екатеринбург 2013. 552.

### EXPERIENCE OF MEASUREMENT OF PARAMETERS OF THE IMMUNE STATUS WITH USE OF THE 5-COLOR ANALYSIS

<sup>1</sup> Subbotovsky A. I., <sup>2,3</sup> Kudryavtsev I. V.

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution Novosibirsk Research Institute of Pathology of Blood Circulation of a Name of Academician E. N. Meshalkina of Ministry of Health of the Russian Federation,

<sup>2</sup>FGBU of "scientific research institute of experimental medicine" SZO Russian Academy of Medical Science;

<sup>3</sup>Far East federal university

Abstract: We describe using of 5-color analysis for the study of immune status parameters by flow cytometry. Whole blood of healthy donors was stained the combination of monoclonal antibodies CD45-FITC, CD16-PE, CD56-PE, CD4-ECD, CD19-ECD, CD8-PC5.5, CD3-PC7 (Beckman Coulter, USA) by no-wash technology. The PMT voltage were adjusted using tubes stained with each monoclonal antibody, PMT voltage was optimal when the negative population was located in the middle of the first decade of the logarithmic scale. Compensation was adjusted by automatic mode of Navios software (Beckman Coulter, USA). We described optimal strategy gating to obtain the populations of interest: general T-cells (CD3<sup>+</sup>), T-helper cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), cytotoxic T-lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), B-cells (CD19<sup>+</sup>), NK-cells (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) and NKT-cells (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).

## СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЖЕНЩИН РАННЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ В УСЛОВИЯХ ПРОЖИВАНИЯ В ПРОМЫШЛЕННОМ ГОРОДЕ

Тиунова Т.А.

МАУЗ «Городская больница 2», Магнитогорск, ФБГУН институт иммунологии  
и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Проведено исследование иммунных параметров женщин раннего репродуктивного возраста с мастопатией, проживающих в экологически неблагоприятном регионе Челябинской области. Обнаружено снижение активности фагоцитоза, угнетение кислородзависимых процессов микросомального окисления в клетке, снижение числа Т-хелперов и В-лимфоцитов, на фоне повышения уровня Т-НК лимфоцитов и клеток с маркерами ранней и поздней позитивной активации, что свидетельствует об участии механизмов адаптивного иммунитета в реализации гиперпластических процессов в организме.

*Ключевые слова:* экологическая иммунология, мастопатия, нейтрофилы, лимфоциты.

**Введение** Объективной реальностью в настоящее время является существование серьезных экологических проблем, связанных с ростом техногенного и антропогенного загрязнения окружающей среды. Современные эпидемиологические исследования показывают, что экологические проблемы конкретного региона должны рассматриваться в контексте изучения экозависимой патологии человека, изменения функционирования его гомеостатических систем и констант [1]. Наиболее чувствительными к воздействию загрязненной окружающей среды являются иммунная и репродуктивная системы человека, которые могут служить определенными индикаторами экологического неблагополучия региона [2]. Ухудшающаяся экологическая обстановка способствует неуклонному росту онкологической заболеваемости женской репродуктивной системы, в том числе и молочной железы [3].

**Целью** исследования явилось изучение показателей иммунной системы у женщин раннего репродуктивного возраста с мастопатией, проживающих в экологически неблагоприятном регионе Челябинской области.

**Материалы и методы исследования.**

Обследование проводилось на базе МАУЗ «Городская больница № 2 и МУЗ «Детская городская поликлиника 2» г. Магнитогорска.

**Обследуемый контингент.** Объект исследования: женщины раннего репродуктивного возраста 15-35 лет, средний возраст  $20,4 \pm 4,2$  года, постоянно проживающие в промышленном регионе с развитой отраслью черной металлургии.

**Материал для исследования.** Забор крови выполняли из локтевой вены объемом 6 мл в вакуумную пробирку с  $K_3EDTA$  объемом 9 мл.

**Гематологические исследования.** Функциональную активность нейтрофилов периферической крови исследовали путем определения активности фагоцитоза, интенсивности фагоцитоза и определения фагоцитарного числа с помощью стандартных методов. Способность к кислородзависимому киллингу определяли с помощью восстановления нитросинего тетразолия [4].

**Определение популяционного спектра лимфоцитов.** Лимфоциты выделяли с помощью гетерогенного гейтирования. Определение популяционного состава лимфоцитов выполняли с использованием специфических моноклональных антител, для окраски использовали двухпараметрические реагенты линии IOTest: CD3-FITC/CD19-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD(16+56)-PE, CD3-FITC/CD25-PE, CD3-FITC/HLA-DR-PE. Готовый образец анализировали

на лазерных проточном цитометре фирмы Beckman Coulter, США с использованием гомогенного гейтирования по показателям светорассеяния [5].

**Исследование гуморального звена.** Определение концентрации иммуноглобулинов А, М, G, с помощью фотометрического турбидиметрического теста с использованием реагентов фирмы «HUMAN» на автоматическом биохимическом анализаторе «САПФИР – 400». Единицы измерения г/л.

**Статистическая обработка материала** проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows, 6.0». Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

**Результаты проведенного исследования.** В соответствии с поставленной целью нами проведена оценка функциональных характеристик нейтрофилов у женщин раннего репродуктивного возраста с мастопатией. Изучались следующие показатели: активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число, НСТ-активность нейтрофилов: спонтанная и индуцированная НСТ активность, спонтанный и индуцированный индекс активности нейтрофилов. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Анализ таблицы 1 показал, что активность фагоцитоза нейтрофилов у женщин с доброкачественной патологией молочных желез до-

стоверно ниже контрольной группы ( $p=0,04$ ), на фоне отсутствия изменений показателя интенсивности фагоцитоза нейтрофилов и фагоцитарного числа. Изучение НСТ-активности нейтрофилов показало повышение спонтанной НСТ активности при достоверном снижении индекса спонтанной активности НСТ в группе женщин с мастопатией. Высокая степень спонтанной активации НСТ активности отражает напряженность эффекторных кислородзависимых механизмов врожденного иммунитета и характеризует способность нейтрофилов к завершеному фагоцитозу. Нами зафиксировано снижение индуцированной НСТ-активности нейтрофилов в сочетании со снижением индекса индукции НСТ в этой же группе.

Следующим этапом явилось изучение популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов, активационных маркеров иммунцитов периферической крови женщин раннего репродуктивного возраста. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2 в группе женщин с доброкачественной патологией молочных желез, установлено снижение процентного содержания Т-хелперов, что характеризует перераспределительные изменения пула иммунцитов, снижение иммунорегуляторного индекса за счет снижения относительного числа хелперов, повышение абсолютного и от-

Таблица 1. Характеристика показателей фагоцитарной активности нейтрофилов

Наименование показателей	Обозначение	условно здоровые женщины n=36	женщины с патологией n=33
Активность фагоцитоза нейтрофилов	M±m	47,3±0,7	44,9±1,4
	p		0,04
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов	M±m	1,61±0,04	1,58±0,03
	p		
Фагоцитарное число нейтрофилов	M±m	3,43±0,04	3,54±0,04
	p		
НСТ спонтанная активность	M±m	14,8±0,84	17,5±1,0
	p		0,01
НСТ спонтанный индекс	M±m	0,16±0,009	0,12±0,01
	p		0,0004
НСТ индуцированная активность	M±m	47,6±0,95	44,1±1,06
	p		0,01
НСТ индуцированный индекс	M±m	0,63±0,03	0,58±0,08
	p		0,04

**Таблица 2.** Характеристика показателей популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов крови в группе 15-35 летних женщин с мастопатией

Наименование показателей	Обозначение	условно здоровые женщины n=36	женщины с патологией n=33
Т-лимфоциты (CD3+ CD19-) отн.	M±m	76,3±1,20	73,7±1,3
	p		
Т-лимфоциты (CD3+ CD19-) абс.	M±m	1374,0±74,0	1422,8±105
	p		
Т-хелперы (CD3+ CD4+) отн.	M±m	42,2±0,82	38,5±0,96
	p		0,002
Т-хелперы (CD3+ CD4+) абс.	M±m	782,02±38,7	765,6±74,4
	p		
Т- цитотоксические (CD3+ CD8+) отн.	M±m	27,6±1,16	29,3±1,56
	p		
Т- цитотоксические (CD3+ CD8+) абс.	M±m	501,7±23,3	552,3±37,3
	p		
иммунорегуляторный индекс (Тх/Тс)	M±m	1,6±0,06	1,49±0,05
	p		
Т-НК лимфоциты (CD3+16+56+) отн.	M±m	1,8±0,16	3,15±0,58
	p		0,01
Т-НК лимфоциты (CD3+16+56+) абс.	M±m	28,5±2,21	47,0±4,43
	p		0,03
NK лимфоциты (CD3+16+56+) отн.	M±m	13,6±0,54	13,1±1,03
	p		
NK лимфоциты (CD3+16+56+) абс.	M±m	254,7±18,1	253,1±25,8
	p		
В-лимфоциты (CD3- CD19+) отн.	M±m	12,5±0,6	10,84±0,6
	p		
В-лимфоциты (CD3- CD19+) абс.	M±m	232,6±16,8	211,6±20,7
	p		0,03

носительного числа Т-НК лимфоцитов. Как известно, повышение числа Т-НК лимфоцитов является патогномичным признаком клеточно-опосредованной цитотоксичности [6]. Изменения свидетельствуют об активации процессов кроветворения на уровне центральных механизмов иммуногенеза.

Со стороны В-лимфоцитов отмечено достоверное снижение их абсолютного числа в группе женщин доброкачественной патологией молочных желез ( $p=0,03$ ), что может свидетельствовать об угнетении механизмов В – иммунопоэза, на фоне тенденции к снижению их процентного содержания.

Оценка функционального состояния активности лимфоцитов, несущих активационные маркеры, представлена в таблице 3.

Результаты, представленные в таблице 3, показывают, что в группе женщин с патологией молочных желез имеет место достоверное повышение абсолютного числа Т-лимфоцитов, несущих маркеры ранней активации, имеющих фенотип CD3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> и на фоне тенденции увеличения их относительного числа. В отношении субпопуляций Т-лимфоцитов несущих фенотип CD3<sup>+</sup> HLA DR<sup>+</sup> и отражающих функциональную готовность к включению генов поздней ак-

Таблица 3. Показатели функциональной активности лимфоцитов

Наименование показателей	Обозначение	условно здоровые женщины n=36	женщины с патологией n=33
Т-лимфоциты CD3+ CD25+ (ранняя акт.) отн.	M±m	7,61±1,03	11,02±1,5
	p		
Т-лимфоциты CD3+ CD25+ (ранняя акт.) абс.	M±m	139,18±19,3	218,9±34,4
	p		0,04
Т-лимфоциты CD3+HLA DR+ (поздняя акт.) отн.	M±m	10,2±1,81	17,7±2,9
	p		0,03
Т-лимфоциты CD3+HLA DR+ (поздняя акт.) абс.	M±m	185,02±34,1	316,03±49,9

Таблица 4. Характеристика показателей гуморального иммунитета

Наименование показателей	Обозначение	условно здоровые женщины n=36	женщины с патологией n=33
иммуноглобулины А	M±m	2,9±0,13	2,85±0,13
	p		
иммуноглобулины М	M±m	1,17±0,01	1,20±0,03
	p		
иммуноглобулины G	M±m	16,1±0,39	15,09±0,49
	p		

тивации, отмечено достоверное повышение относительного и на уровне тенденции повышения, абсолютного числа Т-лимфоцитов в системной циркуляции.

Сравнительная характеристика сывороточных уровней иммуноглобулинов не позволила выявить значимых достоверных отличий в изучаемых группах. Важно отметить, что все показатели находились в пределах референсных значений. Характеристика показателей гуморального звена иммунной системы представлена в таблице 4.

Таким образом, изменение иммунных параметров женщин раннего репродуктивного возраста, проживающих в экологически неблагоприятном регионе Челябинской области продемонстрировало ряд функциональных изменений нейтрофилов, в виде снижения активности фагоцитоза, угнетения кислородзависимых процессов микросомального окисления в клетке. Со стороны популяционного спектра лимфоцитов зафиксировано снижение числа Т-хелперов и В-лимфоцитов, на фоне повышения абсолютного и относительного уровня Т-НК лимфоцитов, относящихся к врожденным механизмам иммунной защиты. Установлено повышение в циркуля-

ции числа лимфоцитов с маркерами ранней и поздней позитивной активации, что свидетельствует об участии механизмов адаптивного иммунитета в реализации гиперпластических процессов в организме.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кадагидзе З.Г. Новые подходы к регуляции противоопухолевого иммунитета // Маммология. – 2007. – № 1. – С. 10-12.
- Зурочка, А.В. Значение оценки иммунного статуса и уровней онкомаркеров у лиц с клиническими признаками нарушений иммунной системы / А.В. Зурочка, А. С, Бастрон, А, А, Ховрин и др.// Russian Journal of Immunology- 2004. – Vol.9, Supplement I P. 146.
- Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2008 году. – М., 2009. – 192с.
- Маянский А.Н. Лекции по иммунологии / Н. Новгород: Изд»во Ниж- ГМА; 2003. – 272 с.
- С.В. Хайдуков., А.В. Зурочка. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск, 2008.
- В.А. Козлов., А.Г. Борисов., С.В. Смирнова., А.А. Савченко. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений. Издательство «Наука» Новосибирск, 2009.

## CONDITION OF IMMUNE SYSTEM AT WOMEN OF EARLY REPRODUCTIVE AGE WITH BENIGN PATHOLOGY OF MAMMARY GLANDS IN THE CONDITIONS OF RESIDENCE IN THE INDUSTRIAL CITY

Tiunova T. A.

MAUZ "City Hospital 2", Magnitogorsk, FBGUN institute of immunology and physiology of URO Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

**Summary.** The study of immune parameters of early women of reproductive age with mastopathy living in ecologically unfavorable region of Chelyabinsk region. Found to decrease the activity of phagocytosis, inhibition of oxygen-dependent microsomal oxidation processes in the cell, reducing the number of T-helper cells and B cells, accompanied by increased levels of T-NK lymphocytes and cells with markers of early and late positive activation, which suggests the involvement of adaptive immunity mechanisms in the implementation of hyperplastic processes in the body.

*Keywords:* ecological immunology, breast, neutrophils, lymphocytes.

---

---

## ОЦЕНКА УРОВНЕЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ У ЖЕНЩИН РАННЕГО И ПОЗДНЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С МАСТОПАТИЕЙ И РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ЭКОЛОГИЧЕСКИ НЕБЛАГОПОЛУЧНОГО РЕГИОНА

Тиунова Т.А.

МАУЗ «Городская больница № 2», ГБУЗ «Областной онкологический диспансер 2», Магнитогорск, НИИ иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Онкологические маркеры, выявленные в сыворотке женщин раннего и позднего репродуктивного возраста с доброкачественной и злокачественной патологией молочных желез, проживающих в зоне экологического неблагополучия, доказывают необходимость проведения динамического мониторинга.

*Ключевые слова:* мастопатия, рак молочной железы, онкологические маркеры.

**Введение.** Онкологическая заболеваемость населения Южного Урала за последнее десятилетие растет интенсивными темпами, особенно это касается промышленных центров [1]. Среди женского населения города Магнитогорска с 2007 года рак молочной железы занимает лидирующее место. Известно, что у работников промышленных предприятий отмечается повышенное содержание онкомаркеров под воздействием вредных производственных факторов [2]. Экологическое неблагополучие города, связанное с загрязнением окружающей среды производственными выбросами, отходами металлургического производства,

неправильный образ жизни и репродуктивное поведение приводят к неуклонному росту онкопатологии в регионе [3].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение динамики изменений уровней онкологических маркеров у женщин репродуктивного возраста с мастопатией и раком молочной железы, проживающих в промышленном городе Магнитогорске.

**Материалы и методы.**

**Обследуемый контингент.** Обследовано 147 женщин раннего и позднего репродуктивного возраста, постоянно проживающих в городе, не работающих на промышленном

предприятия в возрасте от 15 до 60 лет. Выделено 5 групп пациентов: 1 группа – 36 здоровых женщин раннего репродуктивного возраста ( $20,1 \pm 0,9$  лет); 2 группа – 33 женщины с мастопатией (средний возраст  $19,9 \pm 0,9$  лет); 3 группа – 20 условно-здоровых женщин  $44,5 \pm 1,28$  года; 4 группа – 22 женщины с мастопатией ( $46,5 \pm 1,7$  годда); 5 группа – 27 женщин с верифицированным диагнозом рака молочной железы, средний возраст  $56,2 \pm 2,1$  года. Всем пациенткам, включенным в исследование проведено обследование у гинеколога, онколога, проведены ультразвуковое и маммографическое обследование молочных желез (по показаниям), а так же цитологическое и гистологическое исследование патологического материала у женщин с раком молочной железы. В перечень обследования включено 7 онкологических маркеров.

**Материал для исследования.** Забор крови производили утром, натощак, до проведения диагностических и лечебных процедур из локтевой вены в вакуумную пробирку, содержащую активатор свертывания, объемом 9 мл.

**Определение уровня онкологических маркеров.** Все онкологические маркеры определялись методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа, «сэндвич» вариант (PEA, АФП ХГЧ, СА 19-9, СА 125, СА 15-3, HCE) [4]. В работе использовались

тест-системы отечественного и зарубежного производства (ЗАО «Вектор-Бест», «Хема», «HUMAN»). Исследования выполнялись на полуавтоматическом анализаторе для планшетов Humareader Plus (HUMAN, Германия).

**Статистическая обработка материала** проводилась с применением пакета прикладных программ «Statistica for Windows, vers. 6.0» фирмы StatSoft Inc. (США). Обработка проводилась по расчету относительных и средних величин, сравнение групп с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни.

**Результаты и обсуждение.** Исследования показали, что при развитии мастопатии у женщин уже в раннем репродуктивном возрасте в сравнении с условно-здоровой группой отмечалось статистически значимое повышение уровней следующих маркеров – PЭА, СА15-3, СА 125. Однако, следует отметить, что количественные характеристики ОМ в целом не выходили за пределы стандартных референсных значений. Характеристика онкомаркеров в группе молодых женщин мастопатией в сравнении с условно-здоровыми женщинами представлена в таблице 1.

Повышение в сыворотке молодых женщин с мастопатией уровня сывороточного гликопротеина СА15-3, являющегося высокоспециализированным маркером рака молочной железы, может свидетельствовать о высоком риске

Таблица 1

Показатели общего анализа крови	Обозначение	Группа 1. Условно здоровые женщины n=36	Группа 2. Женщины с мастопатией n=33
PЭА	M±m	0,42±0,06	0,79±0,14
	p		p=0,01
СА-19-9	M±m	3,73±0,81	5,97±1,4
	p		
СА-15-3	M±m	10,2±0,86	27,5±4,6
	p		p=0,03
ХГЧ	M±m	2,48±1,7	1,23±0,43
	p		
HCE	M±m	3,37±0,53	2,57±0,55
	p		
СА-125	M±m	8,07±0,75	12,7±1,52
	p		p=0,03
АФП	M±m	2,39±0,32	3,53±1,08
	p		

развития злокачественного процесса в молочной железе и требует проведения регулярной диспансеризации и динамического контроля уровня СА 15-3 у данной категории женщин.

