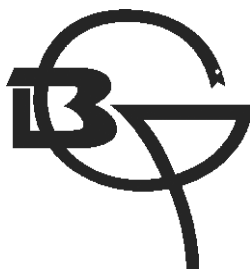


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

БЮЛЛЕТЕНЬ
ВОСТОЧНО-СИБИРСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА



№ 3 (85) Часть 2

2012

ИРКУТСК

Главный редактор

С.И. Колесников

Зам. главного редактора

В.С. Рукавишников

Ответственный секретарь

Т.Г. Карпова

Редакционная коллегия

И.В. Бычков

Е.Г. Григорьев

В.В. Долгих

Л.И. Колесникова

Д.В. Кулеш

И.В. Малов

В.В. Малышев

В.А. Сорокинов

В.В. Шпрах

Редакционный совет

И.П. Артюхов (*Красноярск*), С.В. Балахонов (*Иркутск*), Г.И. Бишарова (*Чита*), А.В. Говорин (*Чита*), Дж. Анн Гроссман (*США, Нью-Йорк*), А.А. Дзизинский (*Иркутск*), В.В. Дворниченко (*Иркутск*), В.В. Захаренков (*Новокузнецк*), Н.Ф. Измеров (*Москва*), В.К. Козлов (*Хабаровск*), В.В. Кожеников (*Улан-Удэ*), М.Т. Луценко (*Благовещенск*), Л.М. Макаров (*Москва*), В.Т. Манчук (*Красноярск*), П. Нямдаваа (*Монголия, Улан-Батор*), А.З. Плюснин (*Финляндия, Хельсинки*), Н.В. Протопопова (*Иркутск*), М.Ф. Савченков (*Иркутск*), Р.К. Салаяев (*Иркутск*), О. Сэргэлэн (*Монголия, Улан-Батор*), К. Такакура (*Япония, Токио*), Е.В. Уварова (*Москва*), Е.А. Шмелева (*Москва*), А.Г. Щуко (*Иркутск*)

Авторы опубликованных материалов несут ответственность за подбор и точность приведенных фактов, цитат, статистических данных и прочих сведений, а также за то, что в материалах не содержится данных, не подлежащих открытой публикации.

Мнение автора может не совпадать с мнением редакции.

Адрес редакции: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16.

ВСНЦ ЭЧ СО РАМН.

Тел. (3952) 20-98-05, 20-90-48, факс. 20-98-13.

E-mail: sikol@sbamsr.irk.ru

Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации СМИ – ПИ № ФС77-47129 от 02 ноября 2011 г.

Основан в 1993 году.

Учредитель – Учреждение Российской академии медицинских наук Восточно-Сибирский научный центр экологии человека Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16).

Бюллетень включен в Реферативный журнал и Базу данных ВИНТИ. Сведения о журнале публикуются в международной справочной системе по периодическим и продолжающимся изданиям "Ulrich's Periodicals Directory".

Бюллетень ВСНЦ СО РАМН входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук».

Подписной индекс 24347.

© Восточно-Сибирский научный центр экологии человека СО РАМН, 2012 г.

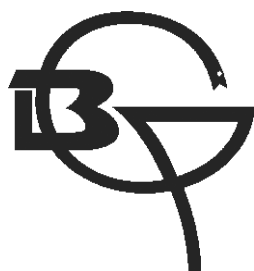
© Оригинал-макет РИО НЦРВХ СО РАМН, 2012 г., тел. (3952) 29-03-37.

Тираж – 500 экз.

Отпечатано в НЦРВХ СО РАМН, Иркутск, ул. Борцов Революции, 1.

RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES
SIBERIAN BRANCH

BULLETIN
OF EASTERN-SIBERIAN SCIENTIFIC CENTER



N 3 (85) Part 2

2012

IRKUTSK

Chief Editor

S.I. Kolesnikov

Deputy Chief Editor

V.S. Rukavishnikov

Executive secretary

T.G. Karpova

Editorial board

I.V. Bychkov

E.G. Grigoriev

V.V. Dolgikh

L.I. Kolesnikova

D.V. Kulesh

I.V. Malov

V.V. Malyshev

V.A. Sorokovikov

V.V. Shprakh

Editorial Council

I.P. Artyukhov (*Krasnoyarsk*), S.V. Balakhonov (*Irkutsk*), G.I. Bisharova (*Chita*), A.V. Govorin (*Chita*), J. Ann Grossman (*USA, New-York*), A.A. Dzizinskiy (*Irkutsk*), V.V. Dvornichenko (*Irkutsk*), V.V. Zakharenkov (*Novokuznetsk*), N.F. Izmerov (*Moscow*), V.K. Kozlov (*Khabarovsk*), V.V. Kozhevnikov (*Ulan-Ude*), M.T. Lutsenko (*Blagoveshchensk*), L.M. Makarov (*Moscow*), V.T. Manchouk (*Krasnoyarsk*), P. Nyamdavaa (*Mongolia, Ulaanbaatar*), A.Z. Plusnin (*Finland, Helsinki*), N.V. Protopopova (*Irkutsk*), M.F. Savcheykov (*Irkutsk*), R.K. Salyajev (*Irkutsk*), O. Sergelen (*Mongolia, Ulaanbaatar*), K. Takakura (*Japan, Tokyo*), E.V. Uvarova (*Moscow*), E.A. Shmeliova (*Moscow*), A.G. Shchuko (*Irkutsk*)

The authors of the published articles account for choice and accuracy of presented facts, quotations, historical data and other information; the authors are also responsible for not presenting data which are not meant for open publication.

The opinion of the authors may not coincide with that of editorial board.

Address of editorial board: 16, Timiryaseva str., Irkutsk, Russia, 664003

Presidium of ESSC HE SB RAMS.

Tel. (3952) 20-98-05, 20-90-48, fax. 20-98-13.

E-mail: sikol@sbamsr.irk.ru

Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences is registered in Federal Service of Supervision in communication sphere, information technologies and mass media. Certificate of Mass Media Registration – ПИ № ФС77-47129 of 2 November 2011.

The Bulletin has been founded in 1993.

Founder – Eastern-Siberian Scientific Center of Human Ecology of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (16, Timiryaseva str., Irkutsk, Russia, 664003).

Bulletin is included in Abstract Journal and Data base of All-Russian Institute of Scientific and Technical Information. Information about the Bulletin is published in international question-answering system of periodicals and continued publications "Ulrich's Periodicals Directory".

Bulletin ESSC SB RAMS is included in «List of Russian reviewed scientific periodicals where main scientific results of dissertations for a degree of Candidate and Doctor of Science should be published»

Subscription index 24347.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Клиническая медицина

- Абраматец Е.А., Ефимова Н.В. Оценка информативности некоторых факторов в формировании алергопатологии дыхательных путей у подростков 11
- Альтман Д.Ш., Давыдова Е.В., Кочеткова Н.Г., Зурочка А.В. Темпы биологического старения и маркеры аллостаза у ветеранов афганского конфликта с ранними формами хронической ишемии мозга 15
- Альтман Д.Ш., Давыдова Е.В., Кочеткова Н.Г., Светлакова В.А. Липидный профиль сыворотки крови, показатели перекисного окисления липидов и состояние нитроксидергической системы ветеранов Афганистана с ранними формами хронической ишемии мозга 19
- Альшевская А.А., Васильев Ф.Ф., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Мембраносвязанные и растворимые рецепторы к фактору некроза опухоли- α в норме и при ревматоидном артрите 23
- Баранова Д.С., Сахно Л.В., Крючкова И.В., Пронкина Н.В., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Гилевич А.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Ушакова Г.Ю., Останин А.А., Поспелова Т.И., Черных Е.Р. Сравнительная характеристика субпопуляционного состава и цитокин-продуцирующей функции клеток продукта сепарации больных лимфомами и острыми лейкозами 29
- Баторов Е.В., Шевела Е.Я., Крючкова И.В., Баранова Д.С., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Влияние мезенхимальных стромальных клеток на клинко-лабораторные показатели эффективности трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у больных лимфомами 33
- Бахметьев Б.А., Зверев С.Я., Калашникова Н.С., Ключникова Л.В. Актуальность разработки возрастных норм иммунофенотипирования клеток крови для мониторинга за состоянием здоровья детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями 38
- Бодиенкова Г.М., Алексеев Р.Ю. Закономерности компенсаторно-приспособительных реакций иммунного ответа работающих при хроническом воздействии винилхлорида 46
- Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И. Закономерности изменений иммунного ответа при воздействии паров металлической ртути на работающих 50
- Борисов А.Г., Савченко А.А. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета при остром и хроническом вирусном гепатите В 53
- Борисова И.В., Смирнова С.В. Тактика этиотропной терапии пищевой аллергии у детей 58
- Веселова Ж.В., Козлова Л.С., Джигоев Ю.П., Иванова Е.И., Попкова С.М. Микробиологическая характеристика кишечного биотопа у детей с аллергическими заболеваниями 63

Clinical medicine

- Abramatets E.A., Efimova N.V. The estimation of information value of certain factors in the formation of al-
lergopatology of the respiratory tract in adolescents
- Altman D.Sh., Davydova E.V., Kochetkova N.G., Zurochka A.V. Growth of biological markers of aging and allostasis in veterans of the Afghan war conflict with early forms of chronic brain ischemia
- Altman D.Sh., Davydova E.V., Kochetkova N.G., Svetlakova V.A. Lipid profile of blood serum, lipid peroxidation and nitroxidergic system of veterans of the Afghan conflict with early forms of chronic brain ischemia
- Alshevskaya A.A., Vasiliev F.F., Lopatnikova J.A., Sennikov S.V. Tumor necrosis factor- α membrane-bound and soluble receptors in norm and in rheumatoid arthritis
- Baranova D.S., Sakhno L.V., Kruchkova I.V., Pronkina N.V., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Gilevich A.V., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Ushakova G.Yu., Ostanin A.A., Pospelova T.I., Chernykh E.R. The comparative analysis of graft cell subtypes and its cytokine production of lymphoma and leucosis patients
- Batorov E.V., Shevela E.Ya., Kryuchkova I.V., Baranova D.S., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Ushakova G.Yu., Gilevich A.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Clinical effects of mesenchymal stromal cells in lymphoma patients with autologous hematopoietic stem cell transplantation
- Bakhmetyev B.A., Zverev S.Ya., Kalashnikova N.S., Kluchnikova L.V. Necessity of age-related standards for immune phenotyping of blood cells for monitoring of health in children born by HIV-infected women
- Bodienkova G.M., Alexeyev R.Yu. Regularities of compensatory-adaptive reactions immune response of workers in chronic exposure to vinyl chloride
- Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I. Change of regularities of immune response in workers exposed to metal mercury vapors
- Borisov A.G., Savchenko A.A. Features of cellular and humoral immunity in acute and chronic viral hepatitis B
- Borisova I.V., Smirnova S.V. Tactics of etiotropic therapy of food allergy of children
- Veselova Zh.V., Kozlova L.S., Dzhioyev Yu.P., Ivanova E.I., Popkova S.M. Microbiological characterization of intestinal biotope in children with allergic diseases

- Голикова Е.А., Лопатникова Ю.А., Шкаруба Н.С., Сизиков А.Э., Сенников С.В. TNF, растворимые рецепторы и аутоантитела к TNF у больных ревматоидным артритом и условно здоровых доноров 67
- Данусевич И.Н., Козлова Л.С., Сутурина Л.В., Ильин В.П., Бекетова И.С. Состояние основных звеньев иммунной системы у женщин с репродуктивными нарушениями на фоне хронического эндометрита и при его отсутствии 72
- Долгих Т.И., Турская Ю.И., Баринов С.В., Белкова Т.Н. Иммунологические критерии внутриутробного инфицирования плода 75
- Иванова И.П., Савкин И.В., Селедцова Г.В., Шишков А.А., Селедцов В.И. Фенотипические характеристики и внутриклеточные цитокины Т-клеток памяти у больных рассеянным склерозом после Т-клеточной вакцинации 79
- Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А. Особенности иммунитета у больных аллергическим риносинуситом в зависимости от иммунопатологической основы запуска аллергической реакции 83
- Костина Е.М. Применение многофакторного анализа в оценке эффективности иммунотерапии ВП-4 у больных бронхиальной астмой, осложненной очагами хронической инфекции 88
- Кошкина А.А., Новицкий В.В., Уразова О.И., Есимова И.Е., Хасанова Р.Р. Особенности CD3/CD28-индуцированной секреции интерлейкина-2 и субпопуляционный состав Т-лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких 92
- Красильникова К.С., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Аносов М.П., Гордеева Л.А., Глушкова О.А., Попова О.С., Шаталина И.В., Костянко М.В., Равинг Л.С., Глушков А.Н. Ассоциация иммунного ответа на ксено- и эндобиотики и полиморфизма генов ферментов их биотрансформации с возникновением врожденных пороков развития плода 96
- Красницкая А.С., Шитихина А.С. Клинико-иммунологическая эффективность консервативного лечения пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с вирус Эпштейн — Барр инфекцией 100
- Леплина О.Ю., Сахно Л.В., Останин А.А., Богачев С.С., Черных Е.Р. Коррекция *in vitro* дисфункций интерферон- α -индуцированных дендритных клеток у больных иммунопатологическими состояниями 104
- Малежик Л.П., Малежик М.С., Пинелис Ю.И. Состояние системы иммунитета при хроническом генерализованном пародонтите у пожилых людей, страдающих ишемической болезнью сердца 109
- Маснавиева Л.Б., Кудяева И.В. Оценка содержания аутоантител и цитокинов у подростков промышленных центров при скрининговом обследовании 113
- Матвеева В.Г., Головкин А.С., Чернова М.Н., Шукевич Д.Л., Григорьев Е.В. Динамика поверхностной экспрессии триггерного рецептора, экспрессируемого миелоидными клетками-1 (trem-1) на различных субпопуляциях моноцитов в раннем послеоперационном периоде прямой реваскуляризации миокарда 116
- Golikova E.A., Lopatnikova J.A., Shkaruba N.S., Sizikov A.E., Sennikov S.V. TNF, soluble receptors and autoantibodies to TNF of patients with rheumatoid arthritis and healthy donors
- Danusevich I.N., Kozlova L.S., Suturina L.V., Iljin V.P., Beketova I.S. Status of main components of immunity in women with reproductive disorders with chronic endometritis and in its absence
- Dolgikh T.I., Tirskaia Yu.I., Barinov S.V., Belkova T.N. Immunologic marker of intranatal infections
- Ivanova I.P., Savkin I.V., Seledtsova G.V., Shishkov A.A., Seledtsov V.I. Phenotypic characterization and intracellular cytokines of memory T-cells in multiple sclerosis patients after T-cell vaccination
- Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Peculiarities of immunity in patients with allergic rhinosinusitis depending on immune pathological background of allergic reaction triggering
- Kostina E.M. Multivariate analysis use in the efficacy evaluation of immunotherapy with VP-4 in the patients with bronchial asthma complicated by chronic inflammation nidi
- Koshkina A.A., Novitskij V.V., Urazova O.I., Esimova I.E., Hasanova R.R. Peculiarities of CD3/CD28-induced secretion of interleukin-2 and subpopulation composition of T-lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis
- Krasilnikova K.S., Polenok E.G., Anosova T.P., Anosov M.P., Gordeyeva L.A., Glushkova O.A., Popova O.S., Shatalina I.V., Kostyanko M.V., Ravin L.S., Glushkov A.N. The association of immune response to xeno- and endobiotiks and theirs biotransformation enzyme gene polymorphism with congenital malformations of the fetus
- Krasnitskaja A.S., Shitihina A.S. Clinical-immunology efficiency of conservative treatment of patients with chronic tonsillitis associated with Epstein — Barr virus infection
- Leplina O.Yu., Sakhno L.V., Ostanin A.A., Bogachev S.S., Chernykh E.R. Correction of interferon- α -induced dendritic cell dysfunctions in immunocompromised patients
- Malezhic L.P., Malezhic M.C., Pinelis Y.I. The state of immune system in old-aged patients with chronic generalized periodontitis and coronary heart disease
- Masnaviyeva L.B., Kudayeva I.V. Assessments of autoantibody and cytokine contents in teenagers of industrial centers screening examination
- Matveyeva V.G., Golovkin A.S., Chernova M.N., Shukovich D.L., Grigoryev E.V. Dynamics of surface expression of trigger receptor, expressed by myeloid cells-1 (trem-1) on various subpopulations of monocytes in early postoperative period of direct revascularization of myocardium

- Минина В.И., Баканова М.Л., Савченко Я.А., Тимофеева А.А., Аносова Т.П., Титов В.А., Вержбицкая Н.Е., Глушков А.Н. Исследование взаимосвязи между полиморфизмом генов репарации ДНК и частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови больных раком легкого 121
- Морозов С.А., Томаш Г.В., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Смык А.В., Старостина Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. М2-подобные макрофаги как потенциальные кандидаты в лечении последствий церебрального инсульта 125
- Мулера Т.А., Филимонов С.Н., Лузина Ф.А., Дорошилова А.В., Онищенко Е.Г., Замятина Г.С., Колбаско А.В. Исследование иммуногенетических факторов риска артериальной гипертензии у коренного и некоренного населения Республики Алтай 129
- Орлова Е.А. ROC-анализ нейроиммунологических показателей у больных с хронической психогенной крапивницей 133
- Панасенко Л.М., Ширинский И.В., Карцева Т.В., Ширинский В.С. Эффективность и безопасность применения иммуномодуляторов в профилактике осложнений у больных коклюшем 138
- Пашнина И.А., Криволапова И.М., Тузанкина И.А., Черешнев В.А. Использование различных лабораторных методов для определения антинуклеарных антител у пациентов с аутоиммунными заболеваниями соединительной ткани 143
- Плужникова Н.А., Анисимова Н.Ю., Лебединская О.В., Цветков Д.С., Годовалов А.П., Киселевский М.В. Динамика сывороточных иммуноглобулинов онкологических больных в периоперационном периоде 148
- Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Аносов М.П., Красильникова К.С., Гуров Е.А., Титов В.А., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А., Рагожина С.Е., Глушков А.Н. Антитела к бензо[а]пирену в сыворотке крови больных немелкоклеточным раком легкого 151
- Попова О.С., Гордеева Л.А., Шаталина И.В., Воронина Е.Н., Оленникова Р.В., Нерсисян С.Л., Филиппенко М.Л., Глушков А.Н. Ассоциации полиморфизмов генов цитокинов с невынашиванием беременности инфекционного генеза 155
- Савченко А.А., Здитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета у больных с распространенным гнойным перитонитом 159
- Сарап П.В., Останин А.А., Винник Ю.С. Кластерная структура организации иммунного статуса пациентов с urgent хирургической патологией 164
- Сахно Л.В., Тихонова М.А., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р. Интерлейкин-10 как потенциальный регулятор pd-1-b7-h1-опосредуемой цитотоксической активности дендритных клеток 170
- Силков А.Н., Ковалевская-Кучерявенко Т.В., Фалалеева С.А., Шевченко Ю.А., Непомнящих В.М., Сенников С.В. Сывороточные уровни цитокинов и их продукция мононуклеарными клетками периферической крови у больных atopическим дерматитом 175
- Смирнова С.В., Малык У.В., Смольникова М.В. Особенности морфологии червеобразного отростка 175
- Minina V.I., Bakanova M.L., Savchenko J.A., Timopheeva A.A., Anosova T.P., Titov V.A., Verghbizkaja N.E., Glushkov A.N. Association of DNA repair gene polymorphism with chromosomal aberrations in the blood lymphocytes of patients with lung cancer
- Morozov S.A., Tomash G.V., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Smyk A.V., Starostina N.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R. M2-like macrophages are potential candidates for brain stroke outcomes' treatment
- Mulero T.A., Filimonov S.N., Luzina F.A., Doroshilova A.V., Onishchenko E.G., Zamyatina G.A., Kolbasko A.V. Study of immune genetic risk factors of arterial hypertension in native and non-native population of Altay Republic
- Orlova E.A. ROC-analysis of neuroimmunologic indices in patients with chronic psychogenic urticaria
- Panasenko L.M., Shirinskiy I.V., Kartseva T.V., Shirinskiy V.S. Efficacy and safety of immunomodulators application in prevention of complications in patients with pertussis
- Pashnina I.A., Krivolapova I.M., Tuzankina I.A., Chereshev V.A. Application of different laboratory methods for antinuclear autoantibodies investigation in patients with autoimmune connective tissue diseases
- Pluzhnikova N.A., Anisimova N.Yu., Lebedinskaya O.V., Tsvetkov D.S., Godovalov A.P., Kiselevsky M.V. Dynamics of serum immunoglobulins in oncological patients during perioperative period
- Polenok E.G., Anosova T.P., Anosov M.P., Krasilnikova K.S., Gurov E.A., Titov V.A., Verzhbitskaja N.E., Vafin I.A., Ragozhina S.E., Glushkov A.N. Antibodies to benzo[a]pyrene in serum of patients with non-small cell lung cancer
- Popova O.S., Gordeyeva L.A., Shatalina I.V., Voronina E.N., Olennikova R.V., Nersesyan S.L., Filippenko M.L., Glushkov A.N. Associations of polymorphisms in cytokine genes with the infectious genesis of recurrent miscarriage
- Savchenko A.A., Zditovetskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Features of cellular and humoral immunity in patients with extensive purulent peritonitis
- Sarap P.V., Ostanin A.A., Vinnik Y.S. Cluster structure of organization of immune status in patients with urgent surgical pathology
- Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Leplina O.Yu., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Interleukin10 regulates pd-1b7h1 mediated cytotoxic activity of dendritic cells
- Silkov A.N., Kovalevskaya-Kucheryavenko T.V., Falaleeva S.A., Shevchenko J.A., Nepomnyaschikh V.M., Sennikov S.V. Serum level and production of cytokines by PBMC in patients with atopical dermatitis
- Smirnova S.V., Malyk U.V., Smolnikova M.V. The morphology features of the appendix and immu-