Исследование уровней маркеров у женщин позднего репродуктивного возраста с доброкачественной и злокачественной патологией молочных желез в сравнении с условно-здоровой группой показало изменение 5 из 7 изучаемых маркеров. Результаты исследований представлены в таблице 2.

В группе женщин с подтвержденным раком молочной железы выявлены следующие маркеры: СЕА, СА19-9, СА 125, СА 15-3, НСЕ.

Высокой специфичностью в отношении рака молочной железы является маркер СА 15-3, уровень которого в 1,6 раза превышал показатель контрольной группы, однако, и в группе женщин с доброкачественной патологией молочных желез уровень СА 15-3, оказался в 1,4 раза выше в сравнении со здоровыми женщинами, что свидетельствует о высоком уровне пролиферативных процессов в тканях железы и гиперпродукции клетками железистого эпителия муцин-гликопротеидного комплекса.

Отсутствие достоверных различий в содержании данного мукопротеина у женщин с раком молочной железы и мастопатией и его высокая тканеспецифичность в отношении рака молочной железы, позволяет отнести женщин с доброкачественной патологией молочных желез в данном возрасте к группе риска по раку молочной железы и использовать данный показатель в качестве скринингового лабораторного маркера.

Концентрация в сыворотке женщин с мастопатией и раком молочной железы СЕА-универсального маркера онкопатологии, оказалась максимально высокой в группе с раком молочной железы в сравнении с контрольной и женщинами, имеющими доброкачественную патологию молочных желез.

Отмечен достоверный рост в сыворотке женщин с раком молочной железы ракового маркера СА 19-9, который имеет высокую специфичность при раке поджелудочной железы, при этом общность происхождения железистого эпителия молочной и поджелудочной железы предполагает его использование как рака поджелудочной железы, так и рака молочной железы.

Таблица 2. Уровни ОМ у женщин позднего репродуктивного периода с доброкачественной и злокачественной патологией молочных желез.

Показатели ОМ	Обозначение	Название группы		
		Группа 1. условно здоровые женщины (контрольная) n=20	Группа 2. женщины позднего репродуктивного возраста с мастопатией n=22	Группа 3 женщины с РМЖ n=27
РЭА	M±m	0,43±0,1	0,92±0,3	3,85±0,7
	p1		0,02 1-2	0,003 1-3
0,042-3				
СА-19-9	M±m	2,31±0,69	3,97±1,27	5,50±1,06
	p1			0,03 1-3
СА-15-3	M±m	14,5±1,4	20,2±1,1	23,3±1,8
	p1		0,001 1-2	0,001 1-3
ХГЧ	M±m	6,52±0,2	9,01±3,5	7,66±2,04
	p1			
ТНСЕ	M±m	4,92±1,6	3,55±0,7	10,10±1,6
	p1		0,001 2-3	0,01 1-3
0,02 1-2				
СА-125	M±m	8,22±1,19	8,79±1,3	12,6±2,6
	p1			0,01 1-3
АФП	M±m			
p1	2,48±0,47	4,06±1,08	3,40±0,89	

Концентрация ракового антигена СА-125, представляющего собой опухольассоциированный поверхностный дифференцировочный антиген эпителиальных клеток фетальных тканей, у женщин с раком молочной железы оказалась достоверно повышенной в сравнении с контрольной группой и не имела отличий с женщинами страдающими мастопатией, что свидетельствует об усилении продукции данного маркера при доброкачественных диспластических процессах.

Интересным оказался факт повышения уровня онкологического маркера, имеющего ферментативную активность нейроспецифической енолазы в сыворотке женщин с раком молочной железы в сравнении с остальными изучаемыми группами. НСЕ относится к ферментам, идентифицированным в нейронах мозга и периферической нервной системы. Кроме того, он содержится в клетках, имеющих нейроэктодермальное происхождение, а так же в эритроцитах и тромбоцитах. Для данного маркера высокая специфичность установлена только в отношении мелкоклеточного рака легкого и нейробластомы.

Таким образом, полученные нами данные о содержании онкомаркеров в сыворотке женщин раннего и позднего репродуктивного возраста с доброкачественной и злокачественной патологией молочных желез, проживающих в зоне экологического неблагополучия, до-

казывают необходимость проведения динамического мониторинга уровня онкологических маркеров у женщин с мастопатией уже в раннем репродуктивном возрасте, при этом наиболее значимыми онкологическими маркерами следует считать антигены, ассоциированные с мембранами опухолевых клеток (СА 19-9, СА 15-3, СА-125) и онкофетальные антигены (СЕА), значения которых достоверно отличались от группы здоровых женщин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- 1, Кошкина В. С. Нарушение репродуктивного здоровья как индикатор экологической обусловленности патологии в промышленных городах с развитой отраслью черной металлургии // Сборник научных докладов Всероссийской научной конференции 1–3 ноября 2004 года – С.84-89.
- 2, Бастрон А. С. Региональные особенности состояния иммунной системы населения Южного Урала. Иммунология Урала: Материалы 1 конференции иммунологов Урала 4–6 декабря 2001 год г. Екатеринбург, 2001- с.33
- 3, Мотавкина Н. С., Коршукова О. А., Миронова А. В., Иммунные онкомаркеры у женщин разного возраста в неодинаковых экологических условиях как диагностический и прогностический индикатор злокачественных опухолей. // Ж. Аллергология и иммунология, 2005, Т. 6, № 2, С.277
- 4, Кондратьева И. А. Практикум по иммунологии. Учебное пособие для ВУЗов. Академия, 2004.

### ASSESSMENT OF LEVELS OF ONCOLOGICAL MARKERS AT WOMEN OF EARLY AND LATE REPRODUCTIVE AGE WITH A MASTOPATIYA AND A CANCER OF THE MAMMARY GLAND, LIVING IN CONDITIONS OF ECOLOGICALLY UNSUCCESSFUL REGION

Tiunova T. A.

*MAUZ "City Hospital No. 2", GBUZ "Regional Oncological Clinic 2", Magnitogorsk, immunology and physiology scientific research institute Ur About the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia*

Summary. Cancer markers identified in the serum of women early and late reproductive age with benign and malignant breast pathology, living in the zone of ecological trouble, prove the need for dynamic monitoring.

*Keywords: breast cancer, breast cancer, cancer markers.*

## КОМПЛЕКСНАЯ ТЕРАПИЯ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЖЕНЩИН, СТРАДАЮЩИХ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ, НА ЭТАПЕ ПРЕГРАВИДАРНОЙ ПОДГОТОВКИ

Тулупова М. С.<sup>1</sup>, Столина М. Л.<sup>2</sup>, Хамошина М. Б.<sup>3</sup>, Маркелова Е. В.<sup>2</sup>,  
Бениова С. Н.<sup>2</sup>, Родионова О. М.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Консультативно-диагностический центр «Парацельс», Владивосток, <sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Тихоокеанского государственного медицинского университета Минздрава России», Владивосток, <sup>3</sup>ГБОУ ВПО Российский государственный университет дружбы народов, Москва, <sup>4</sup>Централизованная цитологическая лаборатория, Россия, Владивосток, Россия

В результате проведенного исследования была изучена клинико-иммунологическая эффективность применения рекомбинантного интерлейкина-2 человека (ронколейкина) в ходе комплексного лечения урогенитальной инфекции при предгравидарной подготовке у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе. Папилломавирусная инфекция выявлялась в 83,5±4,3% случаев. Для оценки состояния иммунитета был изучен иммуноглобулиновый и цитокиновый статус вагинального секрета. Было выявлено влияние препарата на динамику цитокинов: при нормализации вагинального секрета и элиминации папилломавирусной инфекции отмечалось повышение ИЛ-2 с параллельным снижением провоспалительных и регуляторных цитокинов.

**Ключевые слова:** Рекомбинантный интерлейкин-2 человека, папилломавирусная инфекция, невынашивание беременности.

**Введение.** В настоящее время одной из глобальных проблем нашей страны является неблагоприятная демографическая ситуация, сложившаяся в последние десятилетия. Многочисленными исследованиями отечественных авторов, показано, что частота невынашивания беременности на протяжении последних десятилетий довольно стабильна и колеблется в пределах 10–25% [1, 2].

Инфекционный фактор является одной из основных причин развития невынашивания беременности, при этом ведущая роль урогенитальной инфекции и инфекций, передаваемых преимущественно половым путем (ИППП), была неоднократно доказана как отечественными так и зарубежными исследованиями [1, 2, 3, 4]. Папилломавирусная инфекция (ПВИ) относится к наиболее распространенным ИППП на современном этапе. По данным отечественных исследователей, разные формы ПВИ гениталий встречаются у 44,3% пациенток, обращающихся за различными видами гинекологической помощи [5, 9]. Однако, мнения ученых о влиянии инфекции на плод и невынашивание беременности неоднозначно. Радзинский В. Е. с соавторами, (2009), считают, что даже в случае отсутствия прямого специфического воздействия инфекционных агентов на плод, морфофункциональные нарушения репродуктивной системы, вызванные персистенцией их в эндометрии, с развитием хронического эндометрита ведут к нарушению развития эмбриона [6]. Включение ПВИ в состав бактериально-вирусных ассоциаций способствует значительным изменениям иммунного ответа пациентки – обусловленное вирусом супрессивное действие на иммунокомпетентные клетки снижает его эффективность, повышая риск хронизации процесса и развития аутоиммунных нарушений на фоне персистенции инфекционного процесса [7]. В тоже время рекомендуют отдельно выделять хронический эндометрит аутоиммунного генеза и хронический эндометрит без микробного агента, на фоне гипореактивности [6]. За последние 15 лет проведено много исследований, подтверждающих,

что невынашивание беременности – проявление имеющихся генетически детерминированных иммунологических расстройств [6].

Иммунологическая недостаточность на фоне ПВИ приводит к низкой эффективности общепринятых методов лечения и высокому проценту рецидивирования. В связи с чем, в комплекс лечения выявленного инфекционного заболевания гениталий любой локализации обязательно включать препараты, обладающие доказанной иммунокорректирующей активностью. Одним из таких препаратов является рекомбинантный интерлейкин-2 человека. Имеются литературные данные о применении рекомбинантный интерлейкин-2 человека (Ронколейкина) при эндометриозе, кандидозе, папилломатозной, уреоплазменной, хламидийной, герпетической, цитомегаловирусной, ВИЧ инфекции, бесплодии, эктопии шейки матки и др. [3, 5, 8].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение эффективности применения рекомбинантного интерлейкина-2 человека в составе комплексной терапии лечения урогенитальных инфекций у женщин, планирующих беременность, с невынашиванием беременности в анамнезе.

**Материалы и методы исследования.** Под наблюдением находилось 226 женщин с невынашиванием беременности в анамнезе в возрасте от 19 до 39 лет с урогенитальной инфекцией, вызванной различными бактериально-вирусными ассоциациями. Из исследования были исключены пациентки с эндокринными, аутоиммунными заболеваниями, тяжелой соматической патологией. Диагноз урогенитальной инфекции устанавливался на основании данных анамнеза, клинических, инструментальных и лабораторных исследований. Всем пациентками проводили специальное гинекологическое исследование, расширенную кольпоскопию, цитологическое исследование эпителия цервикального канала, влагалища, уретры. Для идентификации возбудителя использовали: метод прямой иммунофлуоресценции (люминесцентный микроскоп производства фирмы “Лоно”, Россия), метод гибридизационно-флуоресцентной детекции в реальном времени (детектирующий термоциклер ДТ 96, ДТ 322, Терцик и детектор Джин – 4, Россия) с использованием реагентов (ООО “Интерлабсервис”, “ДНК-Технология”, Россия).

Проводили бактериальный посев материала на микрофлору с применением стандартных сред (Россия). Материалом исследования служило отделяемое из цервикального канала, уретры, влагалища. Определение титра антител классов IgM, IgG, IgA к хламидиям, вирусу герпеса I и II типов, цитомегаловирусу в периферической крови, уровня интерлейкинов: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 и ФНО $\alpha$  в цервикальной слизи проводили путём иммуноферментного анализа с использованием автоматического иммуноферментного анализатора “ALISEI”, Италия.

Терапия проводилась с учетом выявленных инфекционных агентов, комплексно.

При генитальных герпесвирусных инфекциях применяли ацикловир и его производные в терапевтических дозировках. Лечение скрыто протекающего хронического воспалительного процесса урогенитального тракта (вирусно-бактериальной этиологии) было этиотропным и патогенетически обоснованным. Учитывая превалирование анаэробно-аэробных ассоциаций, а также мико-, уреоплазменной и хламидийной инфекций, использовались антибиотики широкого спектра действия из групп цефалоспоринов, макролидов, фторхинолонов в терапевтических дозировках. При грибковых поражениях противогрибковые препараты. Для восстановления микробиоценоза влагалища использовались эубиотики.

Методом случайной выборки пациентки были поделены на группы: основная группа (ОГ) – 126 человек, группа сравнения (ГС) – 100 человек.

Все пациентки ОГ, помимо специфической антибактериальной и противовирусной терапии, дополнительно, в качестве иммуномодулирующей терапии получали рекомбинантный интерлейкин-2 (ООО «БИОТЕХ», Россия, регистрационный номер: № ЛС-001810). Препарат является полипептидом, состоящим из 133 аминокислот. Обладает иммуномодулирующим действием, восполняя дефицит эндогенного интерлейкина-2 и воспроизводя его эффекты; иммуностимулирующим действием, направленным на усиление антивирусного, противобактериального и противоопухолевого иммунитета. Схема применения данного препарата состояла из двух этапов. На первом этапе рекомбинантный интерлейкин-2 применяли на фоне антибактериальной и противовирус-

ной терапии подкожно по 500 000 МЕ в верхнюю треть плеча, с кратностью – 1 инъекция 1 раз в 3 дня. Всего 5 инъекций.

На втором этапе рекомбинантный интерлейкин-2 – 500 000 МЕ вводили в виде цервикальных и уретральных инстилляций с раствором натрия хлорида 0,9% в соотношении 1: 5 с регулярностью один раз в 3 дня, всего 5 процедур. Деструкцию очагов ПВИ проводили методом радиоволновой хирургии с использованием аппарата Сургитрон (аппарат электрохирургический высокочастотный ЭХВЧ – 80-02 – «Фотек»).

Эффективность проведения комплексного лечения инфекций урогенитального тракта с применением рекомбинантного интерлейкина-2 на I этапе оценивали путем проведения контрольной кольпоскопии, цитологического исследования и ПЦР-диагностики соскобов эпителия половых путей через 30 дней после окончания полного курса лечения. Обязательным критерием оценки эффективности проведенного лечения являлось получение отрицательных результатов при проведении всех видов клинико-лабораторного контроля в отношении всех ранее выявленных возбудителей ИППП.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенное исследование показало, что активных жалоб при первичном осмотре пациентки ОГ и ГС не предъявляли, что характеризовало течение инфекционного процесса урогенитального тракта как бессимптомное. При целенаправленном опросе 61,9% пациенток отметили наличие: дизурических явлений (43,5%), диспареунии (17,2%), обильных выделений из половых путей (87,3%), тянущих болей внизу живота с иррадиацией в промежность (56,7%), снижение сексуальной активности (28,1%). Наиболее часто встречались следующие ассоциации: практически у каждой третьей – *Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Herpes simplex* II случаев, у каждой четвертой – *Trichomonas vaginalis*, *Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*. Обращает на себя внимание тот факт, что присутствие ПВИ было выявлено в 83,5±4,3% случаев, отсутствие только у 16,5% пациенток. Кроме того, в 30,5% случаев присутствовала сопутствующая условно-патогенная бактериальная флора в диагностически значимом титре: *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus haemolyticus*, *Streptococcus faecalis*, *Echerichia coli*. *Gardnerella*

*vaginalis*, *Mobiluncus* были выделены из влагалища у 4,5% пациенток.

О наличии ПВИ свидетельствовали: результаты клинической и кольпоскопической картины: единичные и множественные кондиломы вульвы, влагалища и шейки матки (91,8%); данные цитологического исследования соскобов, полученных из цервикального канала и с поверхности шейки матки, влагалища, вульвы: койлоциты (76,5%), дискератоциты (43,1%), клетки с паракератозом (53,1%), с выраженной дистрофией (28,3%), с признаками CIN I–III (33,4%); данные ПЦР-диагностики (98,8%).

По результатам исследования уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в цервикальном секрете до и после лечения получены достоверные различия. Исходные показатели провоспалительных цитокинов: ИЛ-1β, ФНО-α превышали норму и свидетельствовали о смещении цитокинового баланса в сторону активации Th1-опосредованного иммунного ответа и подавление Th2-опосредованного иммунного ответа, имело место также увеличение уровня регуляторного цитокина ИЛ-4 и ИЛ-2 как в основной, так и в группе сравнения.

Через 30 дней после окончания полного курса I этапа лечения при контрольном кольпоскопическом исследовании были получены следующие данные: у 23,7% женщин – уменьшение количества очагов кондиломатоза, у 47,6% – уменьшение площади ацетобелого участка, требующего удаления; при контрольном цитологическом исследовании – полное отсутствие клеток с признаками CIN; при контрольном анализе методом ПЦР – ВПЧ был диагностирован менее, чем в половине случаев – в 34,3±2,8%, что достоверно ( $p < 0,05$ ) отличается от инициальных показателей. Обращает внимание, что у всех пациенток (100,0%) контрольные результаты всех исследований на другие инфекции, выявленные первично, были отрицательными. На II этапе параллельно с орошениями цервикального канала и уретры раствором рекомбинантного интерлейкина – 2 проводили радиоволновую деструкцию очагов ПВИ методом радиоволновой хирургии. У 88,9% пациенток повторного хирургического вмешательства не потребовалось. При оценке кольпоскопической картины в динамике – репарация происходила в кратчайшие сроки. Уже после первой менструации слизистая

имела характеристики здоровой, заживление ткани в области хирургического вмешательства было полным, клинических и кольпоскопических признаков наличия ПВИ выявлено не было. При динамическом контрольном цитологическом исследовании картина мазка соответствовала норме, койлоциты, дискератоциты, признаки дистрофии клеток не выявлялись. Контрольный динамический анализ методом ПЦР на наличие ВПЧ показал 100,0% отрицательные результаты. Субъективно пациентки отметили улучшение общего самочувствия, повышение работоспособности, полное исчезновение дизурических явлений, диспареунии, каких-либо выделений из половых путей, болевых ощущений внизу живота, повышение сексуальной активности. Следует отметить, что 94 пациентки впервые с периода менархе отметили прошедшую менструацию как «абсолютно незаметную» (без каких-либо негативных ощущений). Цитокиновый профиль остался практически не измененным у женщин группы сравнения (ГС) в процессе проведенного лечения, у женщин основной группы в результате проведенного лечения препаратом рекомбинантного интерлейкина –2 по предложенной нами методике в составе комплексной терапии инфекций половых путей выявлено достоверное снижение содержания провоспалительных и регуляторных цитокинов: IL-1 $\beta$ , IL-4, ФНО $\alpha$  в цервикальном секрете на фоне достоверного повышения уровня IL-2. Такое соотношение факторов, регулирующих местный иммунный ответ соответствует нормальному, активизирует Th2–опосредованный иммунный ответ. Следовательно, рекомбинантный интерлейкин-2 является биорегулятором, исправляющим приобретенные дефекты внутренней среды организма.

За период диспансерного наблюдения в течение года при проведении динамических контрольных исследований у всех пациенток жалоб и клинико-лабораторных признаков ПВИ выявлено не было. В течение года у 165 (73,0%) женщин наступила желанная беременность, которая закончилась рождением доношенных здоровых детей, со средней массой тела  $3330 \pm 350$  г, с оценкой по шкале Апгар  $8,6 \pm 0,4$  баллов. Остальные пациентки находятся на этапе планирования беременности.

Таким образом, для оптимизации терапии папилломавирусной инфекции гениталий

у женщин, страдающих невынашиванием беременности, обусловленным инфекционным фактором, на этапе прегравидарной подготовки целесообразно проведение комплексной двухэтапной терапии, включающей на I этапе: рекомбинантный интерлейкин-2 на фоне антибактериальной и противовирусной терапии подкожно по 500 000 МЕ в верхнюю треть плеча, с кратностью – 1 инъекция раз в 3 дня, 5 инъекций; на II этапе – рекомбинантный интерлейкин-2 500 000 МЕ в виде цервикальных и уретральных инстилляций с раствором натрия хлорида 0,9% в соотношении 1: 5 с регулярностью раз в 3 дня, 5 процедур. Эффективность предложенной методики выразилась в 100,0% элиминации возбудителей урогенитальной инфекции уже на I этапе, элиминации ПВИ – на II этапе, в результате достоверного снижения содержания провоспалительных и регуляторных цитокинов: IL-1 $\beta$ , IL-4, ФНО $\alpha$  в цервикальном секрете на фоне достоверного повышения уровня IL-2, восстановлении репродуктивной функции у 73% женщин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сидельникова В.М. Гинекология.– 2008.– Т. 10, № 5.– С.28-30.
2. Ранние сроки беременности / В.Е. Радзинский [и др.]; под ред. В.Е. Радзинского.– М.: Status Praesens, 2009.– 480с.
3. Шперлинг Н.В. Терапевтическая эффективность и особенности действия препаратов интерферона и индукторов интерферона при вариантах течения вирусных урогенитальных инфекциях / Автореферат дисс... докт. Мед. наук.– Томск, 2009.– С.48.
4. Владимиров Н.Ю., Никитин В.Г., Чижова Г.В. //Акушерство и гинекология.– 2008.– № 5.– С. 31-35.
5. Белоусова Т.А., Горячкина М.В. // Фарматека.– 2010.– № 1.– С.32-36.
6. Радзинский В.Е. Неразвивающаяся беременность/ В.Е. Радзинский, В.И. Димитрова, И.Ю. Майскова.– М.: ГЭОТАР – Медиа.– 2009.– 200с.
7. Костава М.Н., Прилепская В.Н. // Русский медицинский журнал.– 2009.– Том 17, № 1.– С.16.
8. Егорова В.Н. Интерлейкин-2: опыт клинического применения/ В.Н. Егорова, А.М. Попович, И.В. Бабаченко.– Санкт – Петербург: «Издательский Дом «Новости правопорядка».– 2009.– 64с.
9. Burchell A. N., Winer R. L., Sanjose S., Franco E. L. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. Vaccine 2006; Vol. 24, S3: 52-61.

## COMPLEX THERAPY OF A PAPILLOMAVIRUSNY INFECTION AT THE WOMEN SUFFERING FROM A NEVYNASHIVANIYE OF PREGNANCY, AT A STAGE OF PREGRAVIDARNY PREPARATION

<sup>1</sup>Tulupova M. S., <sup>2</sup>Stolina M. L., <sup>3</sup>Hamoshina M. B., <sup>2</sup>Markelova E. V.,  
<sup>2</sup>Beniova S. N., <sup>4</sup>Rodionova O. M.

<sup>1</sup>Consulting and diagnostic center «Paracelsus», Vladivostok, <sup>2</sup>GBOU VPO "Pacific state medical university of Ministry of Health of Russia", Vladivostok, <sup>3</sup>GBOU VPO Russian state university of friendship of the people, Moscow, <sup>4</sup>Centralized цитологическая laboratory, Vladivostok, Russia

The study has been studied clinical and immunological efficacy of recombinant human interleukin-2 (ronkolejkin) in the complex treatment of urogenital infections in pregravid training in women with a history of miscarriage. HPV infection was detected in  $83,5 \pm 4,3\%$  of cases. To assess the state of immunity was studied immunoglobulin and cytokine status of vaginal secretions. It was revealed the effect of the drug on the dynamics of cytokines: the normalization of vaginal secretion and elimination of human papillomavirus infection was an increase in IL-2 with a parallel decrease in inflammatory and regulatory cytokines.

*Keywords: Recombinant human interleukin-2, HPV infection, miscarriage.*

---

---

## ЦИТОКИНОВЫЙ БАЛАНС В ОЦЕНКЕ ВЛИЯНИЯ МИЛИАЦИНА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ

Филиппова Ю. В., Панфилова Т. В., Ермолина Е. В., Железнова А. Д.,  
Лившиц Н. М., Сарычева Ю. А.

ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздрова РФ,  
Оренбург, Россия

В работе представлены изменения соотношений спонтанной и стимулированной продукции цитокинов спленоцитами мышей при сальмонеллезной инфекции на фоне введения милиацина. Выявленные сдвиги цитокинового баланса свидетельствуют о том, что в основе механизмов защитного действия милиацина при сальмонеллезной инфекции лежит активация Th-1-зависимого иммунного ответа, стимуляция продукции противовоспалительного цитокина – ИЛ-10 и ограничение секреции одного из наиболее значимых патогенетических факторов воспаления – ИЛ-17.

*Ключевые слова: милиацин, цитокины, сальмонеллезная инфекция.*

**Введение.** В настоящее время представляется перспективным использование биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих иммуномодулирующим действием с минимальными побочными эффектами. Среди последних заслуживают внимания тритерпеноиды как вещества с выраженной иммуностропной активностью.

К числу тритерпеноидов, нашедших практическое применение в медицине, относится милиацин, входящий в состав просяного масла. Экспериментально показано, что, обладая широким спектром биологической активности, милиацин стимулирует факторы неспецифической защиты, иммунный ответ, обладает антиоксидантной активностью [1, 2, 3].

Проведенные исследования показали также, что введение милиацина ослабляет тяжесть течения сальмонеллезной инфекции у мышей, вызванной *Salmonella enteritidis* [4]. Известно, что в реализации иммунного ответа на всех его этапах и развитии адекватной воспалительной реакции ведущая роль принадлежит регуляторным белкам – цитокинам. Учитывая множественность, а также синергизм и плеiotропность участвующих в этих реакциях цитокинов более корректной является одномоментная оценка уровня нескольких медиаторов (по меньшей мере, 2–3 из оппозитных подгрупп) с расчетом интегрального цитокинового индекса [5].

Целью работы явилось определение влияния милиацина на способность спленоцитов к продукции цитокинов с оценкой интегрального цитокинового индекса при экспериментальной сальмонеллезной инфекции.

**Материалы и методы.** Исследования выполнены на 120 мышах-самцах (СВАхС<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>) F1, поставленных из питомника «Столбовая». Милиацин вводили трехкратно внутрибрюшинно с интервалами в 3 дня между введениями в разовой дозе 2 мг/кг. Заражение животных выполняли внутрибрюшинным введением штамма *Salmonella enteritidis* госпитального происхождения в дозе  $2 \times 10^6$  бактерий на мышь, которое проводили через 24 часа после последнего введения тритерпеноида. Всего использовано 3 группы животных: I – интактные; II – зараженные; III – зараженные после введения милиацина. Продукцию цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, ИФН $\gamma$ ) определяли в супернатантах нестимулированных и стимулированных Кона культур спленоцитов на 10-е сутки инфекции методом ИФА с помощью наборов фирмы «eBioscience». Интегральный цитокиновый индекс (Иц) рассчитывался в соответствии с методическими рекомендациями [5]:  $Иц = I_1 + (I_2 - 1)$ , где  $I_1$  (у.е.) – среднее арифметическое значение индексов провоспалительных интерлейкинов,  $I_2$  (у.е.) – среднее арифметическое значение индексов противовоспалительных интерлейкинов. В настоящем исследовании  $I_1$  рассчитывался по уровню ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, ИФН $\gamma$ ;  $I_2$  – по содержанию ИЛ-4 и ИЛ-10. Статистическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики из пакета прикладных программ Microsoft Excel и Statistica 10,

статистические результаты выражали в виде медианы (Me), нижних ( $Q_{25}$ ) и верхних ( $Q_{75}$ ) квартилей. Уровни статистической значимости различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Заражение животных вызывало развитие инфекции, сопровождающейся гибелью 37,5% мышей (группа II), введение милиацина (группа III) снижало гибель мышей до 25,0%. У зараженных мышей (группа II) по сравнению с интактными (группа I) выявлено значительное увеличение спонтанной продукции ИЛ-6 (575%), ИФН $\gamma$  (407%), ИЛ-12 (261%) и ИЛ-18 (149%). Введение милиацина (группа III) увеличивало нестимулированную секрецию ИЛ-12 (181%) и ИФН $\gamma$  (143%) по сравнению с аналогичными показателями у зараженных мышей. Вместе с тем милиацин оказывал стимулирующее воздействие на спонтанную продукцию и противовоспалительного цитокина – ИЛ-10 (184% по отношению к зараженным животным). Исследование стимулированной продукции цитокинов выявило многократное повышение уровня ИФН $\gamma$ , ИЛ-17, ИЛ-12, ИЛ-10 у мышей II группы относительно тех же показателей у интактных животных. Милиацин оказывал дифференцированное влияние на индуцированную продукцию цитокинов: стимулирующий эффект для ИЛ-10, ИЛ-12 и супрессирующий – в отношении ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-17 у мышей III группы по сравнению с зараженными животными.

Проведенный анализ показал значимое повышение соотношений спонтанной и стимулированной продукции ИФН $\gamma$ /ИЛ-4, ИФН $\gamma$ /ИЛ-17, ИЛ-12/ИЛ-4 у мышей II, III групп относительно аналогичных соотношений у интактных животных (табл. 1).

Для соотношения ИФН $\gamma$ /ИЛ-10 выявлено достоверно повышение только индуцированной продукции у мышей II, III групп относительно животных I группы. При сравнении соотношений оппозитных цитокинов у мышей, получавших милиацин (группа III) по сравнению с животными II группы отмечалось значимое увеличение ИФН $\gamma$ /ИЛ-4 для спонтанной продукции, а так же значимое повышение соотношения ИФН $\gamma$ /ИЛ-17 для стимулированной продукции. Анализ цитокинового баланса на основе расчета интегрального

цитокинового индекса (Иц) для мышей всех исследуемых групп показал, что Иц для мышей III группы достоверно ниже аналогичного показателя у мышей II группы как для спонтанной продукции, так и для стимулированной продукции цитокинов.

Приведенные результаты анализа изменений значений интегрального цитокинового индекса под влиянием милиацина свидетельствуют о том, что использование тритерпеноида милиацина способствует установлению оптимального баланса цитокинов, отражающего снижение активности воспалительного процесса к 10 суткам экспериментального инфекционного процесса. Вместе с тем, анализ соотношений Th-1 и Th-2 типа цитокинов выявил, что увеличение продукции ИЛ-12 и  $\gamma$ -ИФН спленоцитами инфицированных животных прежде всего свидетельствует о том, что сальмонеллезная инфекция стимулирует Th-1-зависимый иммунный ответ. Снижение на этом фоне ИЛ-4 – показателя активации Th-2-клеток отражает

реципрокные отношения между данными субпопуляциями Т-лимфоцитов и подтверждает существующие представления о значимости клеточных механизмов иммунной защиты при этой патологии. Милиацин усиливает мобилизацию этих клеточных механизмов в виде дальнейшего увеличения как спонтанной, так и стимулированной продукции ИЛ-12 и  $\gamma$ -ИФН. Понижающий эффект милиацина в отношении ИЛ-17 мог быть обусловлен стимулирующим действием тритерпеноида на продукцию ИЛ-12, лимитирующего продукцию другого представителя данного семейства цитокинов – ИЛ-23, имеющего с ИЛ-12 общую субъединицу (p40). Снижение продукции ИЛ-17 выступает существенным механизмом защитного действия милиацина через ограничение участия данного цитокина в стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов, а также в мобилизации гранулоцитов, поддерживающей остроту воспалительной реакции и отражающей специфику Th-17-опосредованного воспаления

Таблица 1. Соотношение показателей продукции различных цитокинов спленоцитами исследуемых групп мышей

Группы животных	n	Продукция цитокинов	
		спонтанная	индуцированная
		Me (Q25-Q75)	Me (Q25-Q75)
ИФН $\gamma$ / ИЛ-4			
I	10	4,95 (2,28–9,50)	1,4 (0,88–2,83)
II	10	14,4 (12,6–20,1) *	92,4 (48,5–114,4) *
III	10	24,6 (23,5–28,38) *°	116,7 (76,0–245,5) *
ИФН $\gamma$ / ИЛ-10			
I	10	1,6 (0,85–5,63)	4,75 (4,1–6,5)
II	10	2,5 (1,20–7,90)	14,0 (9,7–40,1) *
III	10	4,8 (3,38–5,2)	18,2 (5,78–28,43) *
ИФН $\gamma$ / ИЛ-17			
I	10	2,65 (1,73–3,88)	4,5 (3,90–5,40)
II	10	6,1 (5,70–15,3) *	8,0 (6,9–14,60) *
III	10	7,85 (6,73–108,4) *	13,65 (9,25–21,88) *°
ИЛ-12/ИЛ-4			
I	10	6,8 (3,4–7,9)	9,25 (7,05–24,1)
II	10	16,3 (12,9–23,02) *	48,2 (11,4–136,9) *
III	10	12,7 (9,95–22,8) *	119,9 (88,08–196,6) *
Иц			
II	10	4,03 (2,16–5,17)	9,39 (4,52–10,17)
III	10	2,26 (1,62–3,32) °	4,69 (3,04–4,79) °

\*-p<0,05 с группой I; °-p<0,05 между группами III и II

Выявленные сдвиги цитокинового баланса свидетельствуют о том, что в основе механизмов защитного действия милиацина при инфекции, вызванной внутриклеточными грамотрицательными патогенами, лежит активация Th-1-зависимого иммунного ответа, стимуляция продукции противовоспалительного цитокина – ИЛ-10 и ограничение секреции одного из наиболее значимых патогенетических факторов воспаления – ИЛ-17.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кириллова А. В., Скачков М. В., Панфилова Т. В. и др. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2003, 6: 36-38.
2. Панфилова Т. В., Штиль А. А., Фролов Б. А. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2006, 141 (6): 633-635.
3. Фролов Б. А., Филиппова Ю. В., Панфилова Т. В., Чайникова И. Н., Калинина О. В. и др. Российский Иммунологический Журнал 2013, 7 (16), 2-3 (1), 96-98.
4. Фролов Б. А., Чайникова И. Н., Железнова А. Д. и др. Журнал Микробиология 2013, 6, 3-8.
5. Юдина Т. В., Сааркоппель Л. М., Крючкова Е. Н., Коновалов И. М., Мирзонов В. А. Определение цитокинового баланса при оценке состояния здоровья у работников промышленных предприятий. Методические рекомендации – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011, 17.

### CYTOKINE BALANCE IN ASSESSING THE IMPACT MILIACIN IN THE EXPERIMENTAL SALMONELLA INFECTION

**Filippova Y. V., Panfilova T. V., Ermolina E. V., Zheleznova A. D., Livshic N. M., Sarycheva Y. A.**

The investigation presents the changes in correlation of spontaneous and stimulated cytokine production by splenocytes of the mice with Salmonella infection after miliacin introduction. Identified cytokine balance shifts indicate that the mechanisms of the protective action of miliacin in the Salmonella infection are based on the activation of Th-1-dependent immune response, stimulation of the production of anti-inflammatory cytokine – IL-10 secretion and limiting the secretion of one of the most important pathogenetic factors of inflammation – IL-17.

*Key words: miliacin, cytokines, Salmonella infection.*

### АНТИГАНГЛИОЗИДНЫЕ АУТОАНТИТЕЛА И ДРУГИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЕМЬЕЛИНИЗИРУЮЩИХ ПОЛИНЕВРОПАТИЙ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ

**Шевченко А. В.**

*Кафедра неврологии ФУВ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия*

Важным на сегодняшний день является изучение иммунологических механизмов развития аутоиммунных невропатий, новых возможностей ранней диагностики и прогнозирования течения, создание оптимальных алгоритмов патогенетической и восстановительной терапии. В данной работе мы определяли уровни IgG и IgM аутоантител к ганглиозидам (асиало-GM1, GM1, GM2, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub>, и GQ<sub>1b</sub>); интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО- $\alpha$ ); специфических IgG и IgE к основному белку миелина (ОБМ) и общего IgE в сыворотке детей больных хроническими воспалительными демиелинизирующими полиневропатиями (ХВДП), рассеянным склерозом (РС) с полиневропатией и наследственной моторно-сенсорной невропатией (НМСН) 1 типа для проведения сравнительного анализа.