и иммунопатогенеза острого аппендицита у больных аллергией	180	nopatogenesis of acute appendicitis at patients with allergy
Смирнова О.В. Хронический миелолейкоз — клинические и иммунологические особенности у взрослых больных	185	Smirnova O.V. Chronic myeloid leukemia — clinical and immunological peculiarities in adult patients
Смоляникова М.В., Смирнова С.В. Ассоциация полиморфных маркеров генов <i>IL4</i> (C-590T) и <i>IL10</i> (C-597A) с псориатическим артритом	190	Smolnikova M.V., Smirnova S.V. Association between polymorphic markers of the <i>IL4</i> (C-590T) and <i>IL10</i> (C-597A) genes and psoriatic arthritis
Смык А.В., Абрамова Т.Я., Соловьева И.Г., Непомнящих В.М., Труфакин С.В., Кожевников В.С. Психофизиологические и иммунологические характеристики больных бронхиальной астмой и здоровых женщин с различной функциональной асимметрией мозга	194	Smyk A.V., Abramova T.Ya., Solovjeva I.G., Nepomnyashchikh V.M., Trufakin V.S., Kozhevnikov V.S. Psychophysiologic and immunologic characteristics in patients with bronchial asthma and in healthy men with different functional asymmetry of the hemispheres of the brain
Терещенко С.Ю., Лаптева Л.В. Содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в мембранах эритроцитов у детей с atopическим дерматитом (АД) различной степени тяжести	200	Tereshchenko S.Yu., Lapteva L.V. The content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in membranes of erythrocytes in children with atopical dermatitis (AD) of varying severity
Тютин О.С., Смирнова С.В., Смоляникова М.В., Ильенкова Н.А. Клинико-иммунологические особенности atopической бронхиальной астмы в зависимости от уровня контроля над заболеванием у детей	204	Tyutina O.S., Smirnova S.V., Smolnikova M.V., Ilyenkova N.A. Clinical immunological peculiarities of atopical bronchial asthma depending from the level of control over the disease in children
Хонина Н.А., Селедцова Н.В., Тихонова М.А., Овсянникова Т.В., Черных Е.Р. Содержание регуляторных Т-клеток в периферической крови и эндометриальной ткани в динамике менструального цикла	208	Khonina N.A., Seledtsova N.V., Tikhonova M.A., Ovsyannikova T.V., Chernykh E.R. Contents of regulatory T-cells in peripheral blood and endometrial tissue in dynamic of menstrual cycle
Целых Е.Д., Евсеева Г.П., Козлов В.К., Ефименко М.В., Токарева Н.С., Горбатова О.Ю. Изменение показателей цитокинового профиля у подростков в зависимости от особенностей питания	212	Tselykh E.D., Evseyeva G.P., Kozlov V.K., Efimenko M.V., Tokareva N.C., Gorbatova O.Yu. Change of indicators cytokine profile in adolescents depending on the characteristics of food
Шагарова С.Г., Смирнова С.В., Зенкина Л.В. Особенности иммунореактивности и метаболизма лимфоцитов крови в зависимости от патогенеза бронхиальной астмы	217	Shagarova S.G., Smirnova S.V., Zenkina L.V. The peculiarities of the immunoreactivity and blood lymphocytes metabolism depending on the bronchial asthma pathogenesis
Шаравии А.О., Смирнова С.В. Микоплазмоз, хламидиоз и бронхиальная астма с позиций этногенеза	222	Sharavii A.O., Smirnova S.V. Mycoplasmosis, chlamydia and bronchial asthma from ethnogenetic position
Шестакова Н.А., Кожевников В.С. Влияние иммунотерапии активированными Т-лимфоцитами на параметры клеточного иммунитета больных разными формами atopического дерматита	226	Shestakova N.A., Kozhevnikov V.S. Effect of immunotherapy activated T-lymphocytes on cellular immunity in different forms of atopical dermatitis
Шипунов М.В., Старостина Н.М., Гельфгат Е.Л., Черных Е.Р., Останин А.А. Иммунные предикторы фиброгенеза и их использование для неинвазивной диагностики фиброза печени у больных хроническими вирусными гепатитами	231	Shipunov M.V., Starostina N.M., Gelfgadt E.L., Chernykh E.R., Ostanin A.A. Immune predictors of fibrogenesis and their application for non-invasive diagnostics of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis
Шкаруба Н.С., Васильев Ф.Ф., Силков А.Н., Сеникова Ю.А., Лопатникова Ю.А., Сизиков А.Э., Калашникова Т.А., Сизякина Л.П., Шульман Ю.Б., Долгих С.В., Мазуров В.И., Сеников С.В. Частота встречаемости аллельных вариантов генов <i>TNFR1</i> в позициях -609 и -1207 и <i>TNFR2</i> типа в позициях -1709 и -3609 среди условно-здоровых доноров и у больных ревматоидным артритом	237	Shkaruba N.S., Vasiliev P.P., Silkov A.N., Sennikova J.A., Lopatnikova J.A., Sizikov A.E., Kalashnikova T.A., Szyakina L.P., Shulman J.B., Dolgikh S.V., Mazurov V.I., Sennikov S.V. The frequency of allelic variants of genes <i>TNFR1</i> at positions -609 and -1207 and <i>TNFR2</i> at positions -1709 and -3609 in healthy donors and patients with rheumatoid arthritis
Шмелева Е.А., Фирсова Т.Н., Попкова С.М., Ракова Е.Б., Сердюк Л.В., Губин М.М. Антиоксидантные антитела в сыворотках крови здоровых взрослых людей при разных схемах вакцинации	241	Shmeleva E.A., Firsova T.N., Popkova S.M., Rakova E.B., Serdyuk L.V., Gubin M.M. Antitoxic antidiphtherial antibodies in blood sera of healthy adults under different vaccination schemes

**Экспериментальные исследования
в биологии и медицине**

**Experimental researches
in biology and medicine**

- Антонова Л.В., Бурого А.Ю., Матвеева В.Г., Кургявцева Ю.А., Насонова М.В., Торопова Я.Г., Великанова Е.А., Головкин А.С. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на скорость биодеградации матриц из полиоксикапролатов и поликапролактона 249
- Ахматова Н.К., Лебединская О.В., Бродовский М.Б., Ахматов Э.А., Лебединская Е.А., Ильиных Е.А., Курбатова Е.А. Уровень цитокинов в сыворотках мышей при мукозальной иммунизации антигенами условно патогенных микроорганизмов 253
- Брындина И.Г., Васильева Н.Н., Казакова М.В. Пептидергические механизмы регуляции бактерицидной активности альвеолярных макрофагов в условиях эмоционального стресса 257
- Гаврилова Е.Д., Кудяева О.Т., Колесникова О.П., Козлов В.А. Вклад пролиферативной активности антителопродуцентов в иммунный ответ и ее устойчивость к ингибиторам 260
- Гамалей С.Г., Батенева А.В., Урманцева З.Ф., Сысоева Г.М., Маркус Я.В., Даниленко Е.Д., Михайлова В.К., Волосникова Е.А., Левагина Г.М., Масычева В.И. Лекарственная форма фактора некроза опухоли альфа для местного применения 264
- Гойман Е.В., Ткачев В.О., Кудяева О.Т., Колесникова О.П., Козлов В.А. Лимфопения как фактор развития аутоиммунного процесса при хронической реакции трансплантат против хозяина у мышей 267
- Горчакова О.В., Горчаков В.Н. Морфофункциональная оценка иммунного состояния лимфатического узла геронтов в условиях фитотерапии 271
- Ермолаева Е.Н., Кривохижина Л.В., Сурина-Марышева Е.Ф. Влияние церулоплазмينا на количественный состав и функциональную активность лейкоцитов при острой физической нагрузке субмаксимальной мощности 277
- Згор В.В., Маркелова Е.В. Состояние цитокинового профиля при экспериментальном тиреотоксикозе у крыс Вистар 280
- Княжева М.А., Рыжикова С.Л., Рябичева Т.Г., Маркова Е.В. Влияние трансплантации обработанных кофеином иммунокомпетентных клеток на параметры функциональной активности нервной системы 284
- Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Бродовский М.Б., Ильиных Е.А., Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Мелехин С.В. Морфофункциональные особенности формирования мукозального иммунитета под влиянием различных методов введения условно патогенных микроорганизмов 288
- Плехова Н.Г., Ляпун И.Н., Сомова Л.М., Компанец Г.Г., Смирнов И.Н. Реактивность клеток врожденного иммунитета в патогенезе хантавирусной инфекции 296
- Половников Е.В., Ступак В.В., Самохин А.Г., Васильев И.А., Добрякова О.Б., Шевела Е.Я., Черных Е.Р. Влияние мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани человека на эффективность восстановления неврологического
- Antonova L.V., Burago A.Y., Matveyeva V.G., Kudryavtseva Y.A., Nasonova M.V., Toropova Y.G., Velikanova E.A., Golovkin A.S. Impact of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells on speed of polycaprolactone and polyhydroxyalkanoate scaffolds biodegradation
- Akhmatova N.K., Lebedinskaya O.V., Brodovsky M.B., Akhmatov E.A., Lebedinskaya E.A., Ilinykh E.A., Kurbatova E.A. Mice serum cytokine level under mucosal immunization with opportunistic microbial antigens
- Bryndina I.G., Vasilyeva N.N., Kazakova M.V. Peptidergic mechanisms of regulation of bactericidal activity of alveolar macrophages in condition of emotional stress
- Gavrilova E.D., Kudayeva O.T., Kolesnikova O.P., Kozlov V.A. The deposit of antibody's proliferative activity in the immune response and its resistance to inhibitors of proliferation
- Gamaley S.G., Bateneva A.V., Urmantseva Z.F., Sisoyeva G.M., Markus Ya.V., Danilenko E.D., Mikhaylova V.K., Volosnikova E.A., Levagina G.M., Masicheva V.I. Medicinal form of TNF- α for local administration 264
- Goiman E.V., Tkachev V.O., Kudayeva O.T., Kolesnikova O.P., Kozlov V.A. Lymphopenia as a factor involved in the autoimmunity development in murine graft vs. host disease
- Gorchakova O.V., Gorchakov V.N. Morphofunctional estimation of immune function of lymph node of old age in the conditions of phytotherapy
- Ermolayeva E.N., Krivokhizhina L.V., Surina-Marysheva E.F. Effect of ceruloplasmin the quantitative composition and functional activity of leukocytes in acute physical load submaximal power
- Zdor V.V., Markelova E.V. Cytokine profile in Wistar rats with experimental thyreotoxicosis
- Knyazheva M.A., Rizikova S.L., Ryabicheva T.G., Markova E.V. Effect of transplantation of immunocompetent cells treated with caffeine on the parameters of the nervous system functional activity
- Lebedinskaya O.V., Akhmatova N.K., Brodovsky M.B., Ilinykh E.A., Egorova N.B., Kurbatova E.A., Melekhin S.V. Morphofunctional peculiarities of mucosal immunity depending on methods of opportunistic microbial introduction
- Plekhnova N.G., Lyapun I.N., Somova L.M., Kompnec G.G., Smirnov I.N. Reactivity of cells innate immunity in the pathogenesis of hantaviral infection
- Polovnikov E.V., Stupak V.V., Samokhin A.G., Vasiliev I.A., Dobryakova O.B., Shevela E.Ya., Chernykh E.R. Human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cell influence on neurological deficit recovery in a model of severe

дефицита в модели черепно-мозговой травмы у крыс	301	traumatic brain injury in rats
Савкин И.В., Кащенко Э.А., Селедцова Г.В. Специфическая и неспецифическая иммунореактивность при экспериментальном опухолевом процессе	305	Savkin I.V., Kaschenko E.A., Seledtsova G.V. Specific and nonspecific immunoreactivity at the experimental tumor process
Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж., Клименков И.В., Семенов Н.В. Клеточные реакции и механизмы их регуляции в очаге экспериментального асептического воспаления	309	Serebrennikova S.N., Seminsky I.Zh., Klimenkov I.V., Semenov N.V. There are cell's reactions and regulatory mechanisms at the experimental aseptic inflammation
Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж., Клименков И.В., Семенов Н.В. Роль азоксимера бромида в механизмах регуляции клеточных реакций в очаге микробного воспаления	312	Serebrennikova S.N., Seminsky I.Zh., Klimenkov I.V., Semenov N.V. The role of azoximera bromide in regulatory mechanisms of cell's reactions at the microbic inflammation
Тарских М.М., Климацкая Л.Г., Колесников С.И. Исследование нейротоксичности акрилатов в эксперименте и у рабочих акрилонитрильного производства	316	Tarskikh M.M., Klimatskaya L.G., Kolesnikov S.I. Research of neurotoxicity of acrylates in experiment and in workers of acrylonitrile production
Трулев А.С., Кудрявцев И.В., Назаров П.Г. Факторы острой фазы воспаления как модуляторы взаимодействия тучных клеток и фибробластов	319	Trulioff S.A., Kudryavtsev I.V., Nazarov P.G. Factors of the acute phase of inflammation as modulators of the interaction of mast cells and fibroblasts
Турмова Е.П., Григорюк А.А., Бычков Е.А., Маркелова Е.В., Чикаловец И.В. Изучение применения иммуномодулятора «Галавит» при экспериментальном атеросклерозе	323	Turmova E.P., Grigoryuk A.A., Bichkov E.A., Markelova E.V., Chihkalovets I.V. Studying of application immunomodulator «Galavit» at experimental atherosclerosis
Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Цитотоксическая активность дендритных клеток против активированных CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т-лимфоцитов в культуре <i>in vitro</i>	327	Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tihonova M.A., Ostantin A.A., Chernykh E.R. Cytotoxic activity of dendritic cells against activated CD4 ⁺ and CD8 ⁺ t-lymphocytes in the culture <i>in vitro</i>
Шевела Е.Я., Васильев И.А., Ступак В.В., Половников Е.В., Самохин А.Г., Окладников Г.И., Морозов Д.В., Головнев В.А., Черных Е.Р. Мезенхимальные стромальные клетки в коррекции неврологического дефицита и морфологических изменений в модели очаговых повреждений головного мозга, индуцированных нарушением венозного кровотока	332	Shevela E.Ya., Vasiljev I.A., Stupak V.V., Polovnikov E.V., Samokhin A.G., Okladnikov G.I., Morozov D.V., Golovnyov V.A., Chernukh E.P. Mesenchymal stromal cells in correction of neurological deficit and morphological changes in the rat model of focal cerebral lesions induced by venous blood flow disorder
Шилов Д.Ю., Шилов Ю.И. Иммуномодулирующее действие соталола гидрохлорида при остром стрессе	337	Shilov D.Ju., Shilov Ju.I. Immunomodulatory effect of sotalol hydrochloride under acute stress
Шилов С.Ю., Шилов Ю.И. Влияние гидрокортизона и блокады бета-адренорецепторов в эффекторную фазу иммунного ответа на фагоцитарную активность клеток регионарного лимфатического узла, моноцитов крови и перитонеальных макрофагов	343	Shilov S.Ju., Shilov Ju.I. Influence of hydrocortisone and beta-adrenergic receptor blockade in effector phase of the immune response on phagocytic activity of regional lymph node cells, blood monocytes and peritoneal macrophages
Шилов Ю.И., Годовалов А.П. Адренергическая регуляция иммунного ответа при экспериментальном тиреотоксикозе у крыс	348	Shilov Ju.I., Godovalov A.P. Adrenergic regulation of immune response under experimental thyrotoxicosis in rats

Обзоры литературы

Ширинский В.С., Ширинский И.В. Определение содержания цитокинов в решении основных клинических задач	355	Shirinskiy V.S., Shirinskiy I.V. Defining cytokines contents in solving main clinical issues
Ширинский И.В., Половникова О.А., Ширинский В.С. Аутоиммунные заболевания и атеросклероз — проблемы лечения	358	Shirinskiy I.V., Polovnikova O.A., Shirinskiy V.S. Auto-immune diseases and atherosclerosis — problems of treatment
Правила оформления статей в «Бюллетень ВСНЦ СО РАМН»	363	Rules of publication of articles in «Bulletin ESSC SB RAMS»

Reviews of literature

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616.211-002-056.43-053.2-02:614.72:312.6(571.53)

Е.А. Абраматец^{1, 2}, Н.В. Ефимова¹ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ
АЛЛЕРГОПАТОЛОГИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПОДРОСТКОВ¹ Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (Ангарск)² Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)

Распространенность бронхиальной астмы (БА) и круглогодичного аллергического ринита (КАР) по данным анкетирования и медицинского осмотра подростков, проживающих в промышленном центре Иркутской области, составляла $68 \pm 3,4$ случая на 100 обследованных. Наибольшую информативность имели факторы: положительные прик-тесты, выявляемые при кожном тестировании, частые респираторные заболевания в анамнезе, пассивное курение и отягощенная наследственность.

Ключевые слова: подростки, хронические аллергические заболевания дыхательных путей, информативность

THE ESTIMATION OF INFORMATION VALUE OF CERTAIN FACTORS IN THE FORMATION
OF ALLERGOPATOLOGY OF THE RESPIRATORY TRACT IN ADOLESCENTSЕ.А. Abramatecs^{1, 2}, N.V. Efimova¹¹ East-Siberian Scientific Center of Human Ecology of SB RAMS, Angarsk² Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

The prevalence of the bronchial asthma (BA) and the perennial allergic rhinitis (CAR), according to the questionnaire and medical examination, adolescents living in the industrial center of Irkutsk region, was $68 \pm 3,4$ per 100 patients. The most informative factors were: a positive skin prick test, detectable by skin testing, frequent respiratory infections in the history of passive smoking and family history.

Key words: teenagers, chronic allergic diseases of respiratory tracts, informative value

В ежегодных отчетах Минздрава РФ на протяжении многих лет заболевания органов дыхания занимают лидирующую строчку по показателям как общей, так и первичной заболеваемости. В большей степени это относится к детям до 14 лет. В этой возрастной категории показатель общей заболеваемости (распространенности) в 2002 г. составил 96,5 % (у подростков – 53 %, для сравнения у взрослых – 21 %), ненамного опережая распространенность болезней системы кровообращения. В структуре болезней органов дыхания за 2001 г. удельный вес бронхиальной астмы (БА) и астматического статуса (МКБ-10 J-45, J-46) у детей составлял лишь 1,03 % (у подростков – 2,09 %, у взрослых – 2,98 %). Сравнивая темп появления новых случаев БА по показателю первичной заболеваемости, следует отметить, что наиболее высоким он был в группе детей от 0 до 14 лет (1,72 %); у подростков диагноз БА устанавливался впервые в 1,4 (1,21 %), у взрослых в 3 раза реже (0,57 %). Удельный вес круглогодичного аллергического ринита (КАР), поллиноза (МКБ-10 J-30) среди всех заболеваний органов дыхания составил еще меньше: 0,9 % – у детей и подростков; 0,8 % – у взрослых. Распространенность АР в 2001 г. по данным Государственного комитета РФ по статистике не «дотягивала» до половины процента у детей и подростков (0,35 и 0,48 % соответственно), у

взрослых составляла всего 0,16 %. Вероятно, большая часть взрослого населения не считают «насморк» поводом обращаться за медицинской помощью [3, 4].

Загрязнение атмосферного воздуха различными компонентами химического или биологического происхождения представляет опасность, в первую очередь, для здоровья детского и подросткового населения. В этой связи аллергические заболевания часто рассматривают как индикатор состояния окружающей среды [1, 7, 8]. Однако кроме ингаляционной экспозиции на растущий организм влияет большое количество прочих факторов, в том числе, управляемых на индивидуальном уровне (связанных с образом жизни, вредными привычками, качеством воздуха жилых помещений). Интенсивное длительное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды сопровождается перенапряжением и нарушением адаптивных возможностей организма, что может привести к срыву адаптации, развитию предболезненных состояний и хронизации основных патологических процессов [2, 6]. Поэтому, состояние здоровья подростков рассматривается как один из наиболее чувствительных показателей, отражающих изменение качеств окружающей среды [5]. Однако для формирования ряда заболеваний большое значение имеет наследственная предрасположенность [9].

Цель исследования — выявление роли некоторых факторов среды обитания и образа жизни в формировании хронической аллергопатологии дыхательных путей у городских подростков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выявления наиболее информативных факторов, определяющих формирование аллергопатологии верхних дыхательных путей у подростков, проведены исследования в г. Саянске (Иркутской области). Территория для исследования выбиралась с учетом некоторых особенностей: социальная инфраструктура в г. Саянске характеризуется высокой доступностью медицинской помощи, обеспеченностью учреждениями культуры, благоустроенностью 100 % жилого фонда. Градообразующим предприятием является ОАО «Саянскхимпласт», выбросы которого содержат: этилен, дихлорэтан, винилхлорид, хлористый этил, хлористый метил и другие вещества. Однако удаленность и расположение относительно промплощадки селитебной зоны города обеспечивает соответствие качества атмосферного воздуха гигиеническим требованиям. Уровень загрязнения атмосферного воздуха по интегральным показателям оценивается как умеренный. Качество питьевой воды, поступающей к населению, соответствует гигиенически нормативам практически в 100 % проб. В связи с указанным, полагаем, что в формировании здоровья детского и подросткового населения г. Саянска роль химического загрязнения внешней среды является не значимой, что позволяет изучить влияние прочих факторов.

Аллергологическое обследование проводилось в два этапа. Первый этап включал анкетный скрининг с помощью опросника ISAAC, который заполняли родители 183 обучающихся 8–10 классов. В анкетах предусмотрены следующие вопросы: случаи в анамнезе у подростка atopического дерматита, аллергического ринита и бронхиальной астмы, риноконъюнктивита, а также пищевой и лекарственной аллергии, отеков Квинке и крапивницы; наличие аллергопатологии у ближайших родственников; пассивное и активное курение; наличие животных в доме. На втором этапе проводилось клиничко-аллергологическое обследование подростков (прик-тестирование) со стандартным набором аллергенов: клещей домашней пыли, таракана, эпидермальных и пылевых.

В соответствии с требованиями Комитета по биомедицинской этике обследование проведено только с письменного информированного согласия родителей, работа не ущемляет права и не подвергает опасности благополучие субъектов исследования в соответствии с требованиями биомедицинской этики, утвержденными Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000).

Распространенность патологии представлена в виде частоты случаев на 100 осмотренных и среднеквадратичной ошибки показателя ($P \pm p$). Для выявления значимости рассматриваемых факторов в формировании круглогодичного аллергического

ринита и бронхиальной астмы проведен расчет их информативности с помощью метода Байеса, реализованного в автоматизированной программе Scrining (разработана под рук. д.ф.-м.н., акад. РАН С.Н. Васильева; постановка задачи — д.м.н. Е.Н. Носули). Для этого анализировалась частота аллергопатологии среди подростков, подвергающихся различному уровню воздействия конкретного фактора, и рассчитывались диагностические коэффициенты и информативность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным анкетирования распространенность КАР и БА в группе составила $11 \pm 2,3$ % от числа обследованных школьников. Отягощенный анамнез (родители подростков имели в анамнезе аллергопатологию) отмечен у 82 человек ($44,8 \pm 3,7$ %) вне зависимости от установленного в дальнейшем диагноза аллергопатологии дыхательных путей у подростков. Число подростков с активным курением составило 26 человек ($14,2 \pm 2,5$ %), с пассивным — 88 человек ($48,0 \pm 3,7$ %). Содержали в квартире домашних животных, рыб в семьях 106 школьников ($57,9 \pm 3,7$ %).

На втором этапе обследования диагноз аллергического заболевания устанавливался на основании типичных клинических проявлений, с характерными для нозологических форм анамнестических сведений, и результатов кожного тестирования. Результаты аллергологического осмотра свидетельствовали, что частота АР и БА в изучаемой когорте достоверно выше, чем по данным анкетирования ($68,0 \pm 3,4$ случая на 100 осмотренных; $p < 0,05$). Так, диагноз бронхиальной астмы установлен у 10 подростков, что составило $5,5 \pm 2,2$ случая на 100 осмотренных; аллергического ринита — у 58 подростков ($31,7 \pm 3,4$ %). Сочетание аллергического ринита и бронхиальной астмы отмечено у 9 человек ($4,9 \pm 1,6$ %).

Для оценки информативности факторов были сформированы три группы: 1-я — подростки без диагноза аллергопатологии; 2-я и 3-я группы — лица с установленными диагнозами БА и КАР, соответственно. Структура 1-й группы выглядела следующим образом: лиц мужского пола — 37,0 %, женского — 62,9 %, наличие родственников с аллергопатологией у 19,3 % обследованных, с активным курением — 13,7 %, с пассивным воздействием табачного дыма — 46 % подростков. Группы подростков с установленными диагнозами БА и круглогодичного аллергического ринита характеризуем в целом, в связи с малым числом подростков с БА. Во 2-й и 3-й группах лица мужского пола составили 34 %, женского — 66 %, родственники с аллергопатологией отмечены у 39,7 % обследованных, активно курили 38,2 % подростков, а вот пассивное воздействие табачного дыма отметили 45,5 % респондентов. К числу приоритетных аллергенных факторов относят качество жилой среды, в том числе, содержание домашних животных, рыб; количество мягкой мебели, ковров; использование перьевых подушек; применение

синтетических моющих средств и т.д. [5, 10]. Среди подростков с аллергопатологией высокой аллергенной нагрузке подвергались 42,6 %, родители 29 школьников свидетельствовали, что условия проживания можно считать малоаллергенными. В то же время, среди подростков без аллергопатологии гипоаллергенный быт соблюдали 42 человека, что составило 33,9 %.

Для оценки информативности все изученные факторы были поделены на диапазоны, которые учитывали либо просто наличие фактора (например, «курение»: да/нет; «частые респираторные заболевания»: да/нет; «наличие животных дома»: да/нет;), либо предполагали градации фактора (например, наследственность: 1 — наличие аллергопатологии у родителей, 2 — наличие аллергопатологии у родных братьев или сестер, 3 — наличие аллергопатологии у бабушек или дедушек; бытовые условия: 1 — соблюдение гипоаллергенного быта, 2 — частичное соблюдение гипоаллергенного быта, 3 — несоблюдение гипоаллергенного быта; результаты кожного тестирования: 1 — наличие аллергии к бытовым аллергенам, 2 — наличие ал-

лергии к эпидермальным аллергенам, 3 — наличие пылевой аллергии).

Распределение обследованных школьников по диапазонам изученных факторов (частоты) представлено в таблице 1. Наибольшая информативность среди изученных факторов характерна у положительной реакции на стандартные аллергены, выявляемая при кожном тестировании (157,0 — при бронхиальной астме и 212,0 — персистирующем круглогодичном аллергическом рините). При анализе роли различных по происхождению аллергенов установлено, что наибольшей информативностью при КАР обладали эпидермальные аллергены (830,9), при равных вкладах бытовых и пылевых аллергенов, которые составили 557,8 и 500,1 соответственно. При БА наибольшая информативность выявлена у бытовых аллергенов (939,5) при равных вкладах эпидермальных и пылевых (337,5 и 359,3 соответственно).

Второй ранг получил фактор «частые респираторные заболевания», который составил 204,8 в группе подростков с БА и 59,8 — с КАР. Наши результаты полностью совпадают с данными лите-

Таблица 1
Частота и информативность факторов у подростков с наличием хронической аллергопатологии дыхательных путей

Факторы	Градации фактора	Количество лиц, подверженных действию фактора		Информативность	
		с БА	с КАР	БА	КАР
Наследственность	мама, папа	4	13	7,1	30,3
	брат, сестра	2	3		
	бабушка, дедушка	0	5		
Пол	м	2	21	31,9	0,07
	ж	8	37		
Частые респираторные заболевания	да	7	28	204,8	59,8
	нет	3	30		
Пассивное курение	да	5	26	32,5	17,4
	нет	5	32		
Активное курение	да	0	9	0,13	7,9
	нет	10	49		
Наличие животных дома	да	4	34	0,74	40,7
	нет	6	24		
Гипоаллергенный быт	1	4	18	3,6	1,5
	2	2	15		
	3	4	25		
Наличие аллергии (прик-тесты), в том числе полисенсibilизация	да	18	92	157,0	212,6
Наличие аллергии к бытовым аллергенам	да	6	47	557,8	939,5
	нет	4	11		
Наличие аллергии к эпидермальным аллергенам	да	7	22	830,9	337,5
	нет	3	36		
Наличие аллергии к пылевым аллергенам	да	5	23	500,1	359,3
	нет	5	35		

ратуры [8, 9, 10]. Менее информативным оказался фактор наследственной предрасположенности: наличие родственников с аллергическими заболеваниями (7,13 – 30,3). Низкая информативность данного фактора в группе подростков с БА скорее всего связана с ее малочисленностью, поэтому данный результат можно считать предварительным. Показатель информативности пассивного курения составил 32,5 – 17,4. Минимальную информативность имел фактор «активное курение» (0,13 – 7,9), что возможно, связано с малым «стажем» табакокурения в изучаемой возрастной группе и неискренностью ответа на данный вопрос у части респондентов. Таким образом, обобщенный ранговый ряд факторов, значимых для формирования аллергопатологии респираторной системы, можно представить следующим образом: аллергическая реакция на эпидермальные аллергены > аллергическая реакция на бытовые/пыльцевые аллергены > частые респираторные заболевания > наследственная предрасположенность > пассивное курение.

Анализ информативности факторов позволил ранжировать их для дальнейшего обоснования этапности внедрения профилактических мероприятий на субпопуляционном и персонифицированном уровнях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Распространенность бронхиальной астмы и персистирующего круглогодичного аллергического ринита по данным медицинского осмотра подростков, проживающих в городе Саянске, составляла $68 \pm 3,4$ случая на 100 обследованных. Ранжирование информативности факторов следующим образом: аллергическая реакция на эпидермальные аллергены, бытовые и пыльцевые; частые респираторные заболевания свидетельствует о их высокой значимости в формировании хронической аллергопатологии дыхательных путей у подростков.

Сведения об авторах

Абраматец Елена Александровна – ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», кандидат медицинских наук, доцент кафедры профпатологии и гигиены, Ангарский филиал ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (Ангарск), врач высшей категории, аллерголог-иммунолог (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100; e-mail: elena-abramatec@rambler.ru)
Ефимова Наталья Васильевна – заведующая лабораторией медицинской экологии, доктор медицинских наук, профессор, Ангарский филиал ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (665827, г. Ангарск, 12-а м-н, д. 3; e-mail: medicolab@inbox.ru)

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян Н.А., Сусликов В.А., Ермакова Н.В., Капланова А.Ш. Эколого-биогеохимические факторы и здоровье человека // Экология человека. – 2000. – № 1. – С. 3 – 5.
2. Астафьева Н.Г., Удовиченко Е.Н. Бронхиальная астма и аллергический ринит: фармакоэпидемиологический анализ сочетанной патологии // Рос. аллергол. журн. – 2005. – № 3. – С. 45 – 49.
3. Буйнова С.Н., Федоров В.Г. Тяжелая бронхиальная астма у детей Иркутской области: эпидемиологическая и клиничко-аллергологическая характеристика // Сибир. мед. журн. – 2011. – № 6, Ч. 2. – С. 197 – 199.
4. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (программа GINA, пересмотр 2006 года).
5. Лютина Е.И., Молеров Ф.К. К вопросу об эпидемиологии аллергических заболеваний // Аллергология. – 2004. – № 4. – С. 55 – 57.
6. Мамчик Н.П., Платунин А.В. Загрязнение атмосферного воздуха и здоровье населения крупного промышленного центра // Здравоохранение РФ. – 2008. – № 1. – С. 39 – 40.
7. Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Артомасова А.В. Аллергические заболевания. – М., 1999. – 441 с.; Гл. аллергический ринит. – С. 224 – 232; Гл. бронхиальная астма. – С. 242 – 325.
8. Brunekreef B., Holgate S.T. Air pollution and health // Lancet. – 2002. – Vol. 360. – P. 1233 – 1242.
9. Breuer M., Hook G., Van Viet P. et al. Estimating long-term average particulate air pollution concentrations: application of traffic indicators and geographic information systems // Epidemiology. – 2003. – Vol. 14, N 2. – P. 228 – 239.
10. Janssen N.A., Brunekreef B., van Viet P. et al. The relation-ship between air pollution from heavy traffic and allergic sensitization, bronchial hyper responsiveness and respiratory symptoms in Dutch schoolchildren // Environ. Health Perspect. – 2003. – Vol. 111, N 12. – P. 1512 – 1518.

Д.Ш. Альтман^{1, 2}, Е.В. Давыдова^{1, 2}, Н.Г. Кочеткова¹, А.В. Зурочка³

ТЕМПЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО СТАРЕНИЯ И МАРКЕРЫ АЛЛОСТАЗА У ВЕТЕРАНОВ АФГАНСКОГО КОНФЛИКТА С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

¹ Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь ветеранов войн (Челябинск)

² Челябинская государственная медицинская академия (Челябинск)

³ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН (Екатеринбург)

Исследованы темпы биологического старения организма, уровни стрессовых гормонов и регуляторных цитокинов у ветеранов войны в Афганистане и гражданских лиц с ранними формами хронической ишемии мозга. Установлено ускорение темпов старения по показателям биологического возраста, более ранний клинический дебют ранних форм хронических цереброваскулярных заболеваний, связанный с процессами посттравматической дисрегуляции церебрального и системного сосудистого тонуса, накопление «аллостатического груза» в виде гиперкортизолемии, роста регуляторных и вазоформных цитокинов у ветеранов войны в Афганистане.

Ключевые слова: ветераны Афганистана, биологический возраст, гормоны, цитокины, аллостаз

GROWTH OF BIOLOGICAL MARKERS OF AGING AND ALLOSTASIS IN VETERANS OF THE AFGHAN WAR CONFLICT WITH EARLY FORMS OF CHRONIC BRAIN ISCHEMIA

D.Sh. Altman^{1, 2}, E.V. Davydova^{1, 2}, N.G. Kochetkova¹, A.V. Zurochka³

¹ Chelyabinsk Regional Clinical Therapeutic Hospital For War Veterans, Chelyabinsk

² Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk

³ Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg

We investigated the rate of biological aging, the levels of stress hormones and regulatory cytokines in Afghan war veterans and civilians with early forms of chronic brain ischemia. The study established acceleration of aging according to biological age indicators, earlier clinical onset of early forms of chronic cerebrovascular diseases associated with the processes of posttraumatic dysregulation of cerebral and systemic vascular tone, the accumulation of "allostatic load" in the form of hypercortisolemia, growth regulatory and angiogenic cytokines in veterans of the Afghan conflict.

Key words: Afghanistan veterans, biological age, hormones, cytokines, allostasis

Пребывание на войне, пролонгированное воздействие психотравмирующих стрессоров, выходящих за рамки обычного человеческого опыта, является причинным фактором дезадаптационных расстройств у участников боевых действий после возвращения их к мирной жизни, которые принято обозначать терминологически как «военный невроз», «посттравматические стрессовые расстройства» (ПТСР, или английская аббревиатура PTSD). Негативные постстрессовые симптомы сохраняются годами и даже десятилетиями, являются результатом кумуляции травматических стрессовых воздействий [6], которые приводят к серьезным изменениям состояния гомеостаза, формированию иного состояния динамического равновесия внутренней среды организма, получившего название «аллостаза» [4, 5]. Также установлено, что посттравматические стрессовые расстройства в отдаленном периоде у участников боевых действий являются фактором патологического старения [1, 2]. В связи с этим, представляет особый интерес анализ темпов старения у ветеранов современных боевых конфликтов с ранними формами хронических цереброваскулярных заболеваний (ХЦВЗ). В основе последних, наряду с атеросклеротическими изменениями, важную роль играют процессы посттравматической дисрегуляции церебрального

и системного сосудистого тонуса, приводящие, в конечном итоге, к снижению адаптационно-компенсаторного потенциала организма в целом.

С позиций интенсивно развивающейся в настоящее время области иммунологии — нейроиммунологии, к основным регуляторным системам относятся не только общепризнанные нервная и эндокринная система, но и иммунная, важнейшей функцией которой является обеспечение иммунного гомеостаза. Предполагается, что после перенесенного стресса в организме образуются новые функциональные системы, обеспечивающие адаптационные реакции. Однако иммунологический компонент дисрегуляторной патологии при формировании аллостаза в отдаленные периоды после перенесенного стресса войны в мировой литературе практически не исследован. Остаются открытыми вопросы изучения баланса регуляторных цитокинов при ускоренных темпах старения ветеранов современных локальных войн с ранними формами хронической ишемии мозга.

В связи с вышеизложенным, **целью** настоящего исследования явилось изучение темпов биологического старения организма, уровней гипоталамо-гипофизарных гормонов и ряда регуляторных цитокинов у ветеранов современных войн с ранними формами хронической ишемии головного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами изучены темпы биологического старения организма, уровни гормонов оси гипоталамо-надпочечники и ряд регуляторных цитокинов у ветеранов афганского конфликта, спустя 15 и более лет после ее окончания, имеющих проявления ранних форм хронической ишемии мозга. Обследовано 122 ветерана афганского конфликта, из них, с начальными проявлениями недостаточности кровоснабжения мозга (НПНКМ) 1-я группа — 78 ветеранов (средний возраст $38,99 \pm 0,48$ года), 56 человек (2-я группа) с диагнозом дисциркуляторная энцефалопатия — I стадии (ДЭП-I) средний возраст $39,3 \pm 0,64$, в группу сравнения вошли гражданские лица, не участвовавшие в военных действиях — 40 чел. (3-я группа) с НПНКМ (средний возраст $37,8 \pm 0,67$ года) и 35 чел. (4-я группа) штатские имеющие ДЭП-I (средний возраст $38,8 \pm 0,29$ года), группу контроля (5-я группу) составили 44 здоровых мужчин без субъективных и объективных проявлений цереброваскулярной патологии (средний возраст $38,96 \pm 1,14$ года). Диагнозы НПНКМ и ДЭП-I были установлены в соответствии с клинической классификацией сосудистых поражений головного мозга [3], на основании клинических симптомов заболевания и данных инструментального обследования с помощью ультразвуковой доплерографии магистральных сосудов, транскраниальной доплерографии и электроэнцефалографии. Оценку биологического и кардиопульмонального возраста и темпов старения проводили согласно методике «BIOAGE» разработанной в Киевском НИИ геронтологии АМН СССР и основанной на анализе жалоб пациента, функционально-инструментальной оценке сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем. Результат анализа выражали в условных единицах возраста и сопоставляли с популяционной нормой. Для определения темпа старения индивидуума использовали шкалу оценок функционального класса (ФК) биологического возраста (БВ) и кардиопульмонального (КПВ), при этом 1ФК соответствует отклонениям БВ и КПВ от популяционного стандарта от $-15,0$ до $-9,0$ лет; 2ФК от $-8,9$ до $3,0$ лет; 3ФК от $-2,9$ до $+2,9$ года; 4,5 ФК от $+9,0$ до $+15,0$ лет. Доплерографическое исследование проведено на аппарате Rimed (Израиль) с оценкой перфузии сосудов мозга, линейной скорости кровотока, учетом доплерографических микроэмболических сигналов и оценкой функциональных проб. Иммунологическое исследование включало определение уровня TNF- α (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), IL1 α , (ООО «Цитокин», г. Санкт-Петербург), IL-2 («Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург), RIL-2 (растворимый рецептор к IL-2), VEGF (васкулоэндотелиальный фактор роста) («Cytimmune», Финляндия) с регистрацией результатов реакции на планшетном спектрофотометре Multiscan plus (Labsystems) при длине волны 450 нм. Венозную кровь забирали утром, натощак. Статистическая обработка результатов проведена с помощью стандартных методов вариационной статистики (непараметрический модуль).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологический возраст (БВ) является мерой физиологического или патологического старения организма. В случае преждевременного старения биологический возраст человека опережает его календарный (паспортный) возраст. Сопоставление БВ и календарного возраста (КВ) дает объективное представление о темпах старения организма.

Результаты сопоставления КВ, БВ и КПВ у комбатантов с НПНКМ и ДЭП-I показали, что календарный возраст оказался приблизительно на 3 года меньше, чем у штатских пациентов с теми же нозологическими формами. Различия достоверны. Эта закономерность позволяет сделать заключение о более раннем начале проявлений хронической цереброваскулярной недостаточности у лиц, участвовавших в военных действиях и предположить, что в соответствии с концепцией накопления «аллостатического груза» у комбатантов происходит более ранний дебют клинической манифестации заболеваний.

Биологический возраст у комбатантов с НПНКМ и ДЭП-I в среднем на 6 лет и 3 года, соответственно, оказался выше, чем у гражданских лиц с теми же диагнозами. БВ у комбатантов с ранними формами ХЦВЗ был также достоверно выше, чем в контрольной группе.