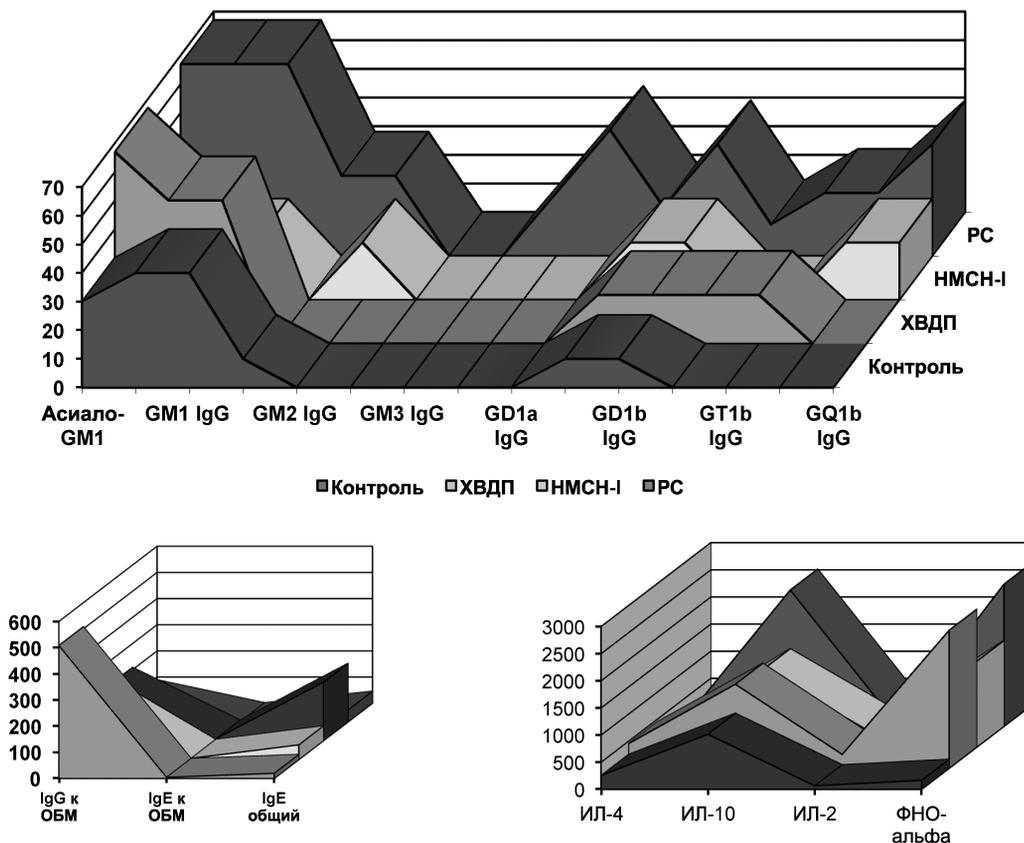
*Ключевые слова:* антиганглиозидные аутоантитела, хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия, рассеянный склероз.

**Введение.** В последние годы наблюдается отчетливое увеличение числа случаев заболеваний, сопровождающихся повреждением миелина, таких как демиелинизирующие невропатии, рассеянный склероз, острый рассеянный энцефаломиелит и др. Изучение демиелинизирующих заболеваний является одним из приоритетных направлений в отечественной и мировой неврологии.

Хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (ХВДП) – является приобретенной иммуноопосредованной невропатией, в основе которой лежит иммуннопатологический процесс. Актуальность исследования продиктована, прежде всего, трудностью диагностики и дифференциальной диагностики ХВДП в детском возрасте. Проблема ранней диагностики и целенаправленного лечения данной категории больных имеет огромное практическое значение в связи с курбельностью заболевания, течение и исход которого во многом определяются сроками начала лечения. Своевременно назначенная специфическая терапия приводит

к значительному уменьшению процента инвалидизации и улучшению качества жизни таких пациентов. Трудности возникают преимущественно в дифференциальной диагностике ХВДП с наследственными демиелинизирующими полинейропатиями, а именно наследственной моторно-сенсорной невропатией 1 типа (НМСН 1 типа).

Поражение периферической нервной системы, кроме того, описано при рассеянном склерозе (РС), в патогенезе которого, также как при ХВДП, ведущее значение имеют аутоиммунные реакции и хронический воспалительный процесс. В то же время, в большинстве случаев у больных ХВДП выявляется центральная демиелинизация, что подтверждается данными магнитно-резонансной томографии (МРТ) и исследованием вызванных потенциалов (зрительных, акустических, соматосенсорных). Возможны как возникновение полинейропатии через несколько лет после дебюта рассеянного склероза, так и обратная ситуация – возникновение рассеянного склероза у пациентов с хронической полинейропатией. Описаны случаи



**Рисунок 1.** Сравнительный анализ уровней антиганглиозидных аутоантител, цитокинов и антител к ОБМ у обследованных больных (в %) у обследованных больных (n=41)

сочетания РС и ХВДП. Все вышеперечисленное ставит вопрос об общности механизмов поражения миелина при данных заболеваниях.

Следовательно, актуальным на сегодняшний день является изучение иммунологических механизмов развития ХВДП и других демиелинизирующих заболеваний, новых возможностей ранней диагностики и создание на их основе оптимальных алгоритмов патогенетической и восстановительной терапии.

**Целью** исследования было проведение сравнительного анализа клинко-электронейромиографических и иммунологических параметров у детей с ХВДП, НМСН 1 типа, РС с синдромом полиневропатии.

**Материалы и методы.** Проведено комплексное клинко-нейрофизиологическое и иммунологическое исследование детей с ХВДП (n=12), РС с полиневропатией, подтвержденной данными электромиографии (n=20), НМСН 1 типа (n=8). Контрольная группа – практически здоровые дети (n=10). Иммунологическое исследование включало: определение уровней IgG и IgM к ганглиозидам (асиало-GM1, GM1, GM2, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub>, и GQ<sub>1b</sub>); интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО-α); специфических IgG и IgE к основному белку миелина (ОБМ) и общего IgE в сыворотке крови.

**Результаты и обсуждение.** Согласно полученным результатам: ХВДП в детском возрасте носит преимущественно смешанный моторно-сенсорно-вегетативный (по данным ЭНМГ демиелинизирующе-аксональный) характер, ремиттирующий тип течения, может отмечаться субклиническое поражение центральной нервной системы, которое подтверждается результатами исследования вызванных потенциалов разной модальности (58,3%), а также данными МР-исследования головного мозга (25%), выявляется высокий уровень аутоантител к ганглиозидам определенных групп (асиало-GM1, GM1) причем, положительные IgM определяются только в период обострения заболевания (рецидив заболевания по данным клинического осмотра); доказано наличие аутоиммунных реакций к компонентам периферической нервной системы у детей с рассеянным склерозом (анти- GQ<sub>1b</sub>, анти-GD<sub>1a</sub> аутоантитела), которые приводят к клинически выраженному, либо субклиническому (подтвержденному электронейромиографически) синдрому полиневропатии; выявлен невысокий уровень ИЛ-2 и ФНО-α, а также достоверное повышение ИЛ-4

в сыворотке больных ХВДП и РС в ремиссии (по данным клинического неврологического осмотра), соответственно определение уровней цитокинов может косвенно свидетельствовать об остроте аутоиммунного процесса; выявлено значительное увеличение уровня IgG к ОБМ при РС и ХВДП (рис.1); доказано, что при НМСН 1 типа не отмечается иммунологических сдвигов, характерных для ХВДП, что может быть использовано при проведении дифференциальной диагностики данных заболеваний; показано, что паттерн нарушений нервной проводимости при ХВДП у детей отличается от паттерна проведения при НМСН 1 типа. При ХВДП у детей на фоне снижения проведения импульса характерно появление блоков проведения, в то время как при наследственных невропатиях скорость проведения снижается равномерно по всей длине нерва, а блоки проведения являются редкой находкой. Предложены дифференциально-диагностические электромиографические маркеры ХВДП и НМСН 1 типа.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что при ХВДП в патологический процесс может вовлекаться центральная нервная система, а при РС периферические нервы. Доказано наличие субклинических вариантов поражения периферической нервной системы у больных РС, выявляемых только электронейромиографически (демиелинизирующий и смешанный демиелинизирующе – аксональный варианты полиневропатии), что следует учитывать при проведении дифференциальной диагностики и терапии. Показано, что наличие синдрома полиневропатии не исключает возможность развития РС. Выявленный высокий уровень антиганглиозидных аутоантител, а также IgG к ОБМ в сыворотке больных ХВДП и РС свидетельствуют о схожих иммунопатологических реакциях в патогенезе данных заболеваний, что расширяет знание их патогенетических механизмов и обосновывает новые подходы патогенетической терапии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гехт Б. М., Касаткина Л. Ф., Меркулова Д. М., Самойлов М. И. Журн. неврол. и психиатр. им. Корсакова. – 2000. – № 11. – С.10-14.
2. Пономарев В. В., Антонов И. П., Антоненко А. И., Овсянкина Г. И., Ходулев В. И. Поражение центральной нервной системы при хронических воспалительных демиелинизирующих полиневропатиях. Журн. Неврол. и психиатр. 2002;102:11:17-19.

3. Allen D, Giannopoulos K, Gray I, Gregson N, Makowska A, Pritchard J, Hughes RA. Antibodies to peripheral nerve myelin proteins in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2005 Jun; 10 (2):174-80.
4. Joint Task Force of the EFNS and the PNS. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2005 Sep; 10 (3):220-8.
5. Lewis RA. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and other immune-mediated demyelinating neuropathies. *Semin Neurol.* 2005 Jun; 25 (2):217-28.
6. Laura M, Leong W, Murray NM, Ingle G, Miszkil KA, Altmann DR, Miller DH, Reilly MM. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: MRI study of brain and spinal cord. *Neurology.* 2005 Mar 8; 64 (5):914-6.
7. Pearce J, Pitt M, Martinez A. A neonatal diagnosis of congenital chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Dev Med Child Neurol.* 2005 Jul; 47 (7):489-92.
8. Pardo J. Antiganglioside antibodies in peripheral neuropathies *Neurologia.* 2001 Aug-Sep; 16 (7):289-92.
9. Sander HW, Latov N. Research criteria for defining patients with CIDP. *Neurology.* 2003 Apr 1; 60 (8 Suppl 3): S8-15.
10. Alan R. Berger et al. Peripheral neuropathy a practical approach to diagnosis and management. – 2001- P.85-109.
11. Ouvrier R. A., McLeod J.G., Pollard J.D. Peripheral neuropathy in childhood. – 1999- P.55-66.

## ANTIGANGLIOSIDE AUTOANTIBODIES AND OTHER IMMUNOLOGIC MARKERS OF DEMYELINATING POLYNEUROPATHIES IN CHILDREN

Shevchenko A. V.

*Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU)*

Today it is critical to study the immunologic mechanisms of autoimmune neuropathies and new opportunities for their early detection and clinical course forecasting, to develop best algorithms of pathogenetic and after-care treatment. The aim of our study is investigation of clinical presentation, neurophysiological tests data, and immunological parameters of CIDP in childhood. Levels of IgG and IgM autoantibodies against gangliosides (asialo- GM1, GM1, GM2, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub>, and GQ<sub>1b</sub>); interleukins (IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α); specific IgG and IgE against myelin basic protein (MBP) and total serum IgE of children with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies (CIDP), multiple sclerosis (MS) with polyneuropathy and hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN) Type I were measured for comparative analysis.

*Keywords: antiganglioside autoantibodies, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, multiple sclerosis.*

## ПРОДУКЦИЯ ЭНДОГЕННЫХ ЦИТОКИНОВ И ЭРИТРОПОЭЗ В КУЛЬТУРЕ ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ

Шевяков С. А., Захаров Ю. М.

*Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, кафедра нормальной физиологии, Челябинск, Россия*

Исследована динамика продукции эндогенного эритропоэтина (ЭП), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) в культурах эритробластических островков (ЭО), стимулированных экзогенным эритропоэтином.

*Ключевые слова:* эритропоэтин, ИЛ-6, ФНО-α, эритробластический островок.

**Введение.** В регуляции эритропоэза в ЭО ми положительной и отрицательной обратной связи [1]. Реализация молекулярно-клеточных

механизмов этих связей в ходе полицитемии как в опытах *in vivo*, так и *in vitro* сопровождается торможением эритропоэза в ЭО, что вызвано увеличением продукции ФНО- $\alpha$  центральными макрофагами ЭО, раздраженными избыточной массой введенных эритроцитов [5, 7]. ИЛ-6 наряду с ЭП участвует в балансировании угнетающих эритропоэз свойств ФНО- $\alpha$ , уменьшающих пролиферацию и созревание эритроидных клеток в ЭО. ФНО- $\alpha$  активирует также экспрессию гена ИЛ-6 в макрофагах [1, 2]. Мы исследовали продукцию культурами ЭО эндогенных ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  и ЭП и возможную роль соотношения этих цитокинов в реализации механизма авторегуляции эритрона в культуре.

**Материалы и методы.** ЭО выделяли из костного мозга бедренных костей беспородных крыс обоего пола (массой 120г) и культивировали в чашках Петри ( $10^4$  ЭО на 1 мл. культуральной среды) по [6] в мультигазовом инкубаторе MCO-18M фирмы SANYO (Япония) при температуре 37 °С с содержанием в атмосфере инкубатора 4,5% CO<sub>2</sub>. Среда для культивирования ЭО включала сыворотку эмбриона телёнка, среду RPMI-1640, меркаптоэтанол, антибиотики и ЭП «Resorpton» фирмы Roche. ЭП вносили в культуральную среду в дозе 500 мЕ/мл. ЭО культивировали в течение 24, 48 и 72-х часов. Контроль – некультивированные ЭО (0 часов),

выделенные и приготовленные так же, как и ЭО для культивирования. Концентрацию ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  и ЭП определяли в только что приготовленной среде для культивирования (контроль), и в культуральной среде на 24-й, 48-й и 72-часы культивирования. Всего исследовано 48 культур ЭО. Для определения ИЛ-6 в культуральной среде использовали набор реактивов «rat IL-6 ELISA» компании Bender MedSystems (Austria), содержащий моноклональные антитела к крысиному ИЛ-6; ФНО- $\alpha$  – набор реактивов «rat TNF-  $\alpha$  ELISA» компании Bender MedSystems (Austria), содержащий моноклональные анти-ФНО- $\alpha$  -антитела к крысиному ФНО- $\alpha$ ; ЭП – метод двухсайтового твердофазного иммуноферментного анализа с помощью набора реактивов «Biomerica EPO ELISA» (Германия), включающего биотинилированные и конъюгированные с пероксидазой хрена мышинные моноклональные анти-EPO-антитела, с рекомендуемыми фирмами-производителями регламентами определения. Для подсчёта количества ЭО в культурах препараты фиксировали метанолом и окрашивали по Паппенгейму. ЭО в препаратах подразделяли на 5 классов зрелости в зависимости от степени зрелости эритроидной «короны» и количества эритроидных клеток, входящих в её состав [3]. Статистическую обработку результатов исследований

**Таблица 1.** Соотношение эндогенного эритропоэтина и эндогенных цитокинов в культурах ЭО костного мозга крыс

Длительность культивирования	ЭП/ФНО- $\alpha$	ЭП/ИЛ-6	Абсолютное к-во ЭО (ЭО/чашку)	ЭО1 (%)	ЭО2 (%)	ЭО3 (%)	ЭОинв (%)	ЭОрек (%)
Контроль (0 часов) n=6	500мЕ/мл / 10,83пг/мл, соотношение 42:1	500мЕ/мл / 14,03пг/мл, соотношение 36:1	3061±42,70	3,2±0,12	3,83±0,27	13,0±0,57	59,66±1,5	19,0±0,44
24 часа n=6	156,12 мЕ/мл / 21,5 пг/мл соотношение 7,3:1	156,12 мЕ/мл / 25,13 пг/мл соотношение 6:1	3233±21,97	3,2±0,11	4,0±0,23	19,33±1,20*	58,16±1,20	14,33±0,95*
48 часов n=6	285,42 мЕ/мл / 24,16 пг/мл соотношение 11,8:1	285,42 мЕ/мл / 33,56 пг/мл соотношение 9:1	3123±45,45	4,3±0,21*	4,16±0,3	17,6±1,02	46,66±2,31*	23,5±1,14*
72 часа n=6	287,05 мЕ/мл / 43,50 пг/мл соотношение 6,6:1	287,05 мЕ/мл / 35,54 пг/мл соотношение 8:1	2523,5±54,07*	2,33±0,04	3,33±0,12	21,5±0,54*	50,25±1,29*	26,83±0,87*

Примечание: \* – обозначены достоверные различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

проводили, рассчитывая среднее значение ( $M$ ), стандартную ошибку ( $m$ ), критерий интегральных различий Колмогорова-Смирнова, критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса, точный критерий Фишера. Различия считались достоверными при 95% уровне значимости ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** По мере развития культур ЭО отмечается синхронное увеличение концентрации ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6 в культуральной среде, однако с большим подъемом ФНО- $\alpha$  на 72 час. Концентрация ЭП после первоначального уменьшения к 24 часу развития культуры, резко увеличилась к 48 часу и удерживалась на этом уровне до 72 часа. Соотношение ЭП/ИЛ-6 и ЭП/ФНО- $\alpha$  синхронно и резко уменьшалось на 24 час культивирования. Затем следовал рост соотношения ЭП/ИЛ-6 на 48 и 72 часы культивирования. Соотношение ЭП/ФНО- $\alpha$  возрастало только на 48 час и затем почти вдвое (по сравнению с 48 часом) уменьшалось к 72 часу культивирования (табл. 1). Увеличение соотношения ЭП/ИЛ-6, которое составило к 48-му часу 9:1, мы объясняем стимуляцией эритропоэза на 48-й час культивирования, приводящей к резкому увеличению продукции ЭП культурой [4]. Следствием этого является активация комплексации колониеобразующих единиц эритроцитарных (КОЕэ) и резидуальных макрофагов (т.е. формированием ЭО *de novo*) и с макрофагами зрелых островков (т.е. усиливается формирование ЭО *de repeto*). Рост концентрации ИЛ-6 и двукратный рост концентрации ФНО- $\alpha$  в культурах на 72-й час эксперимента, напротив, сочетался с торможением новообразования ЭО (снижением количества ЭО I класса (по сравнению с 48-м часом культивирования), т.е. замедлялось формирование ЭО *de novo*. Достоверно же большее содержание реконструирующихся ЭО на 72 час по сравнению с контролем и 24-часовыми культурами при отсутствии достоверных отличий от 48-часовых культур свидетельствует о поддержании про-

цессов реконструкции эритропоэза в ЭО несмотря на рост в культуральной среде ФНО- $\alpha$ . Этот феномен можно объяснить тем, что несмотря на двукратный рост ФНО- $\alpha$  в культуре поддерживалась и продукция ЭП, в результате чего соотношение ЭП/ФНО- $\alpha$  составило 6,6:1. Источником ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  в наших экспериментах могут быть центральные макрофаги ЭО, активированные поглощаемыми ядрами нормобластов, созревающих в ретикулоциты [2]. Поэтому, поддержание образования реконструирующихся ЭО мы объясняем продолжением продукции культурами как эндогенного ЭП, так и исследуемых цитокинов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров Ю. М. Роль обратных связей в регуляции эритропоэза. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 92 (9): 1033-1045. 2006.
2. Захаров Ю. М. Регуляция эритропоэза в эритробластических островках костного мозга. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 97 (9): 980-994. 2011.
3. Захаров Ю. М., Мельников И. Ю., Рассохин А. Г. Классификация эритробластических островков с учётом изменения их клеточного состава. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 98 (5): 38-42. 1990.
4. Шевяков С. А., Захаров Ю. М. Исследование динамики концентрации эритропоэтина в культурах эритробластических островков. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 95 (11): 1207-1215. 2009.
5. Шевяков С. А., Захаров Ю. М. Исследование роли фактора некроза опухоли-альфа в регуляции эритропоэза в культуре эритробластических островков. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 99 (8): 993-1001. 2013.
6. Zakharov Y., Prenant M. Technique d'isolement et de culture des îlots erythroblastiques separation du macrophage central. Nouv. Rev. Fr. Hematol. 24 (3): 363-367. 1982.
7. Zakharov Yu. M., Prenant M. Influence des surnageants de culture de macrophages provenant des îlots erythroblastiques sur l'erythropoiese du rat. Nouv. Rev. Fr. Hematol. 25 (1): 17-22. 1983.