Средние показатели КПВ отличались только у больных с ДЭП-I, которые оказались достоверно выше, как у участников военных действий, так и у штатских пациентов, в сопоставлении с КПВ у здоровых лиц контрольной группы.

При определении темпов индивидуального старения нами установлено, что первый и второй функциональные классы биологического возраста, которые отражают оптимальный, низкий темп старения, реже всего обнаруживаются у участников боевых действий с НПНКМ и с ДЭП-I. Эти классы регистрируются приблизительно у $1/4$ (18,7 %) комбатантов, что существенно реже, чем у лиц, не участвовавших в войне с теми же диагнозами (у 48 %) и в контрольной группе (у 57 %).

Третий функциональный класс БВ, означающий точное соответствие темпа старения среднему популяционному уровню, также реже наблюдался у комбатантов с НПНКМ (приблизительно у $1/3$ ее состава), что вдвое реже, чем в группе «мирных» с НПНКМ. Достоверных отличий по частоте выявления третьего функционального класса в других сравниваемых группах не обнаружено.

Напротив, четвертый и пятый функциональные классы БВ, характеризующие опережение популяционного уровня темпа старения, встречался более чем у 40 % состава групп участников войны в Афганистане с НПНКМ и ДЭП-I, т.е. в 4–5 раз чаще, чем у гражданских лиц с теми же диагнозами и вдвое чаще, группы контроля.

Приведенные данные характеризуют, вероятно, большую «изношенность» функциональных систем у участников военной кампании в Афганистане и, соответственно, более ранние в сравнении с другими обследованными, проявления «болезней регуляции» и возрастных изменений.

Определение кардиопульмонального возраста (КПВ) показало отсутствие достоверных отличий по темпу старения на уровне кардиореспираторной системы у пациентов с НПНКМ и ДЭП-I в сопоставлении с контрольной группой. Так же как нет существенных различий в этих группах в зависимости от участия в военных действиях. Самые оптимальные функциональные классы КПВ (первый и второй) встречались у 20 – 30 % пациентов во всех сравниваемых группах и в контроле. Третий функциональный класс КПВ обнаружен в разных сравниваемых группах с частотой от 15 до 25 %. Пессимальные функциональные классы КПВ (четвертый и пятый) регистрировались у мужчин во всех пяти сравниваемых группах более чем у половины состава.

Объективным показателем течения генерализованного адаптационного синдрома в условиях нормы и при патологии, маркером нарастания «аллостатического груза» и дисрегуляторных расстройств, состояния оси гипотиз-надпочечники является уровень стрессовых гормонов, приведенный в таблице 1.

Из таблицы 1 следует, что достоверных различий по уровню АКТГ в сыворотке крови обследуемых пациентов с начальными формами ХЦВЗ в сопоставлении с контрольной группой не выявлено.

Значимо повышенным оказался уровень кортизола у комбатантов с НПНКМ в сопоставлении с гражданскими лицами с тем же диагнозом, а также в сравнении с группой участников боевых действий с клинической картиной ДЭП-I.

Высокий уровень кортизола установлен у гражданских лиц с ДЭП-I, который достоверно превышал показатели пациентов с НПНКМ не только аналогичного контингента, но и в группе ветеранов.

Анализ уровней регуляторных цитокинов показал, что наибольшей вариабельностью в разных группах пациентов в количественном содержании отличается TNF α . Достоверно минимальный уровень этого цитокина был выявлен в контрольной группе (0,3 пг/мл). Максимальный базовый уровень TNF α отмечен у участников боевых действий с диагнозом НПНКМ (3,49 пг/мл), у пациентов всех остальных групп этот показатель был достоверно, вдвое – втрое меньше. TNF α является полифункциональным цитокином, обладающим провоспалительным, апоптогенным действием, участвует в развитии стресс-индуцированных реакций. Изменение его количества на системном уровне

может вносить определенный вклад в развитие эндотелиальной дисфункции и прогрессии атеросклеротических изменений сосудов при ХЦВЗ.

При анализе количества IL-1 α в сыворотке крови в разных группах пациентов выявляется максимум базового уровня этого цитокина у больных с ДЭП-I, как в группе пациентов гражданских профессий, так и у участников боевых действий. Рост уровня этого цитокина в крови отражает активацию антиген-представляющих клеток и является маркером провоспалительных иммуноопосредованных событий.

Количество вазоформного цитокина VEGF оказалось максимальным также у пациентов-участников боевых действий с диагнозами НПНКМ и ДЭП-I, а минимальным у пациентов гражданских профессий с ДЭП-I, различия в уровне этого цитокина между 1-й и 4-й, 2-й и 4-й группами достоверны. Селективный рост базового уровня VEGF у пациентов – участников боевых действий с хронической цереброваскулярной патологией представляет особый интерес как возможный маркер прогрессии эндотелиальной дисфункции в этой группе в сопоставлении с больными, ранее не принимавшими участия в боевых действиях.

Известно, что растворимые рецепторы способствуют более длительной циркуляции интерлейкинов в кровотоке, что может определять превалирование процессов позитивной активации лимфоцитов, зависящих от IL-2. По данным литературы, связывание соответствующим рецептором интерлейкина-2 не только продляет период его полужизни в кровотоке, но в результате фиксации комплекса рецептор-цитокин на различных клетках-мишенях активирует их. Уровень IL-2 у обследуемых пациентов не отличался в разных группах, вместе с тем, уровень растворимого рецептора к нему (IL-2R) был достоверно повышен у участников военных действий с НПНКМ и ДЭП-I в сравнении с другими группами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом можно заключить, что у участников войны в Афганистане с клинической картиной ранних стадий ХЦВЗ на уровне целостного организма формируется ускоренный темп старения (по показателям биологического возраста). Более ранний по возрасту клинический дебют НПНКМ, опережающий темп старения участников боевых действий с ранними формами ХЦВЗ позволяют

Таблица 1

Уровень сывороточного АКТГ и кортизола

Показатель	Участники боевых действий		Гражданские лица		5-я группа Контрольная	p
	1-я группа НПНКМ	2-я группа ДЭП-I	3-я группа НПНКМ	4-я группа ДЭП-I		
АКТГ, пкг/мл	3,1 $\pm$ 0,29	3,38 $\pm$ 0,29	3,20 $\pm$ 0,4	3,25 $\pm$ 0,3	2,29 $\pm$ 0,96	
Кортизол, пкг/мл	0,32 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,06	0,017 ₁₋₂ 0,029 ₁₋₃ 0,02 ₂₋₄ 0,02 ₃₋₄

связать эти временные характеристики у комбатантов с перенесенным в прошлом военным стрессом. Отсутствие изменений КПВ у участников военных действий при общем опережающем темпе старения организма дает основание предполагать, что выявленное изменение БВ определяется иным типом регуляции и формированием состояния аллостаза. Установленное нами изменение нейро-эндокрино-иммунного регуляторного комплекса, у ветеранов с ранними формами ХЦВЗ, выражающееся в росте уровня стрессовых гормонов (кортизола), регуляторных и вазоформных цитокинов (TNF α , VEGF, sIL-2R) позволяет предполагать триггерное значение «аллостатического груза» в более ранней по возрасту клинической манифестации ХЦВЗ у участников боевых действий. Таким образом, ускорение темпов биологического старения организма, гиперкортизолемиа, рост уровня регуляторных цитокинов является свидетельством накопления «аллостатического груза» у ветеранов приводит к более ранней манифестации клинических форм ХЦВЗ, увеличивает вероятность срыва регуляторных механизмов на уровне целостного организма.

Сведения об авторах

Альтман Давид Шурович – начальник ГБУЗ «Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь ветеранов войн», Заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии ГБОУ ВПО ЧелГМА Минздравсоцразвития

Давыдова Евгения Валерьевна – ассистент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧелГМА Минздравсоцразвития, кандидат медицинских наук (454128, г. Челябинск, пр-кт Победы, д. 315, кв. 76; сот. тел.: 8-908-0609-206; e-mail: dav-zhenya@yandex.ru)

Кочеткова Наталья Геннадиевна – заведующая лабораторией преждевременного старения, врач терапевт-иммунолог ЧОКТГ ВВ, кандидат медицинских наук

Зурочка Александр Владимирович – ведущий научный сотрудник ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, доктор медицинских наук, профессор

ЛИТЕРАТУРА

1. Мякотных И.С., Оранский И.Е., Мохова Е.Т. Проблемы старения. — Екатеринбург, 1999. — 324 с.
2. Пшенникова М.Г. Феномен стресса, эмоциональный стресс и его роль в патологии // Патол. физиология и эксперимент. мед. — 2001. — № 2. — С. 26 — 40.
3. Шмидт Е.В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 1985. — № 9. — С. 1281 — 1288.
4. Felten D., Maida M.E. Psychoneuroimmunology // in book: Encyclopedia of the human brain // Ed.-in- chief V.S. Ramachandran. — 2002. — Vol. 4. — P. 103 — 127.
5. McEwen B., Lupien S. Stress: hormonal and neural aspects // in book: Encyclopedia of the human brain // Ed.-in- chief V.S. Ramachandran. — 2002. — Vol. 4. — P. 463 — 474.
6. Stampfer H.G. «Negative symptoms»: a cumulative trauma stress disorder // Aust. N. Zeal. J. Psychiatry. — 1990. — Vol. 24, № 4. — P. 516 — 528.

Д.Ш. Альтман^{1, 2}, Е.В. Давыдова^{1, 2}, Н.Г. Кочеткова¹, В.А. Светлакова²

ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ, ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОСТОЯНИЕ НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ВЕТЕРАНОВ АФГАНИСТАНА С РАННИМИ ФОРМАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

¹ Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь ветеранов войн (Челябинск)

² Челябинская государственная медицинская академия (Челябинск)

Проведено определение липидного профиля, показателей перекисного окисления липидов и нитроксидагической системы у ветеранов Афганистана с ранними формами хронической ишемии мозга. Получены данные, подтверждающие наличие оксидативного стресса на уровне клеточных мембран, показана высокая активность антиоксидантной и нитроксидагической систем, более выраженная у ветеранов с ДЭП-I стадией, что может отражать нарастание гипоксических процессов в нервной ткани в условиях прогрессирующей хронической цереброваскулярной недостаточности и постстрессовых расстройств.

Ключевые слова: ветераны Афганистана, хроническая ишемия мозга, липиды, оксидативный стресс

LIPID PROFILE OF BLOOD SERUM, LIPID PEROXIDATION AND NITROXIDERGIC SYSTEM OF VETERANS OF THE AFGHAN CONFLICT WITH EARLY FORMS OF CHRONIC BRAIN ISCHEMIA

D.Sh. Altman^{1, 2}, E.V. Davydova^{1, 2}, N.G. Kochetkova¹, V.A. Svetlakova²

¹ Regional Clinical Therapeutic Hospital for War Veterans, Chelyabinsk

² Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk

A determination of lipid profile, indices of lipid peroxidation and ergic system in veterans and civilians with early forms of chronic brain ischemia. The data confirming the presence of oxidative stress at cellular membranes showed high antioxidant activity and ergic systems are more pronounced in veterans with DEP-I, which may reflect the growth of nerve tissue hypoxia in the progression of chronic cerebrovascular insufficiency in the background of post-stress disorder.

Key words: Afghanistan veterans, chronic cerebral ischemia, lipids, oxidative stress

Актуальность проблемы ранней клинической манифестации и прогрессивного течения хронической цереброваскулярной патологии у ветеранов современных боевых действий определяется важной ролью постстрессовых расстройств в особенностях развития и течения соматических, в т.ч. хронических сосудистых заболеваний мозга [5, 7]. Отмечена четкая тенденция параллельного роста церебральной сосудистой патологии в современных условиях и частоты возникновения расстройств адаптации после пролонгированных травматических событий (к которым относится война). Негативные постстрессовые симптомы, типичные для лиц, перенесших «стресс войны», могут сопровождаться нарушением оптимальной регуляции обмена организма, кровоснабжения жизненно важных органов, более ранним развитием и клинической манифестацией хронической цереброваскулярной патологии. Острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), являются одной из ведущих причин смертности населения в современных условиях и занимают второе ранговое место после сердечно-сосудистых катастроф, чаще развиваются у мужчин трудоспособного возраста [3, 9]. Известно, что ОНМК нередко формируются в условиях уже существующей хронической церебральной болезни. Поэтому идентификация и

ранняя диагностика инициальных стадий хронической ишемии мозга являются актуальной задачей современной ангионеврологии.

Согласно клинической классификации сосудистых поражений головного мозга [10], хронические формы цереброваскулярных заболеваний (ХЦВЗ) включают (1) начальные проявления нарушений кровоснабжения мозга (НПНКМ), (2) дисциркуляторную энцефалопатию (ДЭП) 1-й, 2-й и 3-й стадии. К ранним формам ХЦВЗ относятся НПНКМ и ДЭП-1 стадии.

Целью настоящего исследования явилось изучение показателей сыворотки крови, характеризующих состояние липидного обмена, процессов липопероксидации и показателей нитроксидагической системы у ветеранов афганского конфликта и гражданских лиц с диагнозами НПНКМ и ДЭП-I.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе Челябинского областного клинического терапевтического госпиталя для ветеранов войн. Для решения поставленных задач было обследовано 122 ветерана афганского конфликта, из них, с начальными проявлениями недостаточности кровоснабжения мозга (НПНКМ) 1-я группа — 78 ветеранов (средний возраст — $38,99 \pm 0,48$ года), 56 чело-

век (2-я группа) с диагнозом дисциркуляторная энцефалопатия — 1-й стадии (ДЭП-I) средний возраст — $39,3 \pm 0,67$ года, в группы сравнения вошли гражданские лица, не участвовавшие в военных действиях — 40 чел. (3-я группа) с НПНКМ (средний возраст — $37,8 \pm 0,67$ года) и 35 чел. (4-я группа) имеющие ДЭП-I (средний возраст — $38,8 \pm 0,29$ года), группу контроля (5-ю группу) составили 44 здоровых мужчин без субъективных и объективных проявлений цереброваскулярной патологии (средний возраст $38,96 \pm 1,14$ года). Диагнозы НПНКМ и ДЭП-I были установлены в соответствии с клинической классификацией сосудистых поражений головного мозга [10], на основании клинических симптомов заболевания и данных инструментального обследования методами ультразвуковой доплерографии магистральных сосудов, транскраниальной доплерографии и электроэнцефалографии.

Венозную кровь забирали после 12–14 часового голодания. В сыворотке крови определяли: содержание общего холестерина (оХС), триглицеридов (ТГ), Хс липопротеидов высокой плотности (ХсЛПВП) ферментативными методами с набором «Olvex» (Санкт-Петербург) на биохимическом анализаторе «Rocki». Для оценки процессов перекисидации липидов определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) экстракционно-спектрофотометрическим методом [2, 8]. Экстракцию перекисленых 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. Выделение мононуклеаров периферической крови проводили стандартным способом. Культивирование моноцитов проводили в течение 48 часов в газопотоочном термостате. О содержании оксида азота в сыворотке и супернатанте судили по уровню конечных стабильных метаболитов оксида азота (нитратов и нитритов) [4]. Антиоксидантную систему оценивали на основе определения активности каталазы, общей антиоксидантной активности крови и содержания церулоплазмينا. Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программ «Statistica for Windows 6.0» и пакета анализа для программы MS Excel 2007. При сравнении показателей сыворотки крови больных использовали непараметрические критерии Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение липидного профиля сыворотки крови показало, что у ветеранов боевых действий с НПНКМ и ДЭП-I содержание атерогенных фракций липопротеидов (ХсЛПОНП) и триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови достоверно выше, чем у лиц 5-й группы (контрольной). При этом в

группе ветеранов различия показателей больных с ДЭП-I и контрольной группы более значимы, а уровень атерогенных фракций крови выше, чем у ветеранов с НПНКМ. Следует также отметить высокий уровень ХсЛПОНП ($0,91 \pm 0,11$ ммоль/л) у лиц с ДЭП-I по сравнению с пациентами с НПНКМ ($0,65 \pm 0,05$ ммоль/л) и контролем ($0,67 \pm 0,12$ ммоль/л). Известно, что рецептор-зависимый путь регуляции содержания холестерина (Хс) в тканях печени реализуется при низком уровне Хс в гепатоцитах и малом количестве ЛПОНП в крови и лимфе. При увеличении последних усиливается синтез апопротеина В, а следовательно, нарушается энергетический гомеостаз, гепатоциты в атерогенных условиях переходят на новый механизм вывода Хс из клеток путем синтеза и секреции ЛПОНП [6]. Накопление в кровотоке ТГ-содержащих липопротеидов свидетельствует о нарушении транспорта ТГ, которые являются носителями насыщенных жирных кислот — основного энергетического субстрата большинства клеток организма. Уровень поглощения клетками свободных жирных кислот (СЖК) регулирует гидролиз ТГ в кровотоке. Можно предполагать, что у больных 2-й группы (ветеранов с ДЭП-I) нарушено поглощение СЖК клетками в большей степени, чем у ветеранов 1 группы с НПНКМ. Действительно, у ветеранов с ДЭП-I содержание ТГ в сыворотке крови достоверно выше, чем у больных 1-й группы и лиц контрольной группы ($1,7 \pm 0,16$ против $1,54 \pm 0,11$ и $1,2 \pm 0,1$ ммоль/л, соответственно).

Вместе с тем, одной из возможных причин таких изменений может быть накопление в клетках окисленных производных Хс. Последние ингибируют активность Na^+K^+ -АТФ-азы клеточных мембран, затрудняют трансмембранный перенос глюкозы и увеличивают проницаемость мембран для ионов Ca^{2+} . Возможно, именно вовлечением Хс в окислительные процессы объясняется относительно низкий уровень Хс в сыворотке крови больных.

Сравнительный анализ результатов, полученных при обследовании гражданских лиц с НПНКМ и ДЭП-I (3-й и 4-й группы), показал, что содержание всех атерогенных липидных фракций у больных выше, чем в контрольной группе. Однако общий Хс и ХсЛПНП оказались выше у больных 4-й группы, чем в 1-й и 2-й, а уровень ТГ, Хс ЛПОНП, Ка был выше у пациентов 3-й группы. У последних уровень ХсЛПВП оказался достоверно ниже, чем в 4-й группе ($1,08 \pm 0,04$ и $1,27 \pm 0,06$ ммоль/л соответственно).

Таким образом, если у ветеранов с ДЭП-I (2-й группа) отмечался более высокий уровень ТГ и Хс ЛПОНП, то у больных ДЭП-I, не участвовавших в военных действиях (4-я группа), выявлен более высокий уровень общий Хс и фракция ХсЛПНП, хотя содержание ТГ и Хс ЛПОНП также выше, чем в контрольной группе.

Известно, что в ЛПНП апо-В100 выполняет функцию лиганда, опосредуя рецептор-зависимый захват этих липопротеидов клетками. Нарушение катаболизма ЛПНП приводит к их избыточному

накоплению в плазме, что фенотипически регистрируется как дислипидопротеинемия, а в случае активации свободно-радикального окисления способствует их модификации. Высокий уровень Хс ЛПНП у больных 4-й группы является свидетельством нарушения катаболизма ЛПНП.

Нарушения мозгового кровообращения сопровождаются гипоксией. При гипоксии снижается диффузия кислорода в кровь, его парциальное давление в крови и утилизация в тканях, что приводит к усилению процессов свободно-радикального окисления. Клетки нервной ткани более чувствительны к дефициту кислорода, так как практически не имеют его запасов. Нервные клетки отличаются повышенным содержанием липидов, при этом каждая 3-я жирная кислота, входящая в состав фосфолипидов нервной ткани, относится к группе полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), активно участвующих в процессах ПОЛ.

У больных, участвовавших в боевых действиях, содержание первичных продуктов ПОЛ (ДК E_{232}) 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 гидроксиглизирующей системы и подавляет катаболизм Хс. Вероятно, поэтому у данной группы больных уровень Хс крови достоверно выше контроля. Липоперекиси, как известно, играют важную роль в механизмах первичных повреждений сосудистой стенки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сосудистые изменения при НПНКМ сопровождаются усилением свободнорадикального окисления (СРО) и накоплением продуктов ПОЛ в сосудистой стенке.

По содержанию вторичных продуктов ПОЛ (КД, СТ) и ТБК различия во всех группах ветеранов и гражданских лиц с контролем не достоверны. Не было обнаружено также достоверных различий по активности клеточных ферментов (каталазы и пероксидазы). Вместе с тем, у ветеранов с НПНКМ (1-я группа) отмечалась тенденция к более высокому уровню каталазной активности, а у ветеранов с ДЭП-I — к повышению пероксидазной активности. Содержание ЦП у ветеранов с ДЭП-I (2-я группа) и гражданских лиц с такой же патологией (4-я группа) было достоверно выше, чем у больных 1-й и 3-й 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), но незначительно превышало уровень контроля ($254,8 \pm 11,51$). Повышение уровня ЦП и пероксидазной активности сыворотки ветеранов и гражданских лиц при ДЭП-I можно расценивать, как усиление антиоксидантной защиты клеток мозга в условиях нарастания гипоксии нейронов при прогрессии хронических форм ишемии.

Можно полагать, что низкий уровень вторичных продуктов ПОЛ поддерживается относительно высоким содержанием ЦП и Хс — естественного антиоксиданта. С другой стороны, повышение в крови первичных продуктов ПОЛ при отсутствии роста вторичных продуктов ПОЛ у больных с ДЭП-I (2-я и 4-я 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 аминифосфолипидов и белков.

Определенный вклад в баланс появляющихся в крови свободных радикалов вносят эндотелиальные клетки, постоянно продуцирующие оксид азота. С появлением в крови продуктов ПОЛ происходит активация индуцибельной формы синтазы, выбрасывающей в кровоток избыточное количество NO. Последний, превращаясь в пероксинитрит, способен окислять липиды даже в присутствии высоких концентраций антиоксидантов и тем самым нарушать неустойчивое равновесие между про- и антиоксидантами крови [1].

По нашим данным, у всех обследованных групп (1, 2, 3, 4) больных уровень конечных стабильных метаболитов оксида азота (нитратов и нитритов) в сыворотке крови был 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), чем в контрольной группе ($14,32 \pm 1,37$), практически не отличаясь в пределах групп больных. Количество нитроксид-ионов в супернатанте ветеранов с ДЭП-I было максимальным и достоверно отличалось (суммарное NOx $55,9 \pm 4,96$ Мкмоль/л, нитраты — $34,58 \pm 5,67$ Мкмоль/л, нитриты $13,6 \pm 2,9$ Мкмоль/л) в сравнении с 1-й группой (ветераны с НПНКМ) — (суммарное $43,96 \pm 5,58$ Мкмоль/л, нитраты — $26,01 \pm 4,7$ Мкмоль/л, нитриты — $7,24 \pm 1,05$ Мкмоль/л) и 3-й группой (гражданские с НПНКМ) — суммарное $42,2 \pm 4,5$ Мкмоль/л, нитраты — $13,6 \pm 2,9$ Мкмоль/л, нитриты — $7,25 \pm 1,2$ Мкмоль/л и мало отличалось от показателя 4-й группы (гражданские с ДЭП-I) — суммарное $48,9 \pm 3,56$ Мкмоль/л, нитратов — $32,32 \pm 3,37$ Мкмоль/л, нитритов — $15,7 \pm 3,5$ Мкмоль/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты подтверждают данные литературы о важной роли процессов свободнорадикального окисления и перекисного окисления липидов в механизмах повреждения кровеносных сосудов мозга и свидетельствуют о неоднозначности нарушений изучаемых показателей периферической крови у лиц с ранними стадиями ХЦВЗ.

У ветеранов с НПНКМ и ДЭП-I выявляются отчетливые признаки оксидативного стресса, с усиленным образованием продуктов СРО и ПОЛ, а также ростом уровня индуцибельной продукции

оксида азота. Более высокая активность клеточных ферментов — антиоксидантов, как показателей нарушения клеточных структур, отмеченная нами у ветеранов боевых действий с ДЭП-I отражает нарастание гипоксических процессов нейронов головного мозга в условиях прогрессирующей цереброваскулярной недостаточности и постстрессовых расстройств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волин М.С., Дэвидсон К.А., Калинин П.М. Механизм передачи сигнала оксида азота в сосудистой ткани // Биохимия. — 1998. — Т. 63, Вып. 7. — С. 958 — 965.
2. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гаптен-изопропанольных экстрактов крови // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 1. — С. 127 — 131.
3. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В., Киликовский В.В. и др. Эпидемиология инсульта в России // Consilium medicum. — 2003. — Т. 5, № 5. — С. 1 — 6.
4. Емченко Н.А., Цыганенко О.И., Ковалевская Т.В. Универсальный метод определения нитратов в биосредах организма // Клин. лаб. диагностика. — 1994. — № 6. — С. 19 — 20.
5. Жулев Н.М., Пустозеров В.Г., Жулев С.Н. Цереброваскулярные заболевания. Профилактика и лечение инсультов. — М.: Vinom — СПб.: Невский диалект, 2002. — 384 с.
6. Медведев Ю.В., Толстой А.Д. Гипоксия и свободные радикалы в развитии патологических состояний организма. — М., 2000. — С. 86 — 95.
7. Одинак М.М., Михайленко А.А., Иванов Ю.С., Семин Г.Ф. Сосудистые заболевания головного мозга. — СПб.: Гиппократ, 2003. — 157 с.
8. Плацер З., Видлакова М., Кужела Л. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов // Чехословацкое мед. обозрение. — 1970. — Т. 16, № 1. — С. 30 — 41.
9. Харченко В.И., Какорина Е.П., Корякин М.В. Смертность от основных болезней системы кровообращения в России (Аналитический обзор официальных данных Госкомстата Минздрава России, ВОЗ и экспертных оценок по проблеме) // Рос. кардиол. журн. — 2005. — № 1. — С. 5 — 15.
10. Шмид Е.В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 1985. — № 9. — С. 1281 — 1288.

Сведения об авторах

Альтман Давид Шурович — начальник ГБУЗ Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь ветеранов войн, заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии ГБОУ ВПО ЧелГМА Минздравсоцразвития

Давыдова Евгения Валерьевна — ассистент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧелГМА Минздравсоцразвития, кандидат медицинских наук (454128, г. Челябинск, просп. Победы, д. 315, кв. 76; сот.: 8-908-0609-206; e-mail: dav-zhenya@yandex.ru)

Кочеткова Наталья Геннадиевна — заведующая лабораторией преждевременного старения, врач терапевт-иммунолог ЧОКТГ ВВ, кандидат медицинских наук

Светлакова Валентина Андреевна — очный аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО ЧелГМА Минздравсоцразвития

А.А. Альшевская, Ф.Ф. Васильев, Ю.А. Лопатникова, С.В. Сенников

МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЕ И РАСТВОРИМЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ- α В НОРМЕ И ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

TNF α — многофункциональный плейотропный цитокин, которому придается особое значение в иммунопатогенезе ревматоидного артрита. При этом от уровня растворимых и экспрессии мембраносвязанных форм его рецепторов может в значительной степени зависеть эффективность действия иммуномодулирующего цитокина и его роль в развитии патологических состояний организма. По результатам исследования показан ряд достоверных отличий не только в проценте клеток, несущих рецепторы к TNF α , но и в абсолютном количестве экспрессируемых рецепторов на клетках различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток в норме и при ревматоидном артрите, установлены корреляционные взаимосвязи этих показателей с сывороточными уровнями самого цитокина и его растворимых рецепторов. Обсуждаются механизмы и роль изменений в экспрессии рецепторов к TNF α на отдельных субпопуляциях лейкоцитов при иммунопатологическом состоянии и в сравнении с условно-здоровыми донорами.

Ключевые слова: TNF α , мембраносвязанные рецепторы, ревматоидный артрит

TUMOR NECROSIS FACTOR- α MEMBRANE-BOUND AND SOLUBLE RECEPTORS IN NORM AND IN RHEUMATOID ARTHRITIS

A.A. Alshevskaya, F.F. Vasiliev, J.A. Lopatnikova, S.V. Sennikov

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

TNF α — a multifunctional pleiotropic cytokine, considered to have a special significance in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. Herewith the effectiveness of immunomodulatory cytokine and its role in the development of pathological states of the organism may depend largely on the content of soluble receptors and expression of membrane-bound receptors. The study shows several significant differences not only in the percentage of cells with TNF α receptors, but also in the absolute number of receptors expressed on cells from different subsets of immunocompetent cells in health and in rheumatoid arthritis, establishes correlation relationships of these parameters with serum contents of the cytokine and its soluble receptors. The mechanisms and the role of changes in the expression of TNF α receptors in different subsets of leukocytes in immunopathological state and in compare with healthy donors are discussed.

Key words: TNF α , membrane-bound receptors, rheumatoid arthritis

Система цитокинов представляет собой универсальную полиморфную регуляторную сеть медиаторов, предназначенных для контроля процессов пролиферации, дифференцировки и функциональной активности клеточных элементов в иммунной и других гомеостатических системах организма. Фактор некроза опухоли- α (TNF α) — провоспалительный цитокин, обладающий широким спектром биологической активности, оказывает влияние на различные типы клеток, и, соответственно, необходим в защите организма против бактериальных, грибковых, паразитарных и вирусных инфекций [4].

В силу его важности в развитии иммунологических реакций биологическая активность этого медиатора имеет достаточно сложную регуляцию, включающую в себя два типа мембраносвязанных рецептора, регулирующих различные функции в клетке, и растворимые рецепторы I и II типа, которые ограничивают системные эффекты этого медиатора при выходе цитокина в системную циркуляцию при патологическом процессе. С активацией различных сигнальных путей связано участие TNF α в процессах клеточной пролиферации и дифференцировки, выживания клеток, генерации тканей и тканевого микроокружения.

Рецепторы I типа экспрессируются почти всеми типами клеток и опосредуют главным образом воспалительные и цитотоксические эффекты TNF α . Рецепторы II типа экспрессируются преимущественно клетками крови, лимфоидными и эпителиальными клетками и участвуют в реализации пролиферативных процессов. Считают, что TNFR1 обеспечивает большинство биологических активностей TNF α , он активирует ядерный фактор транскрипции NF- κ B и c-jun N-терминальную киназу; нокаут по гену TNFR1 приводит к выраженному иммунодефициту [12]. Известно, что рецептор I типа, связывая TNF α и передавая сигнал для активации генов TNF α через MAP-киназы (JNK/p38), принимает участие в аутокринной регуляции продукции TNF α . Прямое проведение сигнала через TNFR2 ограничено, по-видимому, только клетками иммунной системы, но были высказаны предположения, что рецептор II типа может приводить к активации рецептора I типа с последующей передачей сигнала в клетку. Известно также участие TNFR2 в восстановлении тканей и ангиогенезе.

Растворимые рецепторы являются мощными регуляторами активности цитокина. С одной стороны, они (особенно sTNFR1) могут нейтрализовать TNF α в системной циркуляции и ингибировать его биоло-

гическую активность, блокируя антипролиферативные эффекты цитокина и конкурируя с рецепторами TNF α на поверхности клеток, а также усиливать его паракринные эффекты [1]. С другой стороны, комплексы рецепторов с TNF α можно рассматривать в качестве своеобразного пула связанного рецептора, из которого он постепенно высвобождается [11].

Иммунорегуляторный цитокин TNF α имеет большое значение в патогенезе многих заболеваний, в том числе имеющих иммунологическую основу. Одним из таких заболеваний является и ревматоидный артрит [9]. Ревматоидный артрит (РА) — хроническое системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани, сопровождающееся преимущественным поражением периферических суставов с развитием в них эрозивно-деструктивных изменений и анкилозирования [6].

Этиология РА остается не до конца изученной, однако показано, что в его патогенезе принимают активное участие иммунные реакции, преимущественно регулируемые Т-хелперами I типа, и генетически детерминированные аутоиммунные процессы, возникновению которых способствует дефицит Т-супрессорной функции лимфоцитов [2]. Инициальные воспалительные изменения происходят в синовиальной оболочке суставов, куда «рекрутируются» иммунокомпетентные клетки, продуцирующие провоспалительные цитокины, а также антитела к компонентам синови. При этом активация и агрессивная пролиферация синовиальных клеток, а также суставных макрофагов модулируется различными колониестимулирующими факторами (GM-CSF, G-CSF), цитокинами, продуктами метаболизма арахидоновой кислоты и другими медиаторными субстанциями [5, 6]. В частности, антиген-специфическая активация CD4 + Т-лимфоцитов по Th-1 типу, характерная для ревматоидного артрита, приводит к гиперпродукции интерлейкина IL-2, интерферона- γ , IL-17, а также к дисбалансу между провоспалительными (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и др.) и противовоспалительными цитокинами (IL-4, IL-10, растворимый антагонист IL-16 и др.) с преобладанием продукции первых над вторыми [5] на системном уровне, что отражается в изменении показателей периферической крови.

Фактору некроза опухоли- α придается особое значение в иммунопатогенезе ревматоидного артрита. Считается, что в дебюте заболевания превалирует синтез именно этого цитокина, который обладает способностью запускать целый каскад иммунопатологических реакций (в том числе, стимулировать продукцию других провоспалительных субстанций) [10, 13], а неконтролируемый синтез TNF α лежит в основе хронизации патологического процесса и прогрессирующих костных деструктивных изменений. В частности, TNF α принимает участие в развитии клинических признаков воспаления (боль, лихорадка, снижение массы тела и др.), индуцирует экспрессию молекул адгезии, стимулирует неоангиогенез, пролиферацию фибробластов, играющих важную роль в формировании ревматоидного паннуса, и т.д. [2].

Исследование экспрессии рецепторов к иммунорегуляторному цитокину TNF α на иммунокомпетентных клетках и выявление корреляций с уровнями растворимых рецепторов и самого медиатора представляется необходимым для понимания роли TNF α в регуляции иммунных реакций в норме и при патологических состояниях. При этом необходимо оценивать не только процентное содержание клеток, несущих рецепторы, но и количество самих экспрессируемых рецепторов — поскольку в условиях сниженной экспрессии рецепторов активность функционирования цитокина может находиться на минимальном уровне; если же экспрессия рецепторов избыточна, то клеточные популяции будут активно реагировать на взаимодействие лиганд/антитело.

Целью настоящей работы было оценить изменения в экспрессии мембраносвязанных и растворимых рецепторов к TNF α в норме и при ревматоидном артрите.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования — мононуклеарные клетки, выделенные из цельной периферической крови условно-здоровых доноров (24 человека) (ОГУЗ «Новосибирский центр крови») и больных ревматоидным артритом в стадии обострения (7 человек) ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница»). Исследование проводилось с добровольного информированного согласия всех больных и условно-здоровых доноров; одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (протокол № 52 от 23.06.2010 г.).

Выделение и культивирование фракции МНК ПК

МНК выделяли стандартно [3] из венозной крови путем центрифугирования в градиенте плотности фикола-урографина ($\rho = 1,077$ г/л) (фикола (Pharmacia Fine Chemical, Sweden), урографин (Шеринг АО, Германия)). МНК ПК собирали из интерфазы и отмывали в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) дважды. МНК культивировали в объеме 200 мкл в конечной концентрации 5 млн клеток/мл в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone), гентамицина 80 мкг/мл («Синтез»), 2мМ L-глутамина (ФИГУН ГНЦ ВБ «Вектор»), Hepes (Sigma), 5×10^{-5} мМ меркаптоэтанол (Sigma) в 96-луночной планшете (TPP, Швейцария) в течение 24 часов в инкубаторе во влажной атмосфере при температуре 37 °C и концентрации CO₂ 5% в отсутствии и присутствии LPS (штамм 055:B5) (в конечной концентрации 200 нг/мл).

Методы проточной цитофлуориметрии

Оценка фенотипических характеристик проводилась методом проточной цитометрии (цитофлуориметр FACSAria (BD, США)) с использованием антител anti-hCD3-APC, anti-hCD19 PEcy7, anti-hCD14 FITC (eBioscience), а также anti-hTNFR1-PE и anti-hTNFR2-PE (R&D Systems), для перевода значений интенсивности флуоресценции клеток,

экспрессирующих соответствующий маркер, в абсолютные показатели количества рецепторов TNF α I и II типов на клетках использовали калибровочные частицы BD Quantibrite™ PE Beads (с учетом проверки работоспособности прибора CST-Beads (BD)).

Определение уровня TNF α и его растворимых рецепторов в сыворотке крови

Уровень продукции медиаторов определяли в сыворотке крови иммуноферментным твердофазным анализом с использованием соответствующих наборов согласно инструкции производителя: sTNFRI, sTNFRII (RayBiotech, Inc., США) и альфа-TNF (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическая обработка результатов

Результаты обрабатывались с помощью пакета прикладных программ SPSS-11.5. Полученные данные были подвергнуты проверке на нормальность распределения (тест Колмогорова — Смирнова), которая показала, что все распределения являются нормальными. Поэтому результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего ($M \pm m$), а дальнейшее сравнение выборок с определением достоверности различий проводилось с использованием параметрического t-критерия Стьюдента (отличия считались достоверными при $p \leq 0,05$). Корреляции между исследуемыми параметрами устанавливались с использованием коэффициента корреляции Пирсона (при $p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типа к TNF α на субпопуляциях интактных МНК

В ходе работы оценивалось процентное содержание клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типа к TNF α (рис. 1) на различных популяциях им-

мунокомпетентных клеток периферической крови, а так же рассчитывалось абсолютное количество рецепторов на клетках (рис. 2).

Как видно из рис. 1 и 2, субпопуляции CD3, CD19 и CD14 позитивных клеток периферической крови различаются как по проценту клеток, экспрессирующих рецепторы, так и по абсолютному числу рецепторов к TNF α на клетках. На всех популяциях и во всех группах обследованных процент TNFR2 позитивных клеток достоверно выше процента клеток, экспрессирующих TNFR1.

При сравнении группы больных и условно-здоровых доноров достоверные отличия выявлены только по процентному содержанию клеток, экспрессирующих рецепторы к TNF α (рис. 1). Было показано, что в популяции моноцитов условно-здоровых доноров отмечается достоверно более высокий процент клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типа, по сравнению с больными ревматоидным артритом.

Кроме того, в популяции В-лимфоцитов условно-здоровых доноров отмечается достоверно меньший процент клеток, несущих рецепторы II типа, по сравнению с больными ревматоидным артритом.

2. Определение экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типа к TNF α на CD14⁺ клетках в спонтанных и стимулированных культурах мононуклеарных клеток

Для изучения изменений в экспрессии рецепторов при стимуляции мононуклеарных клеток митогеном оценивалось процентное содержание позитивных клеток и абсолютное количество экспрессируемых рецепторов на моноцитах (CD14⁺) в культурах МНК человека: спонтанной и стимулированной LPS 055:B5 (обладающей повышенной активностью в отношении клеток моноцитарно-макрофагального ряда). Выбор для исследования популяции моноцитов обусловлен тем, что TNF α

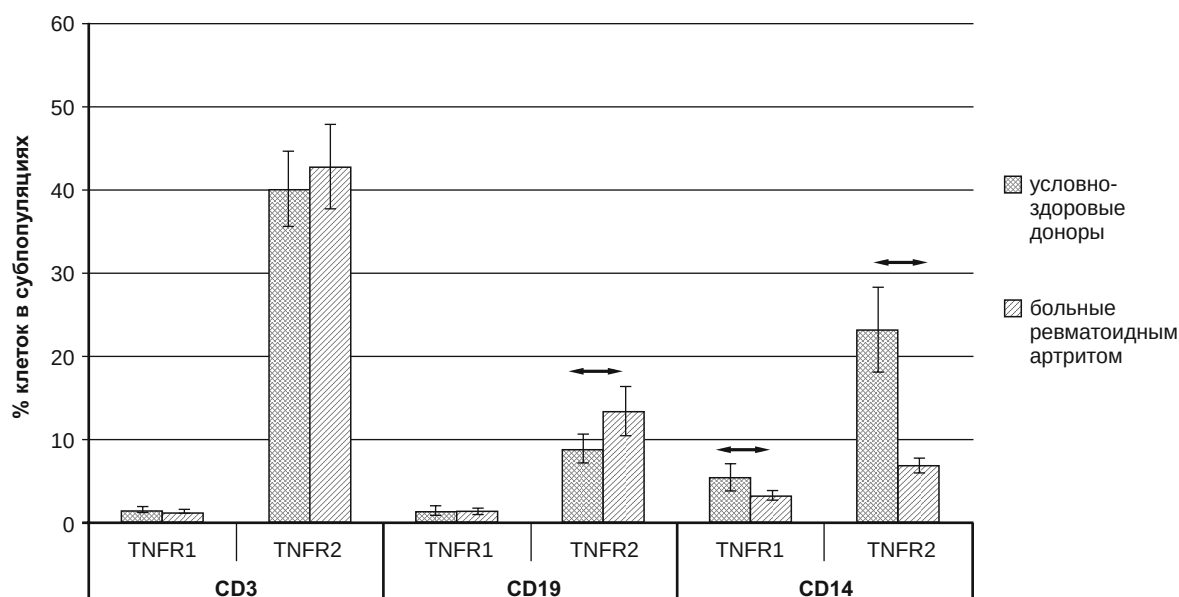


Рис. 1. Процент экспрессирующих TNFR1 и TNFR2 среди CD3, CD19 или CD14 позитивных клеток периферической крови условно-здоровых доноров ($n = 24$) и больных ревматоидным артритом ($n = 7$). Данные представлены как среднее и ошибка среднего ($M \pm m$). Стрелками на рисунке указана достоверность отличий, $p \leq 0,05$.