## ENDOGENIC CYTOKINES PRODUCTION AND ERYTHROPOIESIS IN ERYTHROBLASTIC ISLANDS IN CULTURES.

S. A. Shevyakov, Yu. M. Zakharov

*Southern Ural state medical university of Ministry of Health of Russia, chair of normal physiology, Chelyabinsk, Russia*

Dynamic changes of endogene production of erythropoietin, interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in cultures of erythroblastic islands, stimulating by exogen erythropoietin. Key words: erythropoiesis, erythropoietin, IL-6, TNF- $\alpha$ , erythroblastic island.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

Широбокова М. В., Чукичев А. В., Злакоманова О. Н.

ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия

Статья посвящена исследованию цитокинового профиля и маркеров воспаления, в частности, оценке динамики иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-10, СРБ, прокальцитонина и кортизола при раневом процессе синдрома диабетической стопы. Полученные нами результаты изучения динамики некоторых показателей цитокинового спектра и маркеров воспаления изменяют причинно-следственные представления о неэффективности эффекторного звена иммунитета у больных с неблагоприятным течением сахарного диабета, что предопределяет роль дисфункции иммунной системы как ведущего патогенетического звена СД и диктует необходимость своевременной диагностики и коррекции.

*Ключевые слова:* СДС, ИЛ-6, ИЛ-10, СРБ, кортизол, прокальцитонин.

**Введение.** Сахарный диабет и облитерирующий атеросклероз – распространенные заболевания, которые существенно сокращают продолжительность жизни. Ангиопатии, развивающиеся при сахарном диабете, часто приводят к инвалидности и летальному исходу. Особенностью данных сосудистых поражений является ранний дебют, агрессивное течение и преобладание дистального типа поражения [2]. Одним из патогенетических факторов развития считается воспаление, однако, степень активности воспалительного процесса при сахарном диабете остается малоизученной. Воспаление является неспецифической, но стереотипной и универсальной реакцией эндотелия на повреждение при воздействии различных факторов, как эндогенного, так и экзогенного характера (микроорганизмы, антибактериальные препараты, высокие уровни гормонов, глюкозы). По мнению Скурковича С. В. и др. (2003) «каждое нарушение гомеостаза, вызываемое внешними или внутренними факторами, следует рассматривать на предмет выявления его потенциальных возможностей повреждения цитокиновой системы и формирования диабетических осложнений». Высокие уровни глюкозы и ее дериватов, назначение инсулина и других гипогликемических препаратов может способствовать увеличению продукции цитокинов при СД. Цитокины

необходимы для адекватного формирования воспалительного ответа, однако чрезмерно высокие их уровни могут приводить к гибели организма [2]. Наличие изменения уровня одного цитокина индуцирует изменение содержания других видов цитокинов. Цитокины могут действовать как непосредственно на островки Лангерганса, так и опосредованно, регулируя содержание, функции и миграцию различных иммунорегуляторных клеток, а также в поддержании гомеостаза иммунной системы всего организма.

**Целью** настоящей работы является оценка уровней иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-10 и маркеров воспаления (СРБ, прокальцитонин и кортизол) в течение раневого процесса при синдроме диабетической стопы.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служила сыворотка крови 90 пациентов с сахарным диабетом. Исследование проводилось по типу контроль – опыт. Было сформировано две группы больных: первая (n=60) – пациенты с гнойно-некротическим процессом, нейроишемическая форма синдрома диабетической стопы (СДС); вторая группа – больные сахарным диабетом без СДС (n=30). Средний возраст больных составил 58±12 лет, среди них 62% были женщины. Сахарный диабет I типа был у 0,74%, в остальных 99,26% случаев доминировал са-

харный диабет II типа. Общий стаж заболевания СД среди изучаемой популяции составил  $12 \pm 3,5$  года (8–15 лет). Средняя длительность существования СДС у данной категории пациентов была  $5,3 \pm 2,1$  года (3–7 лет). Среди больных с гнойно-некротическим процессом СДС преобладают пациенты с язвой и гангреней. Все пациенты были сопоставимы по сопутствующим заболеваниям. Концентрация С-реактивного белка (СРБ) определялась полуколичественным методом латекс-агглютинации (реактивы фирмы ОльвиксДиагностикум). Уровень прокальцитонина (ПКТ) определялся количественным иммунолюминиметрическим методом. Содержание интерлейкинов (ИЛ-6, 10) в сыворотке крови определяли методом ИФА (реактивы фирмы Biosource). После определения сывороточных концентраций цитокинов рассчитывали индекс реактивности (ИР) – степень превышения исследуемого показателя по отношению к норме. Статистический анализ проводился с использованием пакетов программ «Statistica 6,0» и MSExcel 2000.

**Результаты и обсуждение.** Исследования показали, спонтанная продукция цитокинов клетками периферической крови значительно повышена, что является признаком их активации *in vivo*. Нами зарегистрирована статистически значимая гиперцитокинемия за счет как про-, так и противовоспалительных цитокинов (таб. 1).

Исследования показали, что развитие СД сопровождается почти 20-ти кратным увеличением ИЛ-6, который по биологическому действию является провоспалительным, при этом уровень его антагониста ИЛ-10 увеличивается ещё более значимо, экстремально высокие уровни показателей более 180 кратное превышение нормы. При развитии гнойно-некротических осложнений отмечается инверсия уровня изучаемых показателей, при

этом антагонист ИЛ-10 резко падает, хотя не достигает нормальных цифр, в то время как ИЛ-6 начинает резко возрастать и его уровень превышает норму почти в 200 раз. Полученные данные свидетельствуют о том, что появление гнойно-некротических осложнений (диабетические язвы) сопровождается резким дисбалансом про- и противовоспалительных интерлейкинов, что может быть использовано для ранней диагностики гнойных осложнений СД.

ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и др. накапливаются в крови при интенсивных воспалительных процессах и адекватно отражают тяжесть их течения [7]. Стимуляция выработки ИЛ-6 у больных без гнойно-некротических осложнений, вероятно, связана с метаболическими нарушениями, сопровождающими сахарный диабет, в частности избыточная масса тела. Известно, что 25% циркулирующего в крови ИЛ-6 синтезируется подкожной жировой клетчаткой. Экстремально высокое содержание ИЛ-6 при сахарном диабете обуславливает изменение продукции других цитокинов, являясь, в частности, активатором ИЛ-10, ИЛ-17 [9]. По мнению Саприной Т. В. и соавт. (2012), высокие уровни ИЛ-10 и других цитокинов данной группы характерны для ранних стадий заболевания и свидетельствует о повышенной супрессорной активности мононуклеарных лейкоцитов при СД, которая возможно имеет протективное значение и сдерживает развитие клинических симптомов осложнений сахарного диабета. Характеризуя роль ИЛ-6 Лутай М. И. (2004) [4] сообщает о нем, как о гепатоцитактивирующем факторе. Учитывая это обстоятельство, нами были изучены маркеры воспаления гепатотропного происхождения – СРБ, прокальцитонин в динамике раневого процесса у пациентов в послеоперационном периоде.

Таблица 1. Показатели спонтанной продукции цитокинов и индекса реактивности

Показатели	Норма	Группы исследования	
		1 группа (60)	2 группа (30)
ИЛ-6, нг/мл	$5,71 \pm 0,82$	<b><math>1000,9 \pm 112,6^*</math></b>	$120,54 \pm 3,6^*$
ИР ИЛ-6	0	>200	>20
ИЛ-10, нг/мл	$4,98 \pm 0,51$	$110,16 \pm 35,13$	<b><math>941,89 \pm 62,5^*</math></b>
ИР ИЛ-10	0	>20	>180

\* – достоверность различия показателей между предыдущей и последующей группами при  $p < 0,05$ .

Уровни СРБ и прокальцитонина изучали перед операцией на 1, 3, 5, 7 сутки послеоперационного периода. Показатели СРБ у пациентов 1 группы в предоперационном периоде были достоверно выше нормы и составили  $30,2 \pm 6,2$  мг/л, что коррелировало с тяжестью раневого процесса. После операции отмечалось снижение уровня СРБ, при этом динамика снижения СРБ отличалась у пациентов с осложненным и неосложненным сахарным диабетом, и нормализация данного показателя наступала у пациентов с СДС – только к 7 суткам. Динамика изменения содержания СРБ и прокальцитонина в сыворотке крови отличались друг от друга у 1 и 2 групп. Уровень ПКТ на момент госпитализации (предоперационный период) у пациентов 1 группы составил  $324,56 \pm 28,4$  нг/мл. В послеоперационном периоде ПКТ достоверно снижался, но не достигал нормальных значений, особенно у пациентов 1 группы, что на наш взгляд, отражало неэффективность санирующей операции (22 из 60 пациентов 1 группы потребовались повторные операции). Для характеристики степени воспалительной реакции наряду с гуморальными показателями (уровень цитокинов), определяли и гормональные показатели (содержание кортизола в плазме крови пациентов). Анализ выявил наличие сильной прямой корреляционной зависимости уровня кортизола от индекса реактивности исследуемых цитокинов ( $r = +0,67$ ,  $p < 0,05$ ) у пациентов СД (КР = 8, кортизол – 680 нмоль/л), и еще более сильной, но обратной корреляционной зависимости ( $r = -0,81$ ,  $p < 0,05$ ) у больных с гнойно-некротическими осложнениями СД (КР = 11, кортизол – 238 нмоль/л). Эти данные доказывают участие цитокинов в регуляции выработки гормонов и маркеров воспаления. С одной стороны, высокие уровни кортизола у пациентов с длительным стажем СД на фоне гиперцитокинемии ИЛ-10 свидетельствуют о продолжительном хроническом воспалении с высоким риском развития гнойных осложнений. В то время как, падение кортизола более чем в 2 раза у пациентов с развившимися гнойно-некротическими осложнениями на фоне гиперцитокинемии ИЛ-6 указывает на истощение гормональных регуляторов воспаления и наличие относительной надпочечниковой недостаточности.

Появление экстремально высоких концентрации ИЛ-6 на фоне гиперпродукции СРБ и прокальцитонина являются прогностическими неблагоприятными признаками течения сахарного диабета, а также высоким риском развития воспалительных органных поражений. Высокий уровень ИЛ-10 свидетельствует о преобладании деструктивных процессов в течение хронического воспаления в ране, что, по данным Варюшиной Е. А. с соавт. (2007), препятствует эффективному заживлению хронической раны даже после оперативного вмешательства.

**Заключение.** Таким образом, дисфункция иммунной системы, в частности, ее цитокиновой регуляторной сети является ведущим звеном, что объясняет высокую частоту развития тяжелых гнойно-септических осложнений сахарного диабета и диктует необходимость своевременной диагностики и коррекции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варюшина Е. А., Москаленко В. В., Симбирцев А. С., Лебедева Т. П., Бубнов А. Н. Ранозаживляющее и местное иммуностимулирующее действие рекомбинантного ИЛ-1 $\beta$  человека при применении у больных с длительно незаживающими ранами и трофическими язвами. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 54-61.
2. Куликова А. Н. Роль воспаления в атерогенезе при сахарном диабете (обзор литературы) // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 14-19.
3. Лутай М. И. Атеросклероз: современный взгляд на патогенез. // Украинский кардиологический журнал. – 2004. – № 1. – С. 22-34.
4. Саприна Т. В., Лазаренко Ф. Э., Прохоренко Т. С., Рязанцева Н. В., Ворожцова И. Н. Особенности продукции Th 1/Th 2-профиля у пациентов с различными клиническими вариантами аутоиммунного сахарного диабета // Цитокины и воспаление. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 51-57.
5. Симбирцев, А. С. Цитокины: классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление, 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16-23.
6. Скуркович С. В., Скуркович Б. С., Kelly J. A. Антицитокиновая терапия – новый подход к лечению аутоиммунных заболеваний и цитокиновых нарушений // Вопр. Гематол. Онкол. Иммунопатол. Впедиатрии. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 71-80.
7. Weaver C. T., Hatton R. D. Interplay between the Th17 and Treg cell lineages: a (co) -evolutionary perspective

## RESEARCHING OF CYTOKINE PROFILE PATIENTS WITH DIABETIC FOOT

M. V. Shirobokova, A. V. Chukichev, O. N. Zlakomanova

*GBOU VPO YUUGM of Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia*

This review is dedicated to the research of cytokine profile and inflammatory markers, especially, to the assessment dynamics of immunoregulatory cytokine IL-6, IL-10, CRP, procalcitonin and cortisol during the wound process of diabetic foot. The results of dynamics' indices of cytokine spectrum and inflammatory markers reconsider cause-and-effect submissions regarding to ineffectiveness effector component of immune system of patients with unfavourable course of diabetes mellitus, that is predetermine disfunction role of the immune system as a leading pathogenetic part of DM and necessitates well-timed diagnostics and remodelling.

*Keywords: SDS, IL-6, IL-10, SRB, cortisol, pro-calcitonin.*

## ИММУННЫЙ СТАТУС ЖЕНЩИН ПРИПОЛЯРЬЯ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ПРОЛАКТИНА

Щёголева Л. С., Туманова М. С., Шашкова Е. Ю.,  
Филиппова О. Е.

*Лаборатория физиологии иммунокомпетентных клеток, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт физиологии природных адаптаций Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия*

Представляло интерес изучить состояние иммунологической реактивности у женщин северянок с учетом гормона пролактина в зависимости от возраста, проживающих в экстремальных климато-экологических условиях Приполярного региона Европейского Севера РФ. У молодых женщин регистрируется увеличение цитотоксической и пролиферативной, В-клеточной активности и апоптоза. У женщин среднего и старшего возраста регистрируется снижение иммуносупрессии (CD8<sup>+</sup>), повышение киллерной (CD16<sup>+</sup>), цитокиновой (CD25<sup>+</sup>) активности на фоне увеличения рецепторов к трансферрину (CD71<sup>+</sup>) и резкого снижения с возрастом процессов апоптоза (CD95<sup>+</sup>), ( $p < 0,01$ ).

*Ключевые слова:* Приполярье, Пинега, женщины, иммунная система, пролактин.

Влияние социальных и экологических факторов внешней среды откладывает отпечаток на показатели здоровья женщин на Севере, в частности на иммунную и репродуктивную системы [2, 3, 6]. Состояние здоровья женщин на Севере вызывает тревогу в связи с уменьшением рождаемости [1]. Иммунная система является наиболее чувствительной, индикатором адаптационных реакций организма, отражающая степень напряжения в ответ на любое воздействие среды стрессорного характера, что проявляется дефицитом содержания Т-лимфоцитов, высокими уровнями лимфопротерии [2, 3, 4]. Северный профиль иммунного статуса характеризуется дефицитом

содержания Т-клеток CD5<sup>+</sup>, тенденцией к росту лимфопротерии CD10<sup>+</sup>-клеток [1, 2, 5, 6]. Пролактин, являющийся одним из главных гормонов в женской репродуктивной системе, влияет на овуляторные циклы женщины, обеспечивает защиту иммунной системы от инфекций и воспаления. При гиперпролактинемии нарушаются менструальные циклы женщины, развивается бесплодие. Понижение содержания пролактина может указывать на недостаточную функцию гипофиза [1].

Известно, что для Севера не характерны случаи ранних беременностей и родов. В настоящее время средний возраст женщин при рождении первого ребенка увеличился до 29-35

лет. Представляло интерес изучить состояние иммунологической реактивности у женщин – северянок с высоким содержанием гормона пролактина в зависимости от возраста.

Обследована 71 женщина в возрасте 18-50 лет с высокими концентрациями пролактина в крови, жительниц п. Пинега, Архангельской области, из них 13 женщин в возрасте 18-29 лет, 24 женщины в возрасте 30-40 лет, 34 женщины в возрасте 41-50 лет.

Комплекс иммунологического обследования включал изучение гемограммы, фенотипирование лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>) с помощью непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител (НПЦ «МедБиоСпектр», Москва) на препаратах лимфоцитов типа «высушенной капли». Кровь для анализа иммунного статуса брали из локтевой вены в объеме 6 мл в 9–10 часов утра, натощак. Забор крови осуществляли в вакутайнеры с литий-гепарином фирмы «IMPROVACUTER». Определение уровня содержания гормона пролактина проведено с помощью метода иммуноферментного анализа с помощью набора «HumanGmbH», Германия. Проведена статистическая обработка с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 10, Statistika 6.0.

Анализ иммунного статуса у женщин с высоким содержанием пролактина (16,21±3,46 нг/мл, 15,56±3,73 нг/мл, 16,93±2,5 нг/мл у женщин молодого, среднего и старшего возраста соответственно), показал, что у общее количество лейкоцитов у женщин 18-29 лет, жительниц п. Пинега в среднем составляет 6,1±0,48·10<sup>9</sup>к/л; у женщин в возрасте 30-39 лет, данный показатель составляет 5,33±0,32·10<sup>9</sup>к/л и находится в нижней границе физиологической нормы, у женщин в возрасте 40-50 лет, данный показатель немного выше и составляет 5,41±0,32·10<sup>9</sup>к/л.

Средняя концентрация лимфоцитов у жительниц п. Пинега 18-29 лет, составляет 2,74±0,32·10<sup>9</sup> к/л, причем у 30% обследуемых женщин концентрация лимфоцитов повышена, у 10% понижена; у жительниц в возрасте 30-39 лет, содержание общего количества лимфоцитов составляет 2,45±0,14·10<sup>9</sup>к/л, что приближается к нижним границам нормы. Выяснено, что 4% из них, имеют дефицит лимфоцитарной защиты. У женщин старшей возрастной группы (40-50 лет) данный показатель значительно ниже и составляет 2,32±0,15·10<sup>9</sup> к/л. Таким образом,

уровень лейкоцитов и лимфоцитов у женщин молодого возраста несколько выше, чем у других возрастных групп.

Во всех возрастных группах концентрация клеток CD3<sup>+</sup> и CD5<sup>+</sup> ниже общепринятых физиологических норм. Так средние уровни содержания лимфоцитов с рецепторами CD3<sup>+</sup> у женщин 18-29 лет составляют 0,64±0,14·10<sup>9</sup> к/л, у средней и старшей возрастной группы данный показатель 0,5±0,04·10<sup>9</sup> к/л и 0,57±0,05·10<sup>9</sup> к/л соответственно. Концентрация лимфоцитов с рецептором CD5<sup>+</sup> составляет у молодых женщин 0,73±0,13·10<sup>9</sup> к/л, у женщин 30-39 лет – 0,52±0,05·10<sup>9</sup> к/л, у женщин от 40 до 50 лет – 0,54±0,05·10<sup>9</sup> к/л.