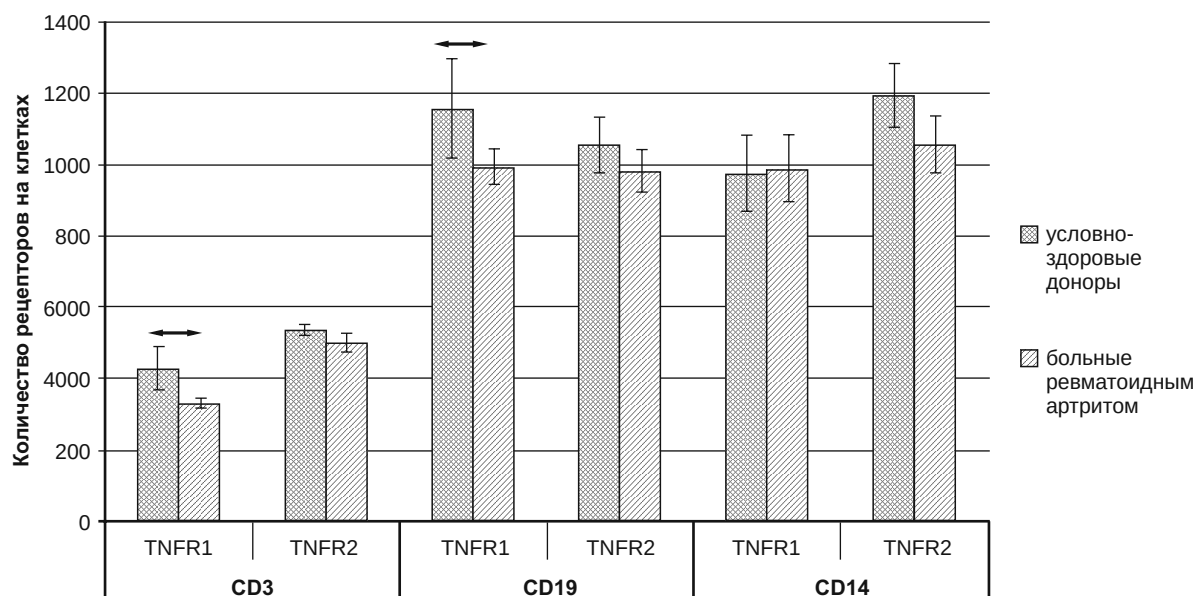


Рис. 2. Абсолютное содержание рецепторов TNFR1 и TNFR2 на субпопуляциях CD3, CD19 или CD14 позитивных клеток периферической крови условно здоровых доноров ($n = 24$) и больных РА ($n = 7$). Данные представлены как среднее и ошибка среднего ($M \pm m$). Стрелками на рисунке указана достоверность отличий, $p \leq 0,05$.

наиболее активно действует на клетки именно моноцитарно-макрофагального ряда, и регуляция рецепторного аппарата на этой популяции имеет большое значение для развития иммунных реакций. Данные представлены в таблице 1.

Была показана достоверная стимуляция экспрессии рецепторов на моноцитах под действием LPS в культурах МНК условно-здоровых доноров и больных РА при 24-часовом культивировании по сравнению со спонтанными культурами, с увеличением как процента клеток, несущих рецепторы, так и абсолютного количества экспрессируемых рецепторов к TNF α . По проценту позитивных клеток в популяции моноцитов LPS-стимулированных культур не отмечалось значимых различий между группами условно-здоровых доноров и больных РА. Однако при этом наблюдаются достоверно более высокий уровень абсолютного количества рецепторов как I, так и II типа, в стимулированных культурах больных РА по сравнению со здоровыми донорами.

3. Определение TNF и растворимых рецепторов

По результатам сравнения показателей между условно-здоровыми донорами и больными ревматоидным артритом, была выявлена тенденция ($0,05 < p < 0,1$) к более высокому содержанию TNF α в сыворотке крови больных РА (2,492 пг/мл) по сравнению со здоровыми донорами (0,836 пг/мл). При сравнении уровней растворимых рецепторов, в группах исследуемых показаны достоверно более высокие уровни сывороточного содержания растворимого рецептора II типа по сравнению с рецептором I типа как у больных РА (3450,4 и 1031,4 пг/мл соответственно), так и у условно-здоровых доноров (2291 и 844,3 пг/мл соответственно). Так же показан достоверно более высокий уровень растворимого рецептора II типа в сыворотке крови больных РА по сравнению с условно-здоровыми донорами.

4. Определение корреляций между компонентами системы TNF α

Проводился анализ корреляций между данными по уровням экспрессии мембраносвязанных рецепторов обоих типов, уровню содержания

Таблица 1
Относительное количество клеток, экспрессирующих TNFR1 и TNFR2, в субпопуляции моноцитов и абсолютное содержание рецепторов на моноцитах в спонтанной и стимулированной культурах МНК условно-здоровых доноров ($n = 24$) и больных РА ($n = 7$)

		TNFR1		TNFR2	
		% клеток	число рецепторов на клетке	% клеток	число рецепторов на клетке
Условно-здоровые доноры	Спонтанная культура	3,6 $\pm$ 0,4	1660,4 $\pm$ 155,8	25,3 $\pm$ 4,6	2314,5 $\pm$ 196,9
	LPS-стимулированная культура	8,2 $\pm$ 1,8	2451 $\pm$ 386,5	82,6 $\pm$ 3,8	4192,2 $\pm$ 410,7
Больные ревматоидным артритом	Спонтанная культура	3,63 $\pm$ 0,8	1893,466 $\pm$ 234,2	27,9 $\pm$ 2,9	2461,4 $\pm$ 191,5
	LPS-стимулированная культура	5 $\pm$ 0,8*	3831,2 $\pm$ 571,8*	87,7 $\pm$ 3,1	6319,6 $\pm$ 708,4*

Примечание: данные представлены как среднее и ошибка среднего ($M \pm m$). * – достоверные отличия в группе больных ревматоидным артритом по сравнению с показателями условно-здоровых доноров, $p \leq 0,01$.

растворимых рецепторов и содержанию TNF α с использованием коэффициента Пирсона, значимыми считались корреляции при $p \leq 0,05$.

У здоровых доноров содержание растворимых рецепторов I типа положительно коррелирует с количеством рецепторов I типа на интактных клетках в субпопуляции моноцитов. Была установлена корреляция между процентным содержанием клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типа, в популяции интактных моноцитов, и также в спонтанной культуре МНК между I и II типом рецепторов, как по их абсолютному количеству, так и по проценту клеток, экспрессирующих данные рецепторы.

У больных РА повышенный уровень содержания TNF α связан отрицательной корреляцией с уровнем экспрессии TNFR1 на интактных В-лимфоцитах и процентным содержанием моноцитов, экспрессирующих TNFR2. Установлено, что уровни растворимых рецепторов I и II типа положительно коррелируют между собой, что согласуется с литературными данными [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе клеток в условиях поликлональной активации митогеном абсолютное количество рецепторов обоих типов на клетках LPS-стимулированных культур моноцитов у больных достоверно больше по сравнению со здоровыми донорами. Это свидетельствует о том, что иммунокомпетентные клетки больных ревматоидным артритом более активно реагируют на введение в культуру липополисахарида, увеличивая абсолютное количество экспрессируемых рецепторов к TNF α , что обусловлено их скомпрометированностью в отношении развития провоспалительных реакций.

При сравнении показателей содержания растворимых и экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов был выявлен ряд взаимосвязей. Так как одним из способов образования растворимых рецепторов является сращивание с мембраны внеклеточной части мембраносвязанных рецепторов, можно предположить, что высокий уровень sTNFR2 у больных РА и низкие уровни процентного содержания моноцитов, экспрессирующих рецепторы II типа, связаны с усилением процесса шеддинга рецепторов, которые в растворимой форме могут нейтрализовать повышенный уровень TNF α в сыворотке крови больных РА, снижая системные эффекты этого медиатора.

При анализе корреляционных взаимосвязей между медиатором и уровнями мембраносвязанных и растворимых рецепторов было показано, что у больных РА и условно-здоровых доноров отмечаются корреляции с противоположным знаком. У здоровых доноров отмечена положительная корреляция между растворимым рецептором I типа и уровнем экспрессии его же на моноцитах, тогда как у больных ревматоидным артритом показана отрицательная корреляция между медиатором TNF α и мембраносвязанными рецепторами: для I типа по уровню экспрессии на В-лимфоцитах, а

для рецептора II типа — по проценту позитивных клеток среди моноцитов. Таким образом, обнаруженные различия в корреляционных взаимосвязях между больными ревматоидным артритом и условно-здоровыми донорами свидетельствуют об изменениях в системе регуляции иммуномодулирующего цитокина TNF α при протекании патологических реакций.

Полученные данные свидетельствуют о различиях в экспрессии рецепторов к TNF α на различных субпопуляциях иммунокомпетентных клеток в норме и при патологии, и о вовлеченности в патологический процесс при ревматоидном артрите не только самого медиатора, но и его рецепторов. Результаты исследования позволяют говорить, что разная способность отдельных субпопуляций иммунокомпетентных клеток реагировать на медиатор TNF α связана как с разным процентом клеток этой субпопуляции, несущих рецепторы к TNF α , так и с разным количеством рецепторов, экспрессирующихся на клетках. Кроме того полученные данные по экспрессии рецепторов к TNF α в ответ на стимуляцию LPS свидетельствуют о значимой роли моноцитов в реакциях клеточной культуры в ответ на поликлональную активацию. При этом моноцитарные клетки больных РА имели достоверно более высокий уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов по сравнению со здоровыми донорами, что подтверждает активную вовлеченность иммунокомпетентных клеток больных ревматоидным артритом в TNF-опосредованные процессы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Ю.Н. О системе цитокинов // Педиатрия. — 2007. — Т. 86, № 3. — С. 10 — 15.
2. Мазуров В.И. Блезни суставов. — СПб.: СпецЛит, 2008. — 408 с.
3. Böyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 1968. — Vol. 21. — P. 97.
4. Camussi G., Albano E., Tetta C., Bussolin F. The molecular action of tumor necrosis factor- α // Eur. J. Biochem. — 1991. — Vol. 202. — P. 3 — 14.
5. Dayer J.M. The process of identifying and understanding cytokines: from basic studies to treating rheumatic diseases // Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. — 2004. — Vol. 18, N 1. — P. 31 — 45.
6. Distler O., Müller-Ladner U., Schölmerich J., Gay R.E. et al. Rheumatoid arthritis: new molecular and cellular aspects // Med Klin (Munich). — 1999. — Vol. 94, N 12. — P. 673 — 680.
7. Engelmann H., Novick D., Wallach D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors // J. Biol. Chem. — 1990. — Vol. 265, N 3. — P. 1531 — 1536.
8. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level // FEBS Lett. — 1991. — Vol. 285, N 2. — P. 199 — 212.

9. Furst D.E. Development of TNF inhibitor therapies for the treatment of rheumatoid arthritis // Clin. Exp. Rheumatol. — 2010. — Vol. 28, N 3. — P. 5–12.

10. Kokkonen H., Söderström I., Rocklöv J., Hallmans G. et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. — 2010. — Vol. 62, N 2. — P. 383–391.

11. Kwiatkowski D., Hill A.V., Sambou I., Twumasi P. et al. TNF concentration in fatal cerebral,

non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria // Lancet. — 1990. — Vol. 336. — P. 1201–1204.

12. Lotz M., Setareh M., von Kempis J., Schwarz H. The nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family // J. Leukoc. Biol. — 1996. — N 60. — P. 1–7.

13. Song Y.W., Kang E.H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies // QJM. — 2010. — Vol. 103, N 3. — P. 139–146.

Сведения об авторах

Альшеевская Алина Анатольевна – аспирант ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, пр. Димитрова, д. 14, кв. 20; тел.: (383) 222-06-16)

Васильев Филипп Филиппович – младший научный сотрудник, аспирант ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН
Лопатникова Юлия Анатольевна – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН

Сенников Сергей Витальевич – заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Д.С. Баранова ¹, Л.В. Сахно ¹, И.В. Крючкова ¹, Н.В. Пронкина ¹, М.А. Тихонова ¹, Е.В. Баторов ¹,
 А.В. Гилевич ¹, В.В. Сергеевичева ¹, С.А. Сизикова ¹, Г.Ю. Ушакова ¹, А.А. Останин ¹,
 Т.И. Поспелова ², Е.Р. Черных ¹

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА И ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ КЛЕТОК ПРОДУКТА СЕПАРАЦИИ БОЛЬНЫХ ЛИМФОМАМИ И ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

¹ НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

² Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

Проанализированы субпопуляционный состав и цитокиновый профиль продуктов афереза больных лимфомами и острыми лейкозами. Показано, что продукты сепарации больных острыми лейкозами характеризуются более высоким относительным содержанием наивных Т-клеток, CD4⁺CD25^{high}-клеток и общего количества Т-лимфоцитов — на уровне тенденции, и более низким количеством гранулоцитов. Обнаружено достоверное повышение относительного количества активно делящихся CD34⁺-клеток (в фазе S, G₂/M), полученных у больных острыми лейкозами, а в сепаратах пациентов с лимфомами наблюдалось увеличение содержания CD34⁺-клеток в фазе G₀/G₁. Клетки сепаратов больных острыми лейкозами также отличались более высокими уровнями продукции провоспалительных цитокинов: IL-1, IL-6, MIP-1β, TNF-α, IL-8, IFN-γ (последние два — в виде тенденции), и цитокинов, стимулирующих гуморальный иммунный ответ (IL-4 и — в виде тенденции — IL-10). Имеющиеся различия не сказывались на эффективности ранней реконституции лимфоцитов.

Ключевые слова: трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, продукт афереза

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF GRAFT CELL SUBTYPES AND ITS CYTOKINE PRODUCTION OF LYMPHOMA AND LEUCOSIS PATIENTS

D.S. Baranova ¹, L.V. Sakhno ¹, I.V. Kruchkova ¹, N.V. Pronkina ¹, M.A. Tikhonova ¹,
 E.V. Batorov ¹, A.V. Gilevich ¹, V.V. Sergeyevicheva ¹, S.A. Sizikova ¹, G.Yu. Ushakova ¹,
 A.A. Ostanin ¹, T.I. Pospelova ², E.R. Chernykh ¹

¹Federal State Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Cell subtypes and cytokine profile of apheresis products collected from lymphoma and acute leucosis patients were analyzed. It was shown, that acute leucosis patients' grafts contained higher relative numbers of naïve T-cells, CD4⁺CD25^{high} T-cells, T-lymphocytes (non-significant trend) and lower counts of granulocytes. Significant increase of relative numbers of dividing CD34⁺ cells (in S, G₂/M phases of the cell cycle) was demonstrated in acute leucosis patients' grafts. In lymphoma grafts the levels of CD34⁺ cells in G₀/G₁ phases were found to be increased. Cells isolated from grafts of acute leucosis patients characterized by higher levels of proinflammatory cytokines production, such as IL-1, IL-6, MIP-1β, TNF-α, IL-8, IFN-γ (the last two ones — non-significant trend) and cytokines, essential for humoral immune response (IL-4 and — in trend — IL-10). The existing differences didn't influence on effectiveness of early lymphocyte recovery.

Key words: autologous hematopoietic stem cell transplantation, apheresis product

Высокодозная химиотерапия с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (АТГСК) является одним из эффективных методов лечения гематологических заболеваний. В последние годы большое внимание уделяется содержащимся в продукте афереза иммунокомпетентным клеткам и их функциональной активности, как важным факторам, влияющим на исход АТГСК.

Гомеостатическая пролиферация трансплантируемых зрелых лимфоцитов — один из основных путей восстановления популяций Т-клеток после АТГСК. Со сроками выхода из лимфопении прямо коррелирует количество реинфузируемых лимфоцитов, либо отдельных субпопуляций: CD8⁺-клеток, NK-клеток [1, 5, 6]. При этом раннее восстановление лимфоцитов является независимым фактором увеличения общей выживаемости и времени до прогрессии заболевания после

АТГСК при неходжкинских лимфомах, лимфомах Ходжкина, миеломной болезни, остром миелоидном лейкозе [7]. Трансплантируемые моноциты и дендритные клетки, помимо участия в восстановлении собственных популяций, также рассматриваются как источник цитокинов, необходимых для быстрой и эффективной реконституции лимфоцитов. [3, 4, 8], а количество реинфузируемых гранулоцитов, наоборот, негативно коррелирует с продолжительностью цитопении [9]. Не изучено влияние регуляторных Т-клеток (Treg) на содержание продукта афереза при имеющихся данных о возможном увеличении их количества в связи с резистентностью к химиотерапии [2].

Несмотря на идентичность мобилизации и сепарации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), неизбежны, но не изучены различия в субпопуляционном составе и функциональной активности клеток продуктов сепарации у больных

лимфомами и лейкозами, связанные с патогенезом данных болезней и, соответственно, подходами к терапии. При этом острые лейкозы по сравнению с лимфомами отличаются более агрессивным течением с меньшим ответом на проводимую терапию и остаются нерешенной проблемой современной медицины.

Целью настоящей работы стала сравнительная оценка субпопуляционного состава и цитокинового профиля клеток продукта афереза больных лимфомами и острыми лейкозами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование было включено 40 больных, из них 29 человек со злокачественными лимфомами и 11 — с острыми лейкозами, 19 мужчин и 21 женщина в возрасте от 19 до 58 лет, получивших АТГСК за период с 2010 по 2012 г. Обследование и лечение пациентов проводилось на базе отделения гематологии и трансплантации костного мозга НИИ клинической иммунологии СО РАМН и Городского Гематологического Центра г. Новосибирска. Неходжкинские лимфомы (НХЛ) диагностировалась у 7, лимфома Ходжкина (ЛХ) — у 11, множественная миелома (ММ) — у 11, острый миелоидный лейкоз — у 9 и острый лимфобластный лейкоз — у 2 пациентов. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия пациентов.

Мобилизация периферических гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Мобилизацию ГСК у большинства больных проводили с использованием различных режимов химиотерапии с последующим введением препаратов гранулоцитарного колоние-стимулирующего (Г-КСФ) фактора 5 мкг/кг/день. Г-КСФ в режиме монотерапии (10 мкг/кг/день) применялся только у 3 больных острым лейкозом. Процедуру афереза начинали по достижении концентрации 1×10^4 CD34⁺ клеток/мл периферической крови и продолжали до получения $\geq 2,0 \times 10^6$ CD34⁺ клеток/кг, используя сепараторы клеток крови AS TEC 204 (Fresenius) и Spectra LRS 07 (COBE).

Образцы для исследования брались сразу после завершения процедуры сепарации из пакета с продуктом афереза, при проведении нескольких сеансов — после первого. Забор периферической крови проводился в день сепарации и на момент выхода из лимфопении (лимфоциты $\geq 0,5 \times 10^9/\text{л}$).

Оценка клеточных популяций. Общий анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Hema-Screen 18 (Hospitex Diagnostics, Italy). Относительное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD45RA⁺, CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RA⁺, CD8⁺CD45RO⁺), в том числе T_{per} (CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25⁺CD127⁻, CD4⁺FOXP3⁺), NK-клеток (CD16⁺), В-лимфоцитов (CD19⁺), моноцитов (CD14⁺) оценивали в лейкозвеси методом проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson), используя FITC-, PE- и PerCP-меченные

моноклональные антитела («Сорбент», Россия, Becton Dickinson, США).

Оценка цитокинового профиля. Продукцию цитокинов (IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, MCP-1, MIP-1b) оценивали в супернатантах нестимулированных и стимулированных липополисахаридом 10 мкг/мл (LPS *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich) клетках ($1,5 \times 10^6/\text{мл}$) продукта афереза, культивированных в течение 48 часов в присутствии 5% FCS (Биолот), методом проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex Protein Assay System («Bio-Rad», США) с использованием коммерческих тест-систем 17-Plex в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0 для Windows (StatSoft). Для оценки значимости различий между показателями продуктов афереза больных использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы оценить количественные и функциональные особенности продуктов афереза в зависимости от заболевания был проведен сравнительный анализ относительного количества популяций клеток сепарата и спонтанную и стимулированную продукцию клетками цитокинов у больных с лимфомами ($n = 29$) и острыми лейкозами ($n = 11$). Сравнимые группы значительно не различались по возрасту, полу, а также режимам мобилизации и количеству вводимых CD34⁺ клеток (медиана $4,5 \times 10^6/\text{кг}$ и $3,8 \times 10^6/\text{кг}$ у пациентов с лимфомами и острыми лейкозами, соответственно).

Продукты афереза, полученные от больных острыми лейкозами, характеризовались более высоким относительным количеством наивных CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов (табл. 1) при статистически не отличающемся содержании клеток памяти и достоверным увеличением индекса CD4⁺CD45RA⁺/CD4⁺CD45RO⁺ ($p = 0,015$). Относительное содержание CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов в сравниваемых группах не отличались, однако была выявлена тенденция к более высокому содержанию CD3⁺ Т-клеток в сепаратах больных острыми лейкозами (табл. 1).

Продукты афереза пациентов с лимфомами отличались высоким (более чем в 2–3 раза) по сравнению с оппозитной группой содержанием нейтрофилов всех стадий созревания, при этом достоверное увеличение показано для юных нейтрофилов и гранулоцитов в целом (табл. 1).

Зарегистрировано одинаковое относительное количество В-лимфоцитов, NK-клеток, а также моноцитов в обеих группах обследованных пациентов.

Анализ содержания Трег показал, что относительное количество CD4⁺CD25⁺CD127⁻ и CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток в продуктах афереза боль-

Таблица 1

Относительное содержание субпопуляций клеток в продукте афереза

Параметры <i>M ± SEM, (Me)</i>	Больные с лимфомами (<i>n</i> = 29)	Больные с острыми лейкозами (<i>n</i> = 11)	Достоверность различий
CD3 ⁺ , %	66,3 ± 2,8 (67)	75 ± 5,1 (82)	<i>p</i> = 0,078
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ , %	9,99 ± 1,5 (7)	13,8 ± 2,1 (13)	<i>p</i> = 0,076
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ , %	8,3 ± 0,8 (7)	11,98 ± 1,6 (10)	<i>p</i> * = 0,030
CD4 ⁺ CD25 ^{high} , %	1,49 ± 0,2 (1,2)	2,3 ± 0,25 (2,3)	<i>p</i> * = 0,011
Юные, %	6,14 ± 1,14 (4)	1,63 ± 0,64 (0)	<i>p</i> * = 0,029
Гранулоциты, %	23,37 ± 3,17 (19)	7,63 ± 1,82 (6)	<i>p</i> * = 0,010
CD34 ⁺ -клетки в фазе G ₀ /G ₁	97,35 ± 0,52 (98)	93,69 ± 1,96 (95,65)	<i>p</i> * = 0,007
CD34 ⁺ -клетки в фазе S, G ₂ /M	2,55 ± 0,47 (2)	5,99 ± 2,03 (4,35)	<i>p</i> * = 0,042

Примечания: * – *p* < 0,05, достоверность различий по U-критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

ных не различалось, в отличие от CD4⁺CD25^{high}-клеток, относительное количество которых было достоверно больше в сепаратах больных острыми лейкозами (табл. 1).

При изучении гемопоэтических предшественников было обнаружено, что в продуктах сепарации больных острыми лейкозами достоверно повышено относительное количество CD34⁺-клеток в фазе S, G₂/M, т.е., активно делящихся, а в сепаратах пациентов с лимфомами, наоборот, наблюдалось увеличение содержания CD34⁺-клеток в фазе G₀/G₁ (табл. 1)

Анализ цитокин-секреторной активности показал, что клетки продуктов сепарации, полученные от пациентов с острыми лейкозами, характеризовались более высокой спонтанной продукцией IL-8 (на уровне тенденции) и MIP-1β, LPS-стимулированной продукцией IL-1, IL-4, IL-6, TNFα и G-CSF, а также тенденцией к более высокой LPS-стимулированной секреции IFN-γ и IL-10 (табл. 2).

Анализ ранней реконституции лимфоцитов в обеих группах пациентов, не выявил достоверных различий. Восстановление лимфоцитов до

0,5 × 10⁹ и более клеток/л в сроки до 15 дней чаще наблюдалось у пациентов с лимфомами (у 86 % по сравнению с 60 % пациентов с острыми лейкозами (P_{ТКФ} = 0,13).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, продукты сепарации больных острыми лейкозами отличались более высоким содержанием наивных Т-клеток и регуляторных Т-клеток, с тенденцией к повышенному содержанию Т-лимфоцитов, при сниженном относительном количестве гранулоцитов. Также обращает на себя внимание более высокая провоспалительная активность клеток сепарата больных острыми лейкозами и более высокая способность к продукции цитокинов, поддерживающих гуморальный иммунный ответ (IL-4, IL-10). Выявление более низкой продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов в продукте афереза больных лимфомами возможно связано с наличием в сепаратах у этих пациентов более высокого относительного количества гранулоцитарных клеток, что может быть обусловлено присутствием в по-

Таблица 2

Продукция цитокинов клетками продукта афереза

Параметры <i>M ± SEM, (Me), пг/мл</i>	Больные с лимфомами (<i>n</i> = 24)	Больные с острыми лейкозами (<i>n</i> = 10)	Достоверность различий
IL-1-стимулированная	2316 ± 226 (2434)	3360 ± 290 (3553)	<i>p</i> * = 0,015
IL-6-стимулированная	10213 ± 891 (10653)	13226 ± 611 (12910)	<i>p</i> * = 0,025
IFN-γ-стимулированная	1272 ± 110 (1213)	1619 ± 90 (1610)	<i>p</i> = 0,056
TNF-α-стимулированная	2311 ± 721 (1086)	3723 ± 1111 (2225)	<i>p</i> * = 0,037
IL-4-стимулированная	13,5 ± 0,7 (13,9)	16,8 ± 0,8 (17,3)	<i>p</i> * = 0,009
IL-8-спонтанная	4341 ± 245 (4502)	5105 ± 413 (4742)	<i>p</i> = 0,064
IL-10-стимулированная	918 ± 141 (791)	1500 ± 273 (1353)	<i>p</i> = 0,058
MIP1β-спонтанная	2912 ± 316 (3024)	4272 ± 478 (4528)	<i>p</i> * = 0,028
G-CSF-стимулированная	3785 ± 418 (4083)	6017 ± 749 (5971)	<i>p</i> * = 0,009

Примечания: * – *p* < 0,05, достоверность различий по U-критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

пуляции гранулоцитов миелоидных супрессорных клеток [10]. Невысокая частота раннего восстановления лимфоцитов после АТГСК при достаточном количестве реинфузируемых лимфоцитов, возможно, является следствием более агрессивных режимов химиотерапии, оказывающих негативное влияние на пролиферативный потенциал клеток. Дальнейшие исследования, в частности, анализ исходов АТГСК у больных лимфомами и острыми лейкозами, а также изучение взаимосвязи исходов с особенностями субпопуляционного состава и функциональной активностью трансплантируемых клеток, возможно, позволит выявить новые предикторы исходов и обосновать новые стратегии оптимизации ТГСК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Atta E.H., de Azevedo A.M., Maiolino A. High CD8+ lymphocyte dose in autograft predicts early absolute lymphocyte count recovery after peripheral hematopoietic stem cell transplantation // *Am. J. Hematol.* — 2009. — Vol. 84, N 1. — P. 21–28.
2. Condomines M., Quittet P., Lu Z.Y. Functional regulatory T cells are collected in stem cell autografts by mobilization with high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 176, N 11. — P. 6631–6639.
3. Damiani D., Stocchi R., Masolini P. Dendritic cell recovery after autologous stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplantation.* — 2002. — Vol. 30. — P. 261–266.
4. Dean R., Masci P., Pohlman B. Dendritic cells in autologous hematopoietic stem cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: graft content and post transplant recovery predict survival // *Bone Marrow Transplantation.* — 2005. — Vol. 36. — P. 1049–1052.
5. Hiwase D.K., Hiwase S., Bailey M., Bollard G. et al. Higher infused lymphocyte dose predicts higher lymphocyte recovery, which in turn, predicts superior overall survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma // *Biol Blood Marrow Transplant.* — 2008. — Vol. 14, N 1. — P. 116–124.
6. Kim D.G., Won D.I., Lee N.Y. Non-CD34+ cells, especially CD8+ cytotoxic T cells and CD56+ natural killer cells, rather than CD34 cells, predict early engraftment and better transplantation outcomes in patients with hematologic malignancies after allogeneic peripheral stem cell transplantation // *Biol Blood Marrow Transplant.* — 2006. — Vol. 12. — P. 719–728.
7. Porrata L.F., Litzow M.R., Markovic S.N. Graft engineering for autologous stem cell transplantation // *Gene Therapy and Molecular Biology.* — 2005. — Vol. 9. — P. 121–134.
8. Porrata L.F., Inwards D.J., Micallef I.N. Interleukin-15 Affects Patient Survival through Natural Killer Cell Recovery after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Non-Hodgkin Lymphomas // *Clin Dev Immunol.* — 2010. — Vol. 14. — P. 13.
9. Trébéden-Negre H., Rosenzweig M., Tanguy M.-L. Delayed recovery after autologous peripheral hematopoietic cell transplantation: potential effect of a high number of total nucleated cells in the graft // *Transfusion.* — 2010. — Vol. 50, N 12. — P. 2649–2659.
10. Vieweg J., Su Z., Dahm P., Kusmartsev S. Reversal of tumor-mediated immunosuppression // *Clin. Cancer Res.* — 2007. — Vol. 13, N 2. — P. 727–732.

Сведения об авторах

Баранова Дарья Сергеевна – врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга, аспирант кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ НГМУ, Новосибирск

Сахно Людмила Васильевна – старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук

Крючкова Ирина Валентиновна – заведующая отделением гематологии с блоком трансплантации костного мозга научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук

Пронкина Наталья Викторовна – заведующая лабораторией научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук

Тихонова Марина Александровна – старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук

Баторов Егор Васильевич – аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН (630090, г. Новосибирск, ул. Жемчужная, 32-43; тел.: +7-953-877-82-19; e-mail: Ebatorov@gmail.com)

Гилевич Андрей Викторович – заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук

Сергеевичева Вера Васильевна – врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук

Сизикова Светлана Анатольевна – врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук

Ушакова Галина Юрьевна – врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук

Останин Александр Анатольевич – ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, доктор медицинских наук, профессор

Поспелова Татьяна Ивановна – заведующая кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ, доктор медицинских наук, профессор

Черных Елена Рэмовна – заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)

Е.В. Баторов, Е.Я. Шевела, И.В. Крючкова, Д.С. Баранова, В.В. Сергеевичева, С.А. Сизикова,
Г.Ю. Ушакова, А.В. Гилевич, А.А. Останин, Е.Р. Черных

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ЛИМФОМАМИ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Проанализировано влияние ко-трансплантации костномозговых мезенхимальных стромальных клеток (МСК) на клинико-лабораторные показатели эффективности аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) у больных злокачественными лимфомами. Ко-трансплантация МСК в средней дозе $0,178 \times 10^6/\text{кг}$ была проведена 74 больным лимфомами. Группу сравнения составили сопоставимые пациенты ($n = 83$) со стандартной аутологичной ТГСК. Использование относительно небольших количеств *ex vivo* генерированных МСК, вводимых после трансплантации ГСК, приводит к уменьшению длительности периодов критической нейтропении и тромбоцитопении. Пациенты с ко-трансплантацией МСК отличались более эффективным ранним восстановлением лимфоцитов. Не выявлено увеличения частоты инфекционных осложнений и проявлений нефро- и гепатотоксичности. Анализ 5-летней выживаемости больных не выявил значимых различий между группами больных со стандартной ТГСК и ко-трансплантацией МСК и ГСК по показателю общей выживаемости, однако продемонстрировал достоверное улучшение показателей выживаемости до рецидива/прогрессии заболевания в группе пациентов с ко-трансплантацией МСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

CLINICAL EFFECTS OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN LYMPHOMA PATIENTS WITH AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

E.V. Batorov, E.Ya. Shevela, I.V. Kryuchkova, D.S. Baranova, V.V. Sergeevicheva,
S.A. Sizikova, G.Yu. Ushakova, A.V. Gilevich, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh

Research Institute of Clinical Immunology SD RAMS, Novosibirsk, Russia

The clinical and laboratory effects of bone-marrow derived mesenchymal stromal cells (MSC) in patients with malignant lymphomas following autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) have been investigated. Co-transplantation of MSC in average dose of $0,178 \times 10^6/\text{kg}$ was conducted in 74 patients with auto-HSCT. The control group included 83 patients eligible for standard HSCT. We revealed the decreasing of the period of neutropenia and thrombocytopenia when hematopoietic stem cells were co-transplanted with low doses *ex vivo* expanded autologous MSC. Patients with MSC co-transplantation were differed by more effective early lymphocyte recovery. At the same time MSC co-transplantation did not increase the incidence of infectious complications and cases of renal and hepatic toxicity. Patients with MSC co-transplantation did not differ from opposite group by 5-year overall survival, but were characterized by significantly better progression-free survival.

Key words: mesenchymal stromal cells, hematopoietic stem cells transplantation

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) относятся к классу соматических стволовых клеток и характеризуются способностью к самоподдержанию и дифференцировке в клетки тканей мезодермального и — при определенных условиях — экто- и эндодермального происхождения [4]. Благодаря своему дифференцировочному потенциалу, противовоспалительной, иммуномодулирующей, трофической активности, способности мигрировать в очаг поражения, а также низкой иммуногенности при сравнительно простом протоколе экспансии *in vitro* МСК являются привлекательным средством терапии многих заболеваний [14].

Основанием для использования МСК при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является их способность поддерживать и стимулировать гемопоэз посредством продукции факторов, стимулирующих гемопоэз и миграцию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), а также дифференцировки МСК в клетки костномозгового

микроокружения [2, 9]. Однако наличие иммуносупрессорной активности вызывает ряд опасений в плане возможных негативных эффектов МСК, включая снижение эффективности иммунорекогнитуции, увеличения частоты и /или тяжести инфекционных осложнений и ухудшение показателей общей и безрецидивной выживаемости [5, 10].

Ранее нами был разработан и внедрен в клинику метод ко-трансплантации МСК с целью улучшения приживления стволовых кроветворных клеток и ускорения восстановления гемопоэза при проведении ТГСК. В процессе апробации данного подхода на относительно небольшой выборке была показана хорошая переносимость ко-трансплантации МСК и сокращение продолжительности нейтро- и тромбоцитопении [7]. Целью настоящего исследования стало изучение влияния ко-трансплантации МСК на ряд клинико-лабораторных показателей, характеризующих эффективность ТГСК, включая эффективность восстановления кроветворения,

частоту развития/тяжесть инфекционных осложнений, купирование токсических эффектов ПХТ и показатели выживаемости после аутологичной ТГСК у больных злокачественными лимфомами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 157 больных, в том числе 89 мужчин и 68 женщин в возрасте от 7 до 62 лет (медиана 33 года), которым проводилась аутологичная ТГСК в отделении гематологии и трансплантации костного мозга Клиники иммунопатологии НИИ Клинической иммунологии СО РАМН в период с 2003 по 2012 гг. У 61 пациента диагностировалась неходжкинская лимфома (НХЛ), у 56 — лимфома Ходжкина (ЛХ) и у 40 больных — множественная миелома (ММ). У всех пациентов оценивали абсолютное количество лимфоцитов до мобилизации, в продукте сепарации, после ТГСК — на момент выхода из цитопении (лейкоциты $>1 \times 10^9/\text{л}$) и при выписке. Забор крови и все иммунологические исследования проводились после получения письменного информированного согласия пациентов.

Мобилизацию ГСК у большинства больных проводили с использованием различных режимов химиотерапии с последующим введением препаратов гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ) 5–10 мкг/кг/день. Г-КСФ в режиме монотерапии (10 мкг/кг/день) применялся только у 13 больных. Процедуру афереза начинали по достижении концентрации 1×10^4 CD34⁺ клеток/мл периферической крови и продолжали до получения $\geq 2,0 \times 10^6$ CD34⁺ клеток/кг, используя сепараторы клеток крови AS TEC 204 (Fresenius) и Spectra LRS 07 (COBE).

Пациенты получали режимы кондиционирования: BEAM (94 человека) и мелфалан 140–200 мг/м² (63 человека).

МСК генерировали из прилипающей фракции аспирата костного мозга согласно описанной технологии [13] и криоконсервировали в растворе человеческого альбумина («Микроген», Россия), содержащем 10% DMSO (Sigma-Aldrich). Размораживание клеток проводили непосредственно перед введением, двукратно отмывали, ресуспендировали в 20 мл физиологического раствора и вводили внутривенно сразу после трансплантации ГСК.

Общий анализ крови оценивали на автоматическом гематологическом анализаторе Hema-Screen 18 (Hospitex Diagnostics, Italy). Раннее восстановление лимфоцитов считалось наступившим, если выход из цитопении (лейкоциты $>1 \times 10^9/\text{л}$) наступал не позднее 15 дня, а количество лимфоцитов в периферической крови при этом составляло $0,5 \times 10^9/\text{л}$ и более.

Оценку биохимических показателей, включая концентрацию креатинина, АлАТ, АсАТ, проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Photometer 5010 (Riele, Germany) (до декабря 2008) и на автоматическом биохимическом анализаторе Labio-200 (Mindray, China).

Тяжесть инфекционных осложнений, степень цитопении и токсичности определяли в соответ-

ствии с рекомендациями ВОЗ и Международного противоракового союза.

Математическая обработка данных производилась при помощи параметрических и непараметрических методов с использованием программных пакетов для статистической обработки Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий между подгруппами больных использовались критерий χ^2 для дискретных переменных и критерий Вилкоксона — Манна — Уитни — для непрерывных переменных. Анализ выживаемости проведен по методу Каплан-Мейера с использованием Log-rank-критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы оценить влияние МСК на сроки выхода из цитопении, был проведен сравнительный анализ абсолютного количества нейтрофилов, тромбоцитов и лимфоцитов у пациентов с наличием и отсутствием ко-трансплантации МСК. Первую группу (МСК+) составили 74 больных, которым трансплантацию ГСК дополняли введением полученных накануне аутологичных МСК. Доза МСК варьировала от 0,01 до $1,38 \times 10^6$ клеток/кг (медиана $0,178 \times 10^6$ клеток/кг). Вторую группу (МСК–) составили 83 пациента, которым аутологичная ТГСК проводилась стандартно без МСК. Сравнимые группы значимо не различались по возрасту, полу, распределению больных по нозологическим формам, статусу на момент проведения ТГСК. Пациенты обеих групп характеризовались сходными показателями предлеченности, режимами мобилизации и кондиционирования и количеством вводимых CD34⁺ клеток (медиана $4,48 \times 10^6/\text{кг}$ и $4,45 \times 10^6/\text{кг}$ в группах МСК– и МСК+, соответственно).

Анализ сроков восстановления кроветворения показал, что ко-трансплантация МСК позволила сократить продолжительность посттрансплантационной критической нейтропении (количество нейтрофилов менее $0,5 \times 10^9/\text{л}$) в среднем с 16 до 11 дней. При исследовании длительности периода критической тромбоцитопении III степени (количество тромбоцитов менее $50 \times 10^9/\text{л}$) также было выявлено достоверное сокращение сроков тромбоцитопении у пациентов с ко-трансплантацией МСК по сравнению с группой контроля с 10 до 6 суток (табл. 1). Раннее восстановление лимфоцитов в группе МСК+ регистрировалось достоверно чаще, чем в группе МСК– (74 % против 54 %), однако, данные различия проявлялись в виде тенденции.

Предшествующие трансплантации миелоаблативные режимы химиотерапии приводят к развитию состояния глубокого иммунодефицита, в связи с этим серьезной проблемой посттрансплантационного периода являются инфекционные осложнения. Анализ частоты развития инфекционных осложнений в сравниваемых группах не выявил значимых различий (табл. 2). Как в группе больных со стандартной ТГСК, так и у пациентов с ко-трансплантацией МСК инфекционные осложнения регистрировались у подавляющего числа пациентов. Наиболее частыми осложнениями раннего периода

Таблица 1

Продолжительность цитопении

Параметры	Группы больных		Достоверность различий*
	МСК–, n = 83	МСК+, n = 74	
Нейтропения, дни ($< 0,5 \times 10^9/\text{л}$)	16,37 $\pm$ 1,9	11,4 $\pm$ 0,4	$p_U = 0,010$
Тромбоцитопения, дни ($< 50 \times 10^9/\text{л}$)	10,4 $\pm$ 1,4	6,0 $\pm$ 0,7	$p_U = 0,030$
Раннее восстановление лимфоцитов (количество, процент больных)**	44/79 (57 %)	52/70 (74 %)	$p_{\chi^2} = 0,018$

Примечание: * – достоверность различий по U-критерию Вилкоксона – Манна – Уитни и по χ^2 . ** – у 4 пациентов из группы МСК– и у 4 из группы МСК+ не определяли восстановление лимфоцитов.

после ТГСК являлись эпизоды фебрильной лихорадки неясного генеза, которые наблюдались у 83 % в группе МСК– и 87 % пациентов в группе МСК+. Поражение слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта (стоматит, эзофагит, гастрит и/или энтеропатия) выявлялось также с одинаковой частотой (79 % и 77 % пациентов в группах МСК– и МСК+). Тем не менее, тяжелые инфекционные осложнения (мукозит III–IV степени, энтеропатия III степени) в группе МСК– выявлялись практически в 2 раза чаще, чем в группе МСК ($p_{\text{ТМФ}} = 0,053$).

Таблица 2
Структура инфекционных осложнений

		МСК–	МСК+	p_{χ^2}
Лихорадка неясного генеза	нет	14 (17 %)	9 (13 %)	0,39
	есть	67 (83 %)	64 (87 %)	
Мукозит и энтеропатия	нет	16 (20 %)	19 (26 %)	0,36
	I–II ст.	42 (51 %)	43 (58 %)	0,39
	III–IV ст.	24 (29 %)	12 (16 %)	0,053

Примечание: * – достоверность различий по χ^2 .