У молодых женщин 18-29 лет регистрируется увеличение цитотоксической, пролиферативной, В-клеточной активности и апоптоза: уровень содержания лимфоцитов с рецепторами CD8<sup>+</sup> выше физиологической нормы и составляет 0,68±0,12·10<sup>9</sup> к/л; концентрация CD10<sup>+</sup> также повышена – 0,63±0,13·10<sup>9</sup> к/л, регистрируется повышение уровня CD95<sup>+</sup> – 0,56±0,07·10<sup>9</sup> к/л. У женщин среднего и старшего возраста регистрируется снижение иммуносупрессии (CD8<sup>+</sup>) – 0,47±0,04·10<sup>9</sup> к/л и 0,48±0,04·10<sup>9</sup> к/л соответственно, повышение киллерной (CD16<sup>+</sup>) – 0,62±0,06·10<sup>9</sup> к/л и 0,56±0,05·10<sup>9</sup> к/л; цитокиновой (CD25<sup>+</sup>) активности: у женщин среднего возраста 0,71±0,09·10<sup>9</sup> к/л, у женщин старшей возрастной группы 0,74±0,12·10<sup>9</sup> к/л, на фоне увеличения рецепторов к трансферрину (CD71<sup>+</sup>) – 0,57±0,05·10<sup>9</sup> к/л и 0,54±0,04·10<sup>9</sup> к/л соответственно, резкого снижения с возрастом процессов апоптоза (CD95<sup>+</sup>) – 0,57±0,48, p<0,01. Корреляционный анализ выявил жесткую (0,78) взаимозависимость повышенных уровней пролактина, иммуносупрессии, апоптоза и возраста обследуемых. Следует предположить, что напряжение супрессорного звена адаптивного иммунитета взаимозависимо от концентрации пролактина, способствует увеличению апоптотической активности и зависит от возраста женщин.

У молодых женщин регистрируется увеличение цитотоксической и пролиферативной, В-клеточной активности и апоптоза. У женщин среднего и старшего возраста регистрируется снижение иммуносупрессии (CD8<sup>+</sup>), повышение киллерной (CD16<sup>+</sup>), цитокиновой (CD25<sup>+</sup>) активности на фоне увеличения рецепторов к трансферрину (CD71<sup>+</sup>) и резкого снижения с возрастом процессов апоптоза (CD95<sup>+</sup>), p<0,01.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корниенко Е. Б. Особенности иммунологической реактивности у женщин позднего репродуктивного возраста, проживающих на Севере: автореф. дис. канд. мед. наук: 03.00.13 / Е. Б. Корниенко; Арханг. гос. мед. акад. – Архангельск, 2002. – 18 с.
2. Сергеева Т. Б., Щеголева Л. С., Шашкова Е. Ю., Бичкаев А. А. Физиологические особенности иммунного статуса у чумработниц в Баренцевом евро-арктическом регионе. // Тезисы докладов XXII съезда Физиологического общества имени И. П. Павлова, Москва-Волгоград, 2013. – с. 476.
3. Добродеева Л. К., Л. П. Жилина. Иммунологическая реактивность, состояние здоровья населения Архангельской области – Екатеринбург: УрО РАН, 2010. – с. 229.
4. Щеголева Л. С. Резервные возможности иммунного гомеостаза у человека на Севере. Екатеринбург: УрО РАН, – 2007, – с. 207.
5. Суханов С. Г. Влияние факторов Крайнего Севера на женскую репродуктивную систему. // Вестник Северного (Арктического) Федерального университета, Архангельск, 2013. – № 4. – с. 70-74.
6. Филиппова О. Е. Активизация иммунного ответа у жителей крайнего Севера / О. Е. Филиппова, А. Ю. Стирманова, Е. Ю. Шашкова, Л. И. Арасланова // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2012. – с. 232.

## THE IMMUNE STATUS OF WOMEN OF SUBPOLAR ZONE OF DIFFERENT AGE GROUPS WITH THE HIGH MAINTENANCE OF PROLACTINUM

Schegolev L. S., Tumanov M. S., Shashkov E. Yu., Filippova O. E.

*Laboratory of physiology of immunocompetent cages, Federal state budgetary institution Institute of Fiziologiiprirodny Adaptations of the Ural office of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia*

It was interested to study a condition of immunological reactivity at women of northern taking into account Prolactinum hormone depending on the age, which living in extreme climat-ecological conditions of the Subpolar region of the European North of the Russian Federation. At young women the increase in cytotoxic and proliferative, B-cellular activity and apoptosis is registered. At women of middle and advanced age decrease in an immunosuppression (CD8<sup>+</sup>), increase of killer activity (CD16<sup>+</sup>), citokin activity (CD25<sup>+</sup>) against increase in receptors to transferrine (CD71<sup>+</sup>) and sharp decrease with age processes of apoptosis (CD95<sup>+</sup>), (p<0,01) is registered.

*Keywords: Subpolar zone, Pinega, women, immune system, Prolactinum.*

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ КЛЕТОК CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> И CD16<sup>+</sup> У ЖИТЕЛЕЙ ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРА В ВОЗРАСТЕ 41-60 ЛЕТ

Щёголева Л. С., Шашкова Е. Ю.

*Лаборатория физиологии иммунокомпетентных клеток, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии природных адаптаций Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия*

Климатические условия на севере являются для человека дискомфортными, социальные условия жизни во многом уступают тем, которые имеют люди, проживая в центральных и южных регионах страны. Функциональная реактивность иммунной системы изменяется под влиянием различных факторов внешней среды, поэтому мониторинг иммунного статуса с течением времени остается актуальным. У жителей Европейского Севера в возрасте 41-60 лет увеличена концентрация клеток CD8<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> в 42–62% случаев, в зависимости от показателя и независимо от пола; снижен хелперно-супрессорный коэффициент за счёт увеличения супрессорных клеток, что отражает напряжение Т-клеточной популяции и является, предположительно, компенсаторной реакцией данной возрастной группы жителей приарктического региона.

*Ключевые слова:* Север, иммунный статус, цитотоксические клетки.

**Введение.** Одним из важнейших регионов, занимающим более 1 млн. кв. км или 8,1% от всей территории Российской Федерации является Европейский Север, значительную часть которого составляет Архангельская область с территорией 587,3 тыс. кв. км и характеризуется большой протяженностью ее с севера на юг, с запада на восток, а также хорошо развитой гидрографической сетью, определяющими разнообразие ее климата [1].

Климатические условия на севере являются для человека дискомфортными, социальные условия жизни во многом уступают тем, которые имеют люди, проживая в центральных и южных регионах страны [2, 3].

Функциональная реактивность иммунной системы изменяется под влиянием различных факторов внешней среды, поэтому мониторинг иммунного статуса с течением времени остается актуальным [4, 5].

**Цель работы:** Изучить физиологическую роль клеток CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> у жителей Европейского Севера в возрасте 41-60 лет

Проанализированы результаты обследования 102 человек, жителей п. Пинега (Архангельской области), п. Несь (Ненецкого автономного округа), практически здоровых, не имеющих хронической патологии в анамнезе на момент обследования: из них 73 женщины и 29 мужчин. Обследуемые лица являлись клинически здоровыми добровольцами, у которых не было выявлено хронических, острых и рецидивирующих заболеваний.

Кровь для анализа иммунного статуса брали из локтевой вены в объеме 6 мл в 9–10 часов утра, натощак. Забор крови осуществляли в вакутайнеры с литий-гепарином фирмы «IMPROVACUTER».

Процентное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>) определяли методом непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител («МедБиоСпектр», 2012–2013 г. Москва) на препаратах лимфоцитов типа «высушенная капля» с использованием пероксидазного конъюгата и окрашиванием раствором хромогена для анализа в иммерсионной микроскопии.

Все полученные результаты подвергались комплексной статистической обработке посредством пакета прикладных программ MICROSOFT EXCEL.7. и STATISTICA 6.0 («StatSoft», США) FOR WINDOWS 2000. Дан-

ные исследования представлены в виде их средних значений и средней ошибки ( $M \pm m$ ). Различия сравниваемых показателей принимались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ – $0,001$ . Корреляционный анализ проводился с определением коэффициентом линейной корреляции Пирсона ( $r$ ).

Проанализировав полученные данные выявили, что уровень содержания Т-лимфоцитов хелперов/индукторов (CD4<sup>+</sup>) у жителей Европейского Севера в среднем составил  $0,52 \pm 0,04 \cdot 10^9$  кл/л, что находится в пределах общепринятых физиологических норм, причем у женщин данный показатель достоверно выше, чем у мужчин ( $0,46 \pm 0,03$  и  $0,58 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л соответственно,  $p < 0,001$ ). Пониженное содержание хелперов/индукторов (CD4<sup>+</sup>) регистрировали в 39,63% случаев (соответственно 41,33% и 37,93% случаев). Повышенные значения указанного параметра зафиксированы в 14,07% случаев, с достоверной разницей по полу (у женщин – 4,00% и у мужчин – 24,14%,  $p < 0,01$ ).

Анализ показал, что средний уровень содержания супрессоров/киллеров (CD8<sup>+</sup>) повышен и составляет  $0,48 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л, без существенной разницы между женщинами и мужчинами (соответственно  $0,46 \pm 0,04$  и  $0,50 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л). Пониженные уровни клеток с рецепторами к CD8<sup>+</sup> фиксировались в 13,33% у женщин и в 17,24% случаев у мужчин. Высокие уровни цитотоксических лимфоцитов CD8<sup>+</sup> в среднем встречались у 59,04% обследуемых лиц, без существенной разницы по полу (соответственно в 56,00% и 62,07%).

Уровень содержания Т-клеток естественных киллеров (CD16<sup>+</sup>) повышен и в среднем составляет  $0,52 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л., при чем у мужчин указанный показатель достоверно выше, чем у женщин (соответственно  $0,50 \pm 0,03$  и  $0,54 \pm 0,06 \cdot 10^9$  кл/л,  $p < 0,001$ ). Пониженные уровни содержания естественных киллеров (CD16<sup>+</sup>) у жителей Европейского Севера в возрасте 41-60 лет встречались в 12,59% случаев, без существенной разницы между женщинами и мужчинами (соответственно 14,47% и 10,71%). Повышенные значения указанного параметра регистрировались в 44,27% случаев, без существенной разницы по полу (соответственно 42,10% и 46,43%).

Корреляционный анализ показал, что между уровнями содержания цитотоксических клеток CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ( $r = 0,77$ ) фиксировались сильные корреляционные взаимосвязи.

Умеренные корреляционные взаимосвязи были выявлены между клетками CD4<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> (r=0,68) и CD8<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> (r=0,64).

Таким образом, у жителей Европейского Севера в возрасте 41-60 лет увеличена концентрация клеток CD8<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> в 42–62% случаев, в зависимости от показателя и независимо от пола; снижен хелперно-супрессорный коэффициент за счёт увеличения супрессорных клеток, что отражает напряжение Т-клеточной популяции и является, предположительно, компенсаторной реакцией данной возрастной группы жителей приарктического региона.

Работа поддержана грантом: № 12-4-5-025 Арктика УрО РАН

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коробицин А. А. Экология здоровья трудоспособного населения архангельской области / А. А. Коробицин, П. И. Сидоров, Ю. Р. Теддер // Архангельск.: Изд.- во АГМА.- 1996.- 206 с.;
2. Сметанин А. В. Архангельская область: между прошлым и будущим / А. В. Сметанин.- Архангельск, 2002.- 515 с.
3. Ефремов А. А., Ткачев А. В. О существующих подходах к районированию северных территорий России // Материалы Всероссийской конференции «Стратегия развития северных регионов России». Архангельск, 2003. С. 48-58.
4. Некрасова М. В. Соотношение содержания тестостерона и уровней иммунологических параметров у мужчин, работников гидрографической службы г. Архангельска / М. В. Некрасова, Л. С. Щёголева // Вестник Уральской медицинской академической науки, Екатеринбург, № 2 (48), 2014 г.- С. 91-92.
5. Пашина Н. А. Физиологические особенности иммунного статуса коренного (малочисленного) населения Ямало-Ненецкого автономного округа: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н. А. Пашина – Надым, 2009.
6. Щёголева Л. С. Резервные возможности иммунного гомеостаза у человека на Севере / Л. С. Щёголева.- Екатеринбург: УрОРАН, 2007.- 206 с.

## PHYSIOLOGICAL ROLE OF CAGES OF CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> AND CD16<sup>+</sup> AT INHABITANTS OF THE EUROPEAN NORTH AT THE AGE OF 41-60 YEARS

Schegolev L. S., Shashkov E. Y.

*Laboratory of physiology of immunocompetent cages, science Federal state budgetary institution  
Institute of physiology of natural adaptations of the Ural office of the Russian Academy of Sciences,  
Arkhangelsk, Russia*

The climatic conditions in the North are for a person uncomfortable, social conditions of life in many respects inferior to those of people living in the Central and southern regions of the country. Functional reactivity of the immune system changes under the influence of various factors of the external environment, so the monitoring of immune status over time remains relevant. The residents of the European North in the age of 41 to 60 years increased concentration of cells CD8<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup> in 42–62% of cases, depending on the indicator and regardless of gender; reduced helper-suppressor factor by increasing suppressor cells that reflects the tension of the T-cell population and is supposedly a compensatory reaction in a given age group of inhabitants of the Arctic region.

*Keywords: North, immune status, cytotoxic cages.*

## IX Всероссийская конференция «Иммунологические чтения в г. Челябинске»

### АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

#### А

Абрамцова А. В. 3  
 Авдиенко О. В. 21  
 Агеева Е. С. 5  
 Агеев Ю. И. 122  
 Албегова Д. З. 8, 11  
 Алешина Н. И. 97  
 Альтман Д. Ш. 39, 43  
 Альтман Е. В. 15, 18  
 Антонова Л. В. 105  
 Арион В. Я. 115  
 Ахмалтдинова Л. Л. 21, 23

#### Б

Базикян Э. А. 93  
 Балякин Ю. В. 143  
 Барышева О. Ю. 80  
 Бахманова Е. Н. 143  
 Бениова С. Н. 162  
 Бережная Е. С. 26  
 Блинкова Н. Б. 99  
 Борисов В. А. 36  
 Боровская Н. А. 82

#### В

Важенин А. В. 15, 18  
 Вайсман Я. И. 46, 49  
 Вахлова И. В. 54  
 Везикова Н. Н. 80  
 Выбач М. В. 80

#### Г

Газалиева М. А. 23  
 Гапонова Т. В. 89  
 Гизингер О. А. 119  
 Головин А. В. 57  
 Головкин А. С. 105  
 Гольцова И. А. 29, 63  
 Горчакова М. В. 89  
 Грачев Н. И. 33  
 Григорьева Ю. В. 138  
 Гриценко В. А. 63, 66  
 Гришкина Э. Е. 33  
 Гусева О. А. 36, 93  
 Гущина А. О. 33

#### Д

Давыдова Е. В. 39, 43

Данилова И. Г. 68  
 Дианова Д. Г. 49, 60  
 Добрынина М. А. 63  
 Долгих О. В. 46, 49  
 Долгушин И. И. 26, 102  
 Дутова С. В. 51

#### Е

Емелина Ю. Н. 54  
 Ермолина Е. В. 166

#### Ж

Железнова А. Д. 166  
 Жулай Г. А. 57, 80

#### З

Зайцева Н. В. 49, 60  
 Захарова Г. А. 89  
 Захаров Ю. М. 99, 172  
 Зимина И. В. 115  
 Злакоманова О. Н. 132, 175  
 Золкорняев И. Г. 97  
 Зуева Е. Б. 29, 63  
 Зурочка А. В. 29, 63  
 Зурочка В. А. 63

#### И

Иванов Ю. Б. 66  
 Иноземцев А. Н. 115  
 Иптышев В. М. 5

#### К

Казакова И. А. 68  
 Камышная В. А. 70  
 Камышный А. М. 70  
 Карпова М. Р. 51  
 Квятковская С. В. 102  
 Киселева Н. М. 115  
 Киселева Н. С. 99  
 Климов А. В. 73  
 Климов В. В. 73, 75  
 Кобылкин К. С. 99  
 Козлова Е. С. 129  
 Козлов И. Г. 8, 93  
 Козырь Л. А. 11  
 Колупаев В. А. 77  
 Кошкарлова Н. С. 75  
 Кошовкина Т. В. 75

Кравченко П. Н. 57, 80  
 Красников В. Е. 82  
 Красницкая А. С. 82  
 Кремлева Е. А. 86  
 Кудрявцев И. В. 89, 148  
 Курносенко И. В. 102, 108  
 Кшнясев И. А. 129  
 Кягова А. А. 11

**Л**

Лабис В. В. 93  
 Латюшина Л. С. 26  
 Левашова О. А. 97  
 Лившиц Н. М. 166

**М**

Макарова Э. Б. 99  
 Мальчиков И. А. 138  
 Маркелова Е. В. 162  
 Маркова В. А. 102  
 Марусенко И. М. 80  
 Матвеева В. Г. 105  
 Маякова В. Б. 108, 135  
 Мезенцева Е. А. 132, 135  
 Морозова О. С. 111  
 Москвичева М. Г. 132  
 Мухлынина Е. А. 68  
 Мяделец М. А. 51

**Н**

Найдина О. А. 75  
 Негребецкий В. В. 8, 11  
 Никольская В. В. 113  
 Никольский И. С. 113  
 Никушкина К. В. 102, 122  
 Новоселецкая А. В. 115

**О**

Огнева О. И. 119  
 Олейник В. М. 57, 80  
 Олейник Е. К. 57, 80  
 Орнер И. Ю. 135  
 Осиков М. В. 119, 122

**П**

Павлова С. И. 8, 11  
 Панфилова Т. В. 166  
 Пашнина И. А. 126, 129  
 Пигунова Л. А. 3  
 Попов Е. А. 132  
 Предеина Р. А. 46  
 Путилин Д. А. 70

**Р**

Родионова О. М. 162

Родоман Г. В. 143  
 Рубштейн А. П. 99

**С**

Савельева А. А. 108, 135  
 Савочкина А. Ю. 102, 135  
 Салахутдинова З. В. 75  
 Сапожников А. М. 143  
 Саранчина Ю. В. 5  
 Саркисян Н. Г. 138  
 Сарычева Ю. А. 166  
 Сашенков С. Л. 77  
 Сгибнев А. В. 86  
 Семенихин А. А. 33  
 Семенова Я.-М. А. 113  
 Сергеева Т. Б. 111, 140  
 Сертакова О. В. 143  
 Скоробогатова О. В. 129  
 Сорокина М. А. 21  
 Столина М. Л. 162  
 Стручков П. В. 143  
 Субботовская А. И. 148  
 Сумеркина В. А. 122

**Т**

Телешева Л. Ф. 122  
 Тиунова Т. А. 154, 158  
 Тузанкина И. А. 138  
 Тулупова М. С. 162  
 Туманова М. С. 178

**Ф**

Филиппова О. Е. 111, 178  
 Филиппова Ю. В. 166

**Х**

Хайдуков С. В. 36, 93  
 Хамошина М. Б. 162  
 Хомякова Н. Ф. 143

**Ч**

Чукичев А. В. 175  
 Чуксина Т. Ю. 15, 18  
 Чуров А. В. 57, 80

**Ш**

Шашкова Е. Ю. 178, 180  
 Шевченко А. В. 169  
 Шевяков С. А. 172  
 Широбокова М. В. 175

**Щ**

Щёголева Л. С. 178, 180

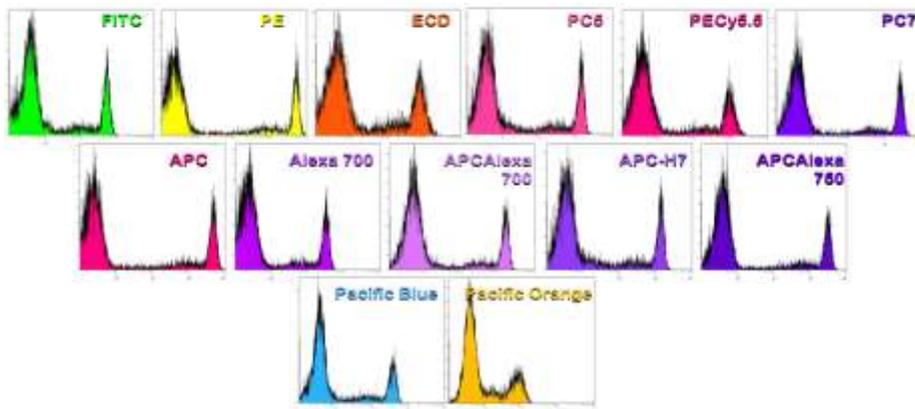
Российская академия наук  
Уральское отделение Российской академии наук  
ФГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный университет  
Российское научное общество иммунологов  
ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН  
ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины  
ФМБА России  
ГБУЗ Челябинский областной клинический госпиталь ветеранов войн

---

IX Всероссийская конференция с международным участием  
**«Иммунологические чтения в г. Челябинске»**

Международная школа с элементами школы для молодых ученых  
**«Проточная цитометрия в клинической  
лабораторной диагностике»**  
Посвящается 60-летию д.б.н. Хайдукова С. В.

## ПРОГРАММА



24августа- 31августа 2014 года,  
Челябинск

## ОРГАНИЗАТОРЫ

Российская академия наук

Уральское отделение Российской академии наук

ФГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный университет

Российское научное общество иммунологов

ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН

ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной  
медицины

ФМБА России

ГБУЗ Челябинский областной клинический госпиталь ветеранов войн

ООО «Академический инновационный научный центр»

ЧУ ДПО МР «Новый уровень»

**Конференция поддержана грантом РФФИ 14-04-20001**

## КОНФЕРЕНЦИЯ И ШКОЛА ПРОВОДЯТСЯ ПРИ ПОДДЕРЖКЕ КОМПАНИЙ



ООО «Бекмен Культер», Москва



ООО «ЛабТэк Лтд», Санкт-Петербург



ООО «Хеликон», Москва



ООО «ФЕРОН», Москва



ООО «БИО-РАД», Москва

## **Дорогие коллеги!**

IX Всероссийская конференция с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» и Международная школа «Проточная цитометрия в клинической лабораторной диагностике» проводится для специалистов в области клинической лабораторной диагностики, аллергологов и клинических иммунологов, а также врачей других специальностей, научных сотрудников, аспирантов, ординаторов и студентов. Лекции и практические занятия посвящены современному представлению о проточной цитометрии, иммунодиагностике и иммунотерапии. Полученная информация позволит расширить Ваши познания в области иммунологии.

В рамках конференции проводится дополнительное послевузовское обучение по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» в очно-заочной форме с выдачей удостоверения о прохождении тематического усовершенствования, для специалистов имеющих сертификаты проводится сертификационный цикл усовершенствования по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» с продлением сертификата специалиста.

В программе Семинара планируются:

- лекции ведущих специалистов по фундаментальной и клинической иммунологии;
- практические занятия / семинары по работе на проточных цитометрах компании Beckman Coulter Navios и FC-500;
- клинические разборы типичных и спорных случаев.

Мы будем благодарны Вам за участие в работе нашей конференции и школы!

*С уважением, Оргкомитет*

## **ОРГКОМИТЕТ КОНФЕРЕНЦИИ**

### **Сопредседатели:**

Черешнев Валерий Александрович, академик РАН и РАМН, профессор, д.м.н.

Зурочка Александр Владимирович, профессор, д.м.н.

### **Заместители председателя:**

Альтман Давид Шурович, профессор, д.м.н.

Хайдуков Сергей Валерьевич, д.б.н.

### **Члены оргкомитета:**

Аклеев Александр Васильевич, профессор, д.м.н.

Бахметьев Борис Аркадьевич, к.м.н.

Бычкова Наталья Владимировна, к.б.н.

Давыдова Евгения Валерьевна, к.м.н.

Заботина Татьяна Николаевна, профессор, д.м.н.

Захаров Юрий Михайлович, Академик, профессор, д.м.н.

Зуева Елена Борисовна, к.б.н.

Зурочка Владимир Александрович, к.м.н.

Калинина Наталия Михайловна, профессор, д.м.н.

Кетлинский Сергей Александрович, Член-корреспондент, профессор, д.б.н.

Козлов Иван Генрихович, профессор, д.м.н.

Костоломова Елена Геннадьевна, к.б.н.

Кудрявцев Игорь Владимирович, к.б.н.

Лагерева Юлия Геннадьевна, к.м.н.

Пашнина Ирина Александровна, к.б.н.

Продеус Андрей Петрович, профессор, д.м.н.

Раев Михаил Борисович, д.б.н.

Симбирцев Андрей Семенович, профессор, д.м.н.

Семикина Елена Леонидовна, д.м.н.

Суховей Юрий Геннадьевич, профессор, д.м.н.

Тихонина Елена Александровна, к.м.н.

Тотоян Арег Артемович, член-корреспондент, профессор, д.м.н.

Топтыгина Анна Павловна, к.м.н.

Тузанкина Ирина Александровна, профессор, д.м.н.

Черешнева Маргарита Владимировна, профессор, д.м.н.

## СПИСОК ЛЕКТОРОВ

<b>Бахметьев Борис Аркадьевич</b>	Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, заведующий лабораторией экологической иммунологии, к.м.н., Пермь
<b>Бычкова Наталия Владимировна</b>	Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова МЧС России, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии, к.б.н., Санкт-Петербург
<b>Вохмянина Ольга</b>	Bio-Rad Laboratories, к.х.н., Москва
<b>Заботина Татьяна Николаевна</b>	ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, лаборатория клинической иммунологии опухолей, ведущий научный сотрудник, руководитель централизованной группы проточной цитометрии, д.б.н., Москва
<b>Захаров Юрий Михайлович</b>	ФБГОУ ВПО Южно-уральский государственный медицинский университет, заведующий кафедрой нормальной физиологии, Академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ, профессор, д.м.н., Челябинск
<b>Зурочка Александр Владимирович</b>	Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, лаборатория иммунологии воспаления, ведущий научный сотрудник, профессор, д.м.н., Челябинск
<b>Калинина Наталия Михайловна</b>	Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова МЧС России, главный научный сотрудник лабораторного сектора, профессор, д.м.н., Санкт-Петербург
<b>Козлов Иван Генрихович</b>	Российский государственный медицинский университет, заведующий кафедрой фармакологии, профессор, д.м.н., Москва
<b>Костоломова Елена Геннадьевна</b>	Тюменский филиал УРАМН "НИИ клинической иммунологии СО РАМН", к.б.н., Тюмень
<b>Кудрявцев Игорь Владимирович</b>	НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, старший научный сотрудник отдела иммунологии; Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра цитологии и гистологии к.б.н., Санкт-Петербург
<b>Лагерева Юлия Геннадьевна</b>	Муниципальное бюджетное учреждение «Клинико-диагностический центр», заведующая лабораторией клинической иммунологии, к.б.н., врач высшей категории, Екатеринбург
<b>Пашнина Ирина Александровна</b>	Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии; Областная детская клиническая больница №1, заведующая иммунологической лабораторией – врач КЛД, к.б.н., Екатеринбург

<b>Продеус Андрей Петрович</b>	Заведующий кафедрой педиатрии РГМУ, руководитель отделения иммунологии и ревматологии детей и подростков ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии, профессор, д.м.н., Москва
<b>Раев Михаил Борисович</b>	ИЭГМ УрО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, профессор, д.б.н., Пермь
<b>Савицкий Валерий Павлович</b>	ООО "Бекмен Культер", специалист по проточной цитометрии, к.б.н., Москва
<b>Семикина Елена Леонидовна</b>	Заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией Научного Центра здоровья детей РАМН, д.м.н., Москва
<b>Сухачева Елена Александровна</b>	Beckman Coulter Eurocenter, специалист по научной поддержке в области клеточного анализа, к.б.н., Швейцария
<b>Суховой Юрий Геннадьевич</b>	Тюменский филиал УРАМН "НИИ клинической иммунологии СО РАМН", директор, профессор, д.м.н., Тюмень
<b>Топтыгина Анна Павловна</b>	Ведущий научный сотрудник ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, к.м.н., Москва
<b>Тузанкина Ирина Александровна</b>	Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории воспаления; Центр клинической иммунологии, руководитель Центра, Профессор, д.м.н., Екатеринбург
<b>Хайдуков Сергей Валерьевич</b>	УРАН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, ст.н.с.; ФГУ ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии МЗиСР РФ, заведующий лабораторией "Клеточной иммунологии", д.б.н., Москва
<b>Черешнев Валерий Александрович</b>	Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, директор института, Екатеринбург; Президент Российского научного общества иммунологов; Академик РАН и РАМН, профессор, д.м.н., Москва
<b>Черешнева Маргарита Владимировна</b>	Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, лаборатория иммунофизиологии, главный научный сотрудник, профессор, д.м.н., Екатеринбург
<b>Carole Astruc</b>	Bio-Rad Laboratories, France

## 25 АВГУСТА (ПОНЕДЕЛЬНИК)

### Пленарные лекции:

9.00 – 9.40

#### **ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИИ И ИММУНОПАТОЛОГИИ. МЕСТО ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

*Зурочка А. В., профессор, д.м.н., Россия, Екатеринбург*

9.40 – 10.20

#### **СТАНДАРТИЗОВАННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ «ИССЛЕДОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОТОЧНЫХ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРОВ-АНАЛИЗАТОРОВ». ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

*Хайдуков С. В., д.б.н., Россия, Москва*

10.20 – 11.00

#### **МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ В ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

*Вохмянина О., к.х.н, Bio-Rad Laboratories, Россия, Москва*

11.00 – 11.40

#### **ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ «ИММУННОГО СТАТУСА» ДЛЯ МОНИТОРИНГА СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

*Хайдуков С. В., д.б.н., Россия, Москва*

11.40 – 12.20

#### **ВЫЯВЛЕНИЕ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИХ И АНАЛИТИЧЕСКИХ ОШИБОК ПРИ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

*Хайдуков С. В., д.б.н., Россия, Москва*

12.20 – 13.00

#### **КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА**

*Калинина Н. М., профессор, д.м.н., Россия, Санкт-Петербург*

25 августа (понедельник). Пленарные лекции

13.00 – 14.00

**ПЕРЕРЫВ**

14.00 – 14.40

**ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ДИАГНОСТИКЕ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

*Калинина Н. М., профессор, д.м.н., Россия, Санкт-Петербург*

14.40 – 15.20

**АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ CD34 КЛЕТОК С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕАГЕНТОВ ВЕСКМАН COULTER**

*Савицкий В. П., к.б.н., Россия, Москва*

15.20 – 16.00

**КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХРАНЕНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ КРИОКОНСЕРВАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

*Костоломова Е. Г., к.б.н., Россия, Тюмень*

16.00 – 16.20

**ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ**

*Костоломова Е. Г., к.б.н., Россия, Тюмень*

16.20 – 17.20

**ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

*Кудрявцев И. В., к.б.н., Россия, Санкт-Петербург*

17.20 – 18.00

**БИОТЕХНОЛОГИ В ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

*Раев М. Б., д.б.н., Россия, Пермь*

18.00 – 18.40

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АНЕМИЙ**

*Сухачева Е. А., к.б.н., Швейцария, Неон*

## 26 АВГУСТА (вторник)

9.00 – 9.40

### **ТИПИРОВАНИЕ МИНОРНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ СОЛИДНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ**

*Заботина Т. Н., профессор, д.м.н., Россия, Москва*

9.40 – 10.20

### **ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ОЦЕНКЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

*Заботина Т. Н., профессор, д.м.н., Россия, Москва*

10.20 – 11.00

### **ДИАГНОСТИКА ПИЩЕВОЙ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

*Бычкова Н. В., к.б.н., Россия, Санкт-Петербург*

11.00 – 11.40

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-ЦИТОМЕТРИИ В РУТИНОЙ ПРАКТИКЕ ЛАБОРАТОРИИ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ**

*Бычкова Н. В., к.б.н., Россия, Санкт-Петербург*

11.40 – 12.00

### **РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т- КЛЕТКИ.ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ,СВОЙСТВА, ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ.**

*Пашина И. А., к.б.н., Россия, Екатеринбург*

12.00 – 12.20

### **ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ.**

*Пашина И. А., к.б.н., Россия, Екатеринбург*

12.20 – 13.00

### **ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ**

*Топтыгина А. П., к.м.н., Россия, Москва*

13.00 – 14.00

### **ПЕРЕРЫВ**

26 августа (вторник). Пленарные лекции

14.00 – 14.40

**НОРМАТИВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА У ЖИТЕЛЕЙ ПЕРМСКОГО КРАЯ**

*Бахметьев Б. А., к.м.н., Россия, Пермь*

14.40 – 15.20

**ИММУННЫЙ СТАТУС ЧЕЛОВЕКА, СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЕГО ОЦЕНКИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К ИХ РЕШЕНИЮ**

*Зурочка А. В., профессор, д.м.н., Россия, Екатеринбург*

15.20 – 16.00

**ПРИМЕНЕНИЕ СТАНДАРТИЗОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ ОЦЕНКИ МАЛЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ .**

*Зурочка А. В., профессор, д.м.н., Россия, Екатеринбург*

16.00 – 16.40

**КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ «СЛУЧАЙНОГО» ВЫЯВЛЕНИЯ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ У ДЕТЕЙ (СПИД, АГАММАГЛОБУЛИНЕМΙΑ, ОВИН, ТКИН)**

*Семикина Е.Л., д.м.н., Россия, Москва*

16.40 – 17.20

**HOW THE SORTER SIMPLIFIES THE SCIENCE OF CELL SORTING. TYPICAL APPLICATIONS**

*Carole Astruc, Bio-Rad Laboratories, France*

17.20 – 18.00

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

*Лагерева Ю. Г., к.м.н., Россия, Екатеринбург*

18.00 – 18.40

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА**

*Семикина Е.Л. д.м.н., Россия, Москва*

## 27 АВГУСТА (СРЕДА)

9.00 – 9.40

### **МНОГОЦВЕТНЫЙ АНАЛИЗ — ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПАНЕЛЕЙ**

*Кудрявцев И. В., к.б.н. Савицкий В. П., к.б.н. Россия, Санкт-Петербург, Москва*

9.40 – 10.20

### **ОСТРОЕ И ХРОНИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ И ИММУНИТЕТ**

*Черешнев В. А., Академик, профессор, д.м.н., Черешнева М.В., профессор, д.м.н., Россия, Екатеринбург*

10.20 – 11.00

### **ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ. СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ПАТОГЕНЕЗА, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ**

*Черешнев В. А., Академик, профессор, д.м.н., Россия, Екатеринбург*

11.00 – 11.40

### **СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИММУНОФАРМАКОЛОГИИ**

*Козлов И. Г., профессор, д.м.н., Россия, Москва*

11.40 – 12.20

### **ЛОКАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

*Захаров Ю.М. Академик, профессор, д.м.н., Россия, Челябинск*

12.20 – 13.00

### **ИНТЕРФЕРОНЫ. ДИАГНОСТИКА И ИНТЕРФЕРОНОТЕРАПИЯ В ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ.**

*Продеус А. П., д.м.н., профессор, Россия, Москва*

13.00 – 14.00

### **ПЕРЕРЫВ**

14.00 – 14.30

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НК-КЛЕТОК**

*Савицкий В.П., к.б.н. Россия, Москва*

15.10 – 15.50

**CD-МАРКЕРЫ. УЗНАЙ ЛИЦО В ТОЛПЕ**

*Козлов И. Г., профессор, д.м.н., Россия, Москва*

15.50-16.20

**ИНФОРМАТИВНОСТЬ НЕСТАНДАРТНОГО  
ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ  
РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ.**

*Хайдуков С. В., д.б.н., Россия, Москва*

16.20 – 17.00

**ИММУНОПАТОГЕНЕЗ РАННИХ ПРОЯВЛЕНИЙ СОСУДИСТЫХ  
НАРУШЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ВЕТЕРАНОВ ВОЕННЫХ  
КОНФЛИКТОВ**

*Давыдова Е. В., к.м.н., Россия, Челябинск*

17.00 – 17.30

**ИММУНОТРОПЫ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

*Тузанкина И. А., профессор, д.м.н., Россия, Екатеринбург*

17.30 – 18.00

**МЕТОДЫ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ КАК ТВОРЧЕСКИЙ  
ИНСТРУМЕНТ НАУЧНОГО ПОИСКА В ИММУНОЛОГИИ**

*Суховой Ю. Г., профессор, д.м.н., Россия, Тюмень*

---

**28—30 АВГУСТА (ЧЕТВЕРГ-СУББОТА)  
ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ. РАБОТА В ГРУППАХ**

**9.00 – 18.00**

*Преподаватели: Костоломова Е. Г. (к.б.н.), Кудрявцев И. В. (к.б.н.), Пашина И. А. (к.б.н.), Савицкий В. П. (к.б.н.), Зурочка В. А. (к.м.н.), Бычкова Н. В. (к.б.н.), Хайдуков С. В. (д.б.н.), Токар М. И.*

Участникам школы будет предложено ответить на несколько вопросов для определения уровня подготовки.

По результатам анкетирования участники будут разделены на несколько групп для прохождения практики на приборах и программном обеспечении компании Beckman Coulter.

Navios 10/3	Navios 6/2	Cytomics FC500
Группа 1	Группа 2	Группа 3
<ul style="list-style-type: none"> <li>• подготовка цитометров к работе</li> <li>• контроль качества лабораторных исследований в цитометрии</li> <li>• внутрिलाбораторный контроль качества, создание контрольных протоколов</li> <li>• проведение ежедневного контроля качества</li> <li>• подготовка образцов</li> <li>• создание и настройка 2-4 цветных и многоцветных протоколов (настройка напряжений и двух-четырёхцветной компенсации в ручном режиме)</li> <li>• определение относительного и абсолютного содержания основных популяций лимфоцитов</li> <li>• определение относительного и абсолютного содержания субпопуляций Т- и В- клеток</li> <li>• определение содержания регуляторных клеток</li> <li>• создание панелей и отчетов</li> <li>• работа с базой данных пациентов</li> <li>• настройка протокола для исследования стволовых клеток, StemKit и определение относительного и абсолютного содержания CD34+ клеток</li> <li>• создание и настройка многоцветных протоколов на острые и хронические лейкозы</li> <li>• работа с базой данных пациентов. Анализ полученных результатов (Navios Software, Kaluza)</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• настройка 6-10 цветной компенсации в автоматическом режиме</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• настройка 5-6 цветной компенсации в автоматическом режиме</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• настройка 4-5 цветной компенсации в автоматическом режиме</li> </ul>

## СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

### **ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕЛЕНА МИНЕРАЛЬНОЙ ВОДЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*Абрамцова А. В., Пигунова Л. А. Россия, Пятигорск*

### **РОЛЬ ЦИТОКИНОВ ПРИ HELICOBACTER PYLORI-АССОЦИИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ У КОРЕННОГО И ПРИШЛОГО НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ХАКАСИЯ**

*Агеева Е. С., Саранчина Ю. В., Иптышев В. М., Россия, Республика Хакасия, Абакан*

### **ВЛИЯНИЕ ПОЛИОКСИДОНΙΑ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФАГОЦИТОВ КРОВИ НА ФОНЕ ХИМИОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЛОСТИ РТА**

*Альтман Е. В., Чуксина Т. Ю., Важенин А. В., Россия, Челябинск*

### **РОЛЬ ПОЛИОКСИДОНΙΑ В ИЗМЕНЕНИИ УРОВНЕЙ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ НА ФОНЕ ХИМИОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ**

*Альтман Е. В., Чуксина Т. Ю., Важенин А. В., Россия, Челябинск*

### **УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОЛИВАЛЕНТНОЙ АЛЛЕРГИЕЙ**

*Ахмалтдинова Л. Л., Авдиенко О. В., Сорокина М. А., Казахстан, Караганда*

### **УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АЛЛЕРГИЕЙ К КЛЕЩАМ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ**

*Ахмалтдинова Л. Л., Газалиева М. А., Казахстан, Караганда*

### **ВЛИЯНИЕ ИММУНОКОРРЕКЦИИ БЕТАЛЕЙКИНОМ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ СЛЮНЫ У ПАЦИЕНТОВ С ОСЛОЖНЕННЫМИ ПЕРЕЛОМАМИ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ**

*Бережная Е. С., Латюшина Л. С., Долгушин И. И., Россия, Челябинск*

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ В ТЕЧЕНИЕ РЕПАРАЦИОННО-ПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПОСЛЕ ПЕТЛЕВОЙ ЭЛЕКТРОЭСЦИЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ У ЖЕНЩИН С ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИЕЙ**

*Гольцова И. А., Зуева Е. Б., Зурочка А. В., Россия, Екатеринбург*

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА ДО И ПОСЛЕ ЧРЕЗКОЖНОГО КОРОНАРНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА**

*Грачев Н. И., Семенихин А. А., Гуцина А. О., Гришкина Э. Е., Россия, Владивосток*

**ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ**

*Гусева О. А., Борисов В.А., Хайдуков С. В., Россия, Москва*

**ВЛИЯНИЕ АНТИАСТЕНИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ЛАДАСТЕН НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФАГОЦИТОВ У ВETERANОВ АФГАНИСТАНА С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА**

*Давыдова Е. В., Альтман Д. Ш., Россия, Челябинск*

**РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ПАТОГЕНЕЗЕ РАННИХ ФОРМ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У ВETERANОВ АФГАНИСТАНА**

*Давыдова Е.В., Альтман Д. Ш., Россия, Челябинск*

**ОСОБЕННОСТИ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ КОНТАМИНАЦИИ ФЕНОЛАМИ**

*Долгих О. В., Предеина Р. А., Вайсман Я. И., Россия, Пермь*

**ОСОБЕННОСТИ АПОПТОЗА У ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ ЭКСПОНИРОВАННОГО ХЛОРОФОРМОМ**

*Долгих О. В., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г., Вайсман Я. И., Россия, Пермь*

**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ *Coluria geoides (Rosaceae)* НА КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ**

*Дутова С. В., Карпова М. Р., Мяделец М. А., Россия, Абакан, Томск*

**ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ПОЛЛИНОЗА, ВЫЗВАННОГО ПЫЛЬЦОЙ ДЕРЕВЬЕВ, У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

*Емелина Ю. Н., Вахлова И. В., Россия, Екатеринбург*

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ С Treg-АССОЦИИРОВАННЫМИ ФЕНОТИПАМИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**

*Жулай Г. А., Олейник Е. К., Головин А. В., Чуров А. В., Кравченко П. Н., Олейник В. М., Россия, Петрозаводск*

**МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ДИАГНОСТИКЕ НАРУШЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

*Зайцева Н. В., Дианова Д. Г., Россия, Пермь*

**СИСТЕМАТИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К ИЗУЧЕНИЮ СПЕКТРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ**

*Зурочка А. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Гольцова И. А., Гриценко В. А., Россия, Екатеринбург, Оренбург*

**ВЛИЯНИЕ ТРОМБОДЕФИНСИНОВ ЧЕЛОВЕКА НА АПОПТОЗ И КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК IN VITRO**

*Иванов Ю. Б., Гриценко В. А., Россия, Оренбург*

**РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ. РОЛЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

*Казакова И. А., Мухлынина Е. А., Данилова И. Г., Россия, Екатеринбург*

**ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЙ МЕТФОРМИНА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ TLR2 И TLR4 АДИПОЦИТАМИ ПАРАПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ КЛЕТЧАТКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**

*Камышиный А. М., Путилин Д. А., Камышина В. А., Украина, Запорожье*

**ОПЫТ ИММУНОИНТЕРВЕНЦИИ ПРИ ТРАНЗИТОРНОЙ ГИПОГАММАГЛОБУЛИНЕМИИ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА**

*Климов А. В., Климов В. В., Россия, Томск*

**СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ «КОЖНОГО ОКНА» ПРИ КРУГЛОГОДИЧНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ И АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ**

*Климов В. В., Найдина О. А., Кошовкина Т. В., Кошкарлова Н. С., Салахутдинова З. В., Россия, Томск*

**СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ И ЦИТОКИНОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ**

*Колупаев В. А., Сашенков С.Л., Россия, Челябинск*

**ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

*Кравченко П. Н., Олейник Е. К., Барышева О. Ю., Жулай Г. А., Чуров А. В., Олейник В. М., Везикова Н. Н., Марусенко И. М., Выбач М. В., Россия, Петрозаводск*

**ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛИТОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ВИРУС ЭПШТЕЙН-БАРР ИНФЕКЦИЕЙ.**

*Красницкая А.С., Боровская Н.А., Красников В.Е., Россия, Владивосток*

**ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ВАГИНАЛЬНЫМИ ЭПИТЕЛИОЦИТАМИ, ИЗОЛИРОВАННЫМИ ОТ ЖЕНЩИН С ЭУБИОЗОМ ВЛАГАЛИЩА И БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ**

*Кремлева Е. А., Сгибнев А. В., Россия, Оренбург*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ**

*Кудрявцев И. В., Захарова Г. А., Гапонова Т. В, Горчакова М. В., Россия, Санкт-Петербург, Владивосток*

**ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИЯ КАК МЕТОД ПРОГНОЗА ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ**

*Лабис В. В., Базилян Э. А., Козлов И. Г., Гусева О. А. Хайдуков С. В., Россия, Москва*

**ОЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ЛЮМИНОЛЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ У БОЛЬНЫХ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА**

*Левашова О. А., Золкорняев И. Г., Алешина Н. И., Россия, Пенза*

**РЕАКЦИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ОРГАНОВ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ВНЕДРЕНИЕ ПОРИСТЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ В КОСТНУЮ ТКАНЬ**

*Макарова Э. Б., Захаров Ю. М., Блинкова Н. Б. Киселева Н. С., Рубштейн А. П., Кобылкин К. С., Россия, Челябинск, Екатеринбург*

**ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ CD11b и CD95 НА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

*Маркова В. А., Савочкина А. Ю., Квятковская С. В., Никушкина К. В., Курносенко И.В., Долгушин И. И., Россия, Челябинск*

**ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ ЭНДОТЕЛИЕМ МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИЕЙ КРОВИ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ И СОВМЕСИНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ**

*Матвеева В. Г., Антонова Л. В., Головкин А. С., Россия, Кемерово*

**ИЗМЕНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ СЛИЗИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН ПОД ВЛИЯНИЕМ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН И МУЖЧИН С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НИЖНЕГО ОТДЕЛА УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА**

*Маякова В. Б., Савельева А. А., Курносенко И. В., Россия, Челябинск*

**ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА (ЖКТ) В УСЛОВИЯХ АРКТИКИ**

*Морозова О. С., Филиппова О. Е., Сергеева Т. Б., Щеголева Л. С., Россия, Архангельск*

**ЗАЖИВЛЕНИЕ СТРЕССОВЫХ ЯЗВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА**

*Никольский И. С., Семенова Я.-М. А., Никольская В. В., Украина, Киев*

**ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕЛАТОНИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСИНХРОНОЗЕ В УСЛОВИЯХ СВЕТОДИОДНОГО ИСКУССТВЕННОГО ОСВЕЩЕНИЯ**

*Осиков М. В., Гизингер О. А., Огнева О. И., Россия, Челябинск*

**РОЛЬ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНО РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ НАРУШЕНИЙ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

*Осиков М. В., Телешева Л. Ф., Агеев Ю. И., Никушкина К. В., Сумеркина В. А., Россия, Челябинск*

**УРОВЕНЬ СПОНТАННОЙ И СТИМУЛИРОВАННОЙ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНОМ ЭКСПРЕССИИ CD69 НА Т-ЛИМФОЦИТАХ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

*Пашнина И. А., Россия, Екатеринбург*

**ЭКСПРЕССИЯ CD5 НА В-ЛИМФОЦИТАХ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ЮВЕНИЛЬНОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА**

*Пашнина И. А., Кинясев И. А., Козлова Е. С., Скоробогатова О. В., Россия, Екатеринбург*

**ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА ДЕТЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ В РАМКАХ НАЦИОНАЛЬНОГО КАЛЕНДАРЯ ПРИВИВОК**

*Попов Е. А., Злакоманова О. Н., Москвичева М. Г., Мезенцева Е. А., Никушкина К. В., Россия, Челябинск*

**ВОЗДЕЙСТВИЕ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ С ПОВЫШЕННОЙ ВЯЗКОСТЬЮ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН**

*Савочкина А. Ю., Савельева А. А., Никушкина К. В., Маякова В. Б., Орнер И. Ю., Мезенцева Е. А., Россия, Челябинск*

**РОЛЬ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА И ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА В РАЗВИТИИ ПАРОДОНТОЗА**

*Саркисян Н.Г., Тузанкина И.А., Григорьева Ю.В., Мальчиков И.А., Россия, Екатеринбург*

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ КЛЕТОК CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> У ЖИТЕЛЕЙ ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРА В ВОЗРАСТЕ 19-40 ЛЕТ**

*Сергеева Т. Б., Щёголева Л. С., Россия, Архангельск*

**ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ БТШ70 ЛЕЙКОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**

*Сертакова О. В., Бахманова Е. Н., Стручков П. В., Балякин Ю. В., Хомякова Н. Ф., Родоман Г. В., Сапожников А. М., Россия, Москва*

**ОПЫТ ИЗМЕРЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОГО СТАТУСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 5-ЦВЕТНОГО АНАЛИЗА**

*Субботовская А. И., Кудрявцев И. В., Россия, Новосибирск, Санкт-Петербург, Владивосток*

**СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЖЕНЩИН РАННЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ В УСЛОВИЯХ ПРОЖИВАНИЯ В ПРОМЫШЛЕННОМ ГОРОДЕ**

*Тиунова Т. А., Россия, Екатеринбург, Челябинск*

**ОЦЕНКА УРОВНЕЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ У ЖЕНЩИН РАННЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С МАСТОПАТИЕЙ И РАКОМ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗЫ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ЭКОЛОГИЧЕСКИ НЕБЛАГОПОЛУЧНОГО РЕГИОНА**

*Тиунова Т. А., Россия, Екатеринбург, Челябинск*

**КОМПЛЕКСНАЯ ТЕРАПИЯ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЖЕНЩИН, СТРАДАЮЩИХ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ, НА ЭТАПЕ ПРЕДГРАВИДАРНОЙ ПОДГОТОВКИ**

*Тулупова М. С., Столина М. Л., Хамошина М. Б., Маркелова Е. В., Бениова С.Н., Родионова О. М., Россия, Владивосток, Москва*

**ЦИТОКИНОВЫЙ БАЛАНС В ОЦЕНКЕ ВЛИЯНИЯ МИЛИАЦИНА НА  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ**

*Филиппова Ю. В., Панфилова Т. В., Ермолина Е. В., Железнова А. Д., Ливищи  
Н.М., Сарычева Ю.А., Россия, Оренбург*

**АНТИГАНГЛИОЗИДНЫЕ АУТОАНТИТЕЛА И ДРУГИЕ  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЕМЬЕЛИНИЗИРУЮЩИХ  
ПОЛИНЕВРОПАТИЙ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ**

*Шевченко А. В., Россия, Москва*

**ПРОДУКЦИЯ ЭНДОГЕННЫХ ЦИТОКИНОВ И ЭРИТРОПОЭЗ В  
КУЛЬТУРЕ ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ**

*Шевяков С. А., Захаров Ю. М., Россия, Челябинск*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПАЦИЕНТОВ С  
СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

*Широбокова М. В., Чукичев А. В., Злакоманова О. Н., Россия, Челябинск*

**ИММУННЫЙ СТАТУС ЖЕНЩИН ПРИПОЛЯРЬЯ РАЗНЫХ  
ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ПРОЛАКТИНА**

*Щёголева Л. С., Туманова М. С., Шашкова Е. Ю., Филиппова О. Е., Сергеева Т.  
Б., Россия, Архангельск*

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ КЛЕТОК CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> У  
ЖИТЕЛЕЙ ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРА В ВОЗРАСТЕ 41-60 ЛЕТ**

*Щёголева Л. С., Шашкова Е.Ю. Россия, Архангельск*

Основными направлениями деятельности созданного в 2003 году Института иммунологии и физиологии УрО РАН являются:

- иммунные механизмы регуляции физиологических функций
- молекулярные механизмы мышечного сокращения и биомеханика неоднородного миокарда

В Институте иммунологии и физиологии УрО РАН фундаментальные научные исследования проводятся по разделу биологические науки (VI) программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2008-2012 годы. Исследования проводятся по шести научным направлениям:

- структура и функции биомолекул и надмолекулярных комплексов
- молекулярные механизмы клеточной дифференцировки, иммунитета и онкогенеза
- клеточная биология, теоретические основы клеточных технологий
- биофизика, радиобиология, математические модели в биологии, биоинформатика
- физиология нервной и висцеральных систем, клиническая физиология
- эволюционная, экологическая физиология, системы жизнеобеспечения и защиты человека

На сегодняшний момент институт обладает самой современной технической базой, необходимой для проведения фундаментальных исследований в области иммунологии и физиологии.

**Адрес:** 620219, Российская Федерация, Екатеринбург ул. Первомайская, 106

**Телефон (факс):** + 7 (343) 374-00-70

**E-mail:** [iip@iip.uran.ru](mailto:iip@iip.uran.ru)



Компания Beckman Coulter Inc. была образована в 1997 году в результате объединения двух компаний, Beckman Instruments Inc. и Coulter Corporation, успешно работавших с 1935 и 1958 гг. соответственно на рынке клинической лабораторной диагностики и научных исследований.

Открытое в Москве в 2009 году ООО «Бекмен Культер» - представительство Beckman Coulter отвечает за информационную поддержку пользователей продукции компании.

В 2011 году выделено два подразделения компании Beckman Coulter Diagnostics, отвечающее за продукцию для клиничко-диагностических лабораторий, и Beckman Coulter Life Sciences, специализирующееся на оборудовании для научно-прикладных исследований в области медицины и биологии.

Портфолио Beckman Coulter Life Sciences представлено следующим оборудованием:

- клинические и научные проточные цитофлуориметры, станции пробододготовки и специализированное программное обеспечение
- реагенты и расходные материалы для проточной цитофлуориметрии
- клеточные сортеры
- препаративные и аналитические ультрацентрифуги
- высокоскоростные и высокопроизводительные центрифуги
- общелабораторные центрифуги
- автоматизированные лабораторные станции
- реагенты для выделения и очистки нуклеиновых кислот
- анализаторы жизнеспособности клеток, количества и размеров частиц

**ООО «Бекмен Культер», отдел научно-прикладного оборудования**

**Адрес:** 109004, Москва, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3

**Телефон:** +7 (495) 984-67-30, факс: +7 (495) 984-67-31

**E-mail:** lsr-russia@beckman.com, сайт: www.beckmancoulter.com



ООО «ЛабТэк Лтд» предлагает новые решения на пути повышения эффективности лабораторных исследований. Организация осуществляет поставку лабораторного оборудования и реактивов ведущих зарубежных компаний:

- Оборудование **Beckman Coulter** для клинической лабораторной диагностики и медико-биологических научных исследований: биохимические, иммунохимические, гематологические анализаторы; проточные цитофлуориметры; системы капиллярного электрофореза; центрифуги; рН-метры; спектрофотометры; секвенаторы; анализаторы количества и размера частиц; сортеры.
- Оборудование для экспресс-лабораторий **Instrumentation Laboratory**: анализаторы газов крови и электролитов; приборы и реагенты для исследования системы гемостаза.
- Широкий спектр пластиковой лабораторной посуды **Sarstedt**: системы взятия венозной и капиллярной крови; готовые пробирки; контейнеры для биологических образцов; расходные материалы для бактериологии, культивирования клеток, ПЦР-диагностики; наконечники для автоматических пипеток.

Деятельность «ЛабТэк Лтд» направлена на создание эффективно функционирующего лабораторного комплекса, отвечающего потребностям специалистов сегодня и в будущем. Организация стремится учитывать всю сферу деятельности заказчиков и их ежедневные запросы, прочные связи с компаниями-производителями позволяют поддерживать доступные и гибкие цены на продукцию высокого качества. ООО «ЛабТэк Лтд» обеспечивает поставку, установку и техническое обслуживание приборов, а также обучение специалистов современным методикам, способствуя внедрению передовых лабораторных технологий.

За 20 лет своей работы организация сумела занять достойное место на отечественном рынке лабораторных технологий.

**ООО «ЛабТэк Лтд» - Передовые лабораторные технологии**

**Адрес:** 191186, Россия, Санкт-Петербург, а/я 238

**Телефон:** (812) 313-02-03, факс: (812) 313-02-04

**E-mail:** labtech@labtech.spb.ru, сайт: www.labtech.su

## Место проведения конференции 25-26 августа

Каштак, санаторий-профилакторий, ОАО Челябинский  
Металлургический Комбинат

Адрес: 454013, г. Челябинск, Сосновая Роща, 72/1



## Место проведения конференции 27 августа

Областной клинический терапевтический госпиталь для ветеранов войн

454076, г. Челябинск, Медгородок, 8