Для исследования влияния МСК на индуцированную химиотерапией нефро- и гепатотоксичность были оценены изменения концентраций креатинина, АлАТ, АсАТ в сыворотке крови. Больные обеих групп исходно характеризовались повышенными уровнями исследуемых показателей на фоне ХТ, которые в течение месяца после ТГСК достоверно снижались в обеих группах в равной степени, что свидетельствовало об отсутствии токсического эффекта вводимых МСК. Анализ в подгруппах с исходно повышенной концентрацией креатинина показал, что через месяц после ТГСК уровень данного показателя в группе МСК+ снижался до нормативных значений, тогда как в группе МСК– оставался повышенным. Кроме того, при анализе индивидуальных значений снижение исходно повышенного уровня креатинина регистрировалось в меньшем проценте случаев, чем в группе МСК+ (47 % против 67 %), хотя различия проявлялись в виде тренда. Таким образом, введение МСК не усугубляло ПХТ-индуцированную нефро- и гепатотоксичность и позитивным образом сказывалось на купировании нефротоксического синдрома.

Анализ общей 5-летней выживаемости выявил выраженную тенденцию к более высоким показателям

жизни в группе с МСК (72 % против 54 %, $p = 0,15$). При этом пациенты с котрансплантацией МСК характеризовались достоверно более высокими показателями 5-летней безрецидивной выживаемости (81 % против 44 %, $p = 0,014$) (рис. 1).

Проведенные нами исследования показали, что внутривенное введение небольших количеств аутологичных МСК (в среднем, $0,178 \times 10^6$ клеток/кг) сокращало продолжительность нейтро- и тромбоцитопении, не оказывало ингибирующего действия на характер восстановления лимфоцитов и более того, повышало частоту ранней реконституции лимфоцитов, - независимого фактора увеличения общей выживаемости и времени до прогрессии после аутологичной ТГСК при неходжкинских лимфомах, лимфомах Ходжкина и миеломной болезни [6, 11]. Отсутствие различий в частоте инфекционных осложнений может служить доказательством отсутствия клинически значимой иммуносупрессии, что, вероятно, связано с небольшим количеством трансфузируемых МСК. Действительно, в настоящее время для предотвращения и лечения РТПХ после аллогенной ТГСК используются достаточно высокие дозы МСК – в среднем, $1,0 - 1,5 \times 10^6/\text{кг}$ [3, 7]. Имеются данные, что при низких количествах МСК или низком уровне базальной пролиферации лимфоцитов, мезенхимальные клетки способны усиливать пролиферативный ответ лимфоцитов на аллоантигены и стимуляцию гомеостатическими цитокинами [5, 8]. Также ранее было показано, что МСК больных лимфомами в отличие от клеток доноров характеризуются сниженной иммуносуперсаторной и наличием стимулирующей активности в смешанной культуре лимфоцитов [1].

Использование МСК не усугубляет индуцированную химиотерапией нефро- и гепатотоксичность, однако на данном этапе исследований не удалось выявить четкого рено- и гепатопротективного эффекта этих клеток, описанного в эксперименте и в клинических исследованиях [12, 14]. Вероятно, отсутствие данного эффекта связано с исходно низкой частотой встречаемости выраженного нефротоксического синдрома в анализируемых группах и использовании относительно невысоких концентраций МСК. Тем не менее, более выраженное (до нормативного уровня) снижение концентрации креатинина в группе (МСК+) указывает на позитивный эффект этих клеток (табл. 3).

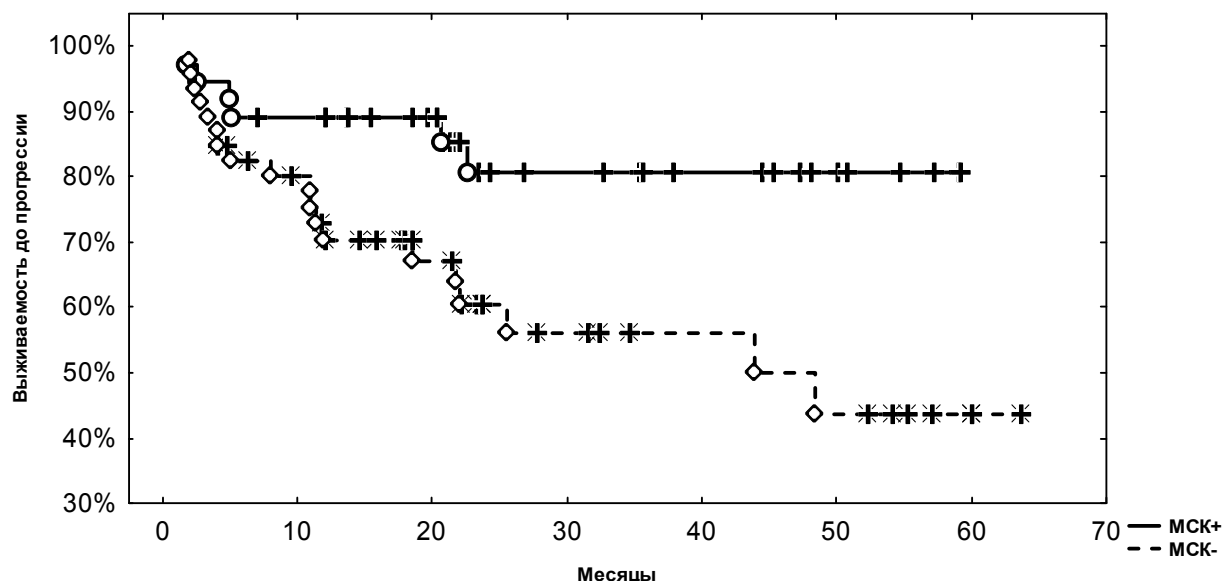


Рис. 1. Анализ выживаемости до прогрессии в группах больных со стандартной ТГСК и ко-трансплантацией МСК. (Представлены данные по выживаемости до рецидива/прогрессии основного заболевания 68 человек в группе МСК–, 60 человек в группе МСК+. В группе МСК– медиана выживаемости составила 43,5 месяца, в группе МСК+ не достигнута. Кривые построены по методу Каплана-Мейера, сравнительный анализ кривых выживаемости проводили с использованием непараметрического Log-rank-критерия).

Таблица 3

Индукцированная химиотерапией нефро- и гепатотоксичность

	МСК–	МСК+
АЛТ (количество норм):		
- на фоне ХТ	1,98 ± 0,17 (n = 75)	1,95 ± 0,17 (n = 69)
- через 1 мес. после ТГСК	1,33 ± 0,09**	1,37 ± 0,11**
АСТ (количество норм):		
- на фоне ХТ	1,22 ± 0,06 (n = 75)	1,28 ± 0,08 (n = 70)
- через 1 мес. после ТГСК	1,08 ± 0,03*	1,06 ± 0,03**
Креатинин (мкмоль/л):		
- на фоне ХТ	100,75 ± 4,6 (n = 74)	98,96 ± 4,0 (n = 69)
- через 1 мес. после ТГСК	91,7 ± 5,5**	87,6 ± 3,27**
Группа с повышенным уровнем креатинина (> 1,26 × N _{max}):		
- на фоне ХТ	161 ± 12,7 (n = 15)	156 ± 10,6 (n = 12)
- через 1 мес. после ТГСК	134 ± 22,8*	117 ± 11,3*

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ – достоверность различий между показателями на фоне химиотерапии (ХТ) и через 1 месяц по U-критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

Введение МСК не сказывается негативным образом на выживаемости больных и более того, сопровождается увеличением 5-летней безрецидивной выживаемости. Суммируя вышесказанное, можно заключить, что ко-трансплантация ГСК и МСК приводит к сокращению сроков восстановления кроветворения, позитивно влияет на процесс иммунореконституции и показатели безрецидивной выживаемости больных.

ЛИТЕРАТУРА

- Петровский Я.А., Курганова Е.В., Тихонова М.А. Характеристика мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у больных гемобластомами // Гематология и трансфузиология. – 2008. – Т. 53, № 2. – С. 32 – 38.
- Angelopoulou M., Novelli E., Grove J.E. Co-transplantation of human mesenchymal stem cells

enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice // Exp Hematol. – 2003. – Vol. 31. – P. 413–420.

- Battiwalla M., Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation // Cytotherapy. – 2009. – Vol. 11, N 5. – P. 503–515.
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // Stem Cells. – 2001. – Vol. 19. – P. 180–192.
- Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Schaeren S. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15 // Ann Rheum Dis. – 2009. – Vol. 68. – P. 1352–1359.
- Gordan L.N., Sugrue M.W., Lynch J.W. Correlation of early lymphocyte recovery and progression-free survival after autologous stem-cell transplant in

patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma // Bone Marrow Transplant. — 2003. — Vol. 31. — P. 1009 — 1013.

7. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L. Mesenchymal stem cells for treatment of steroidresistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study // Lancet. — 2008. — Vol. 371. — P. 1579 — 1586.

8. Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S.E. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex // Scand. J. Immunol. — 2003. — Vol. 57. — P. 11 — 20.

9. Majumdar M.K., Thiede M.A., Haynesworth S.E., Bruder S.P. et al. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages // J Hematother Stem Cell Res. — 2000. — Vol. 9. — P. 841 — 848.

10. Ning H., Yang F., Jiang M. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells

and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study // Leukemia. — 2008. — Vol. 22. — P. 593 — 599.

11. Porrata L.F., Litzow M.R., Inwards D.J. Infused peripheral blood autograft absolute lymphocyte count correlates with day 15 absolute lymphocyte count and clinical outcome after autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma // Bone Marrow Transplant. — 2004. — Vol. 33. — P. 291 — 298.

12. Salem H.K., Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status // Stem Cells. — 2010. — Vol. 28. — P. 585 — 596.

13. Sergeevicheva V.V., Shevela E.Y., Sizikova S.A. Autologous mesenchymal stromal cells of hemoblastosis patients efficiently support hematopoietic recovery after stem cell transplantation // Cellular Therapy and Transplantation. — 2010. — Vol. 1, N 4. — P. 98 — 105.

14. Tyndall A., Uccelli A. Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks // Bone Marrow Transplant. — 2009. — Vol. 43. — P. 821 — 828.

Сведения об авторах

Баторов Егор Васильевич — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН (630090, г. Новосибирск, ул. Жемчужная, 32-43; тел.: +7-953-877-82-19; e-mail: Ebatorov@gmail.com)

Шевела Екатерина Яковлевна — старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Крючкова Ирина Валентиновна — заведующая отделением гематологии с блоком трансплантации костного мозга, клиника иммунопатологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Баранова Дарья Сергеевна — аспирант кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии, ФПК и ППВ НГМУ, врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга, клиника иммунопатологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН

Сергеевичева Вера Васильевна — врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга, клиника иммунопатологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Сизикова Светлана Анатольевна — врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга, клиника иммунопатологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Ушакова Галина Юрьевна — врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга, клиника иммунопатологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Гилевич Андрей Викторович — заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии, клиника иммунопатологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, Новосибирск, кандидат медицинских наук

Останин Александр Анатольевич — ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, доктор медицинских наук

Черных Елена Рэмовна — заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)

Б.А. Бахметьев¹, С.Я. Зверев², Н.С. Калашникова², Л.В. Ключникова²**АКТУАЛЬНОСТЬ РАЗРАБОТКИ ВОЗРАСТНЫХ НОРМ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ КЛЕТОК КРОВИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЗА СОСТОЯНИЕМ ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫМИ МАТЕРЯМИ**¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (Пермь)² Пермский краевой Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (Пермь)

Учитывая рост числа ВИЧ-инфицированных женщин детородного возраста, настоящее исследование было направлено на сравнение CD-фенотипа детей, рожденных инфицированными матерями с возрастными нормами, полученными в ходе изучения функционального состояния иммунной системы здоровых детей разного пола и возраста в Пермском крае. Было обследовано 133 ребенка инфицированных матерей в возрасте от 1 месяца до 4 лет и 53 ребенка, которые в момент проведения исследования были клинически здоровы и не страдали хроническими заболеваниями. Среди лимфоцитов периферической крови детей идентифицировали число CD3+-Т-лимфоцитов, CD3+CD4+-Т-хелперов, CD3+CD8+-цитотоксических Т-лимфоцитов, CD3-CD19+-В-лимфоцитов, CD3-CD16+/56+-NK-клеток. Было установлено достоверное повышение функциональной активности иммунной системы у детей группы риска. У ВИЧ-положительных детей в возрастных группах от 1 до 6 месяцев и от 1 года до 4 лет, по сравнению с их здоровыми сверстниками, выявлено повышение абсолютного числа лейкоцитов, лимфоцитов, Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов. Напротив, в возрастной группе от 6 до 12 месяцев при аналогичном сравнении показано снижение процентного числа лимфоцитов и абсолютного числа NK-клеток. Разделение исследуемых детей по полу подтвердило необходимость учета данного фактора даже в столь раннем возрасте. Было показано, что как при перинатальном контакте, так и при развитии ВИЧ-инфекции реакции мужского и женского организмов отличаются. Данные, полученные при иммунофенотипировании крови здоровых детей г. Перми, были сравнены с аналогичными американских и китайских исследований. Выявленные отличия зависели, прежде всего, от возрастного диапазона обследованных детей и чаще затрагивали абсолютные значения клеток, экспрессирующих конкретные маркеры. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшей временной детализации при оценке состояния иммунной системы у детей в норме и позволяют разработать качественно новые критерии мониторинга иммунной системы при риске вертикального пути заражения ВИЧ.

Ключевые слова: ВИЧ, дети, возраст, иммунофенотипирование**NECESSITY OF AGE-RELATED STANDARDS FOR IMMUNE PHENOTYPING OF BLOOD CELLS FOR MONITORING OF HEALTH IN CHILDREN BORN BY HIV-INFECTED WOMEN**B.A. Bakhmetyev¹, S.Ya. Zverev², N.S. Kalashnikova², L.V. Kluchnikova²¹ Institute of ecology and genetics of microorganisms Ural Branch of RAS, Perm² Perm Regional Centre of Prevention and Control of AIDS and infectious diseases, Perm

Considering the increase in number of HIV-infected women of childbearing age this study was aimed at a comparison of CD-phenotype of children born by infected mothers with age standards obtained during the analysis of the functional state of the immune system of healthy children differing by sex and age in the Perm region. 133 children from infected mothers at the age from 1 month to 4 years and 53 clinically healthy children were examined. Among the peripheral blood lymphocytes of children the numbers of CD3+-T-lymphocytes, CD3+CD4+-T-helpers, CD3+CD8+-cytotoxic T-lymphocytes, CD3-CD19+-B-lymphocytes, CD3-CD16+/56+-NK-cells were identified. The increase in the functional activity of the immune system of the risk group was reliably determined. In HIV-positive children of 1 to 6 months and 1 to 4 years the increase in the absolute number of leukocytes, lymphocytes, T-lymphocytes, cytotoxic T-lymphocytes, B-lymphocytes was observed as compared with their healthy coevals. By contrast, under similar comparison within the age group of 6 to 12 months the decrease in percentage of lymphocytes and absolute number of NK-cells was determined. Gender-based division of children under study supported the necessity in taking into account this factor yet in this early age. It was shown that both in perinatal contact and under the progression of HIV infection the reaction of male and female bodies differed. Data obtained from the phenotyping of blood from healthy children in the city of Perm were compared with those provided from American and Chinese investigations. Resulting differences primarily depended on the age range of the children and were frequently related to the absolute cell number that expressed definite markers. Results evidence for the necessity in further temporal specification under the assessment of the state of the immune system in children, and allow developing new criteria for immune system monitoring under the risk of vertical route of HIV infection.

Key words: HIV, children, age, immunophenotyping

Начиная с 2002 г., в динамике развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в Пермском крае произошли существенные изменения. Снижение заболеваемости сопровождалось увеличением доли гетеросексуального пути передачи по сравнению с парентеральным при внутривенном

введении наркотиков, а также значительным вовлечением в эпидемический процесс женщин фертильного возраста. В связи с этим на территории края происходит рост количества детей, рожденных инфицированными ВИЧ матерями, кумулятивное число которых на 16 марта 2012 года

составило 2077. Согласно статистическим данным, 50 % таких детей поражаются вирусом [13]. Этиотропная профилактика вертикального пути передачи инфекции и отказ от грудного вскармливания снижают вероятность инфицирования ребенка до 2 % [12]. Иммунная система детей, рожденных инфицированными матерями, требует постоянного контроля, учитывая факт перинатального контакта с ВИЧ и, как следствие этого, возможности развития ответных реакций или инфекции.

Современные методы мониторинга состояния иммунной системы позволяют получать конкретные данные о количественном и функциональном состоянии отдельных популяций моноклеарных клеток. Проточная цитометрия наряду с вирусологическими исследованиями занимает особое место в мониторинге ВИЧ/СПИДа, позволяя понять патогенез этого заболевания [23]. Исследования в этой области указывают на различия, существующие в данных механизмах у взрослых и детей [9, 11, 12]. Изучение ВИЧ-инфекции у детей требует масштабных динамических исследований с учетом возрастных норм, широко варьирующих в разных странах и регионах [3, 7, 9, 20], что связано с генетическим полиморфизмом и локальной экологией, и требуют обязательной разработки региональных нормативов для детей [7, 20, 25].

Целью настоящего исследования было сравнение CD-фенотипа детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями Пермского края, с возрастными нормами, полученными в ходе изучения аналогичных показателей у их здоровых сверстников разного пола и возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе работы были обследованы 133 ребенка, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, в возрасте от 1 месяца до 4 лет и 53 ребенка, в этом же возрастном диапазоне, которые на момент проведения исследований были клинически здоровы и по данным анамнеза и амбулаторных карт не страдали хроническими заболеваниями. Все образцы крови для исследований были забраны с информированного согласия родителей детей.

В венозной крови детей определяли лейкоцитарный состав с учетом относительного (%) и абсолютного числа форменных элементов крови. Регистрация экспрессии CD-молекул на моноклеарных клетках проводилась на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) с использованием 2-цветных моноклональных антител стандартного диагностического набора Simultest IMK Lymphocyte Kit (Becton Dickinson, USA).

К гепаринизированной крови добавляли стандартный набор антител:

1. CD45 FITC/CD14 PE
2. Ig G1 FITC/IgG2 PE
3. CD3 FITC/CD19 PE
4. CD3 FITC/CD4 PE
5. CD3 FITC/CD8 PE
6. CD3 FITC/CD16+CD56 PE

FITC — флюоресцеина изотиоционат; PE-фикоэритрин

Пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. После связывания меток образцы лизировали стандартным раствором FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, USA) в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре, затем дважды отмывали стандартным раствором Cell Wash (Becton Dickinson, USA). В соответствии со стандартным протоколом иммунофенотипирования [3, 25] среди лимфоцитов венозной крови идентифицировали относительное число клеток:

- CD3+ -Т-лимфоцитов
- CD3+CD4+ -Т-хелперов
- CD3+CD8+ -цитотоксических Т-лимфоцитов
- CD3-CD19+ -В-лимфоцитов
- CD3-CD16+ /CD56+ -NK-клеток.

Анализ проводился с использованием стандартного пакета программ SimulSET Software 2000 (Becton Dickinson, USA).

Абсолютное число данных клеток рассчитывали из абсолютного числа лейкоцитов крови и процентного соотношения в них гранулоцитов и лимфоцитов, полученных на QBC™ AUTOREAD™ Plus Centrifugal Hematology System (Becton Dickinson, USA).

Диагноз ВИЧ-инфекции детям, рожденным инфицированными матерями, окончательно устанавливали по достижению ими возраста 18 месяцев серологическими методами: результаты иммуноферментного анализа (ИФА) подтверждали выявлением антител к индивидуальным структурным белкам вируса методом иммуноблота.

Для статистического анализа полученных данных использовали стандартные пакеты прикладных программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) и Statistica (StatSoft Inc., USA). Достоверность различий между двумя группами проводили по непарному t-критерию Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов крови детей проводился с учетом их пола и возраста. Общая характеристика возрастного и полового состава обследованных детей представлена в таблице 1.

В ходе исследования было установлено, что у детей младшей возрастной группы в возрасте от 1 до 6 месяцев, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, отмечается более высокая концентрация лейкоцитов крови по сравнению с детьми здоровых матерей. Однако это различие максимально и значимо только у ВИЧ-инфицированных детей (табл. 2). Кроме того, наблюдается достоверное увеличение абсолютных значений CD3⁺-Т-лимфоцитов и CD3⁻CD19⁺-В-лимфоцитов при ВИЧ-инфицировании ребенка (табл. 2). У детей, инфицированных ВИЧ, увеличение абсолютного и относительного количества CD3⁻CD19⁺-В-лимфоцитов сопровождается одновременным

Таблица 1

Распределение обследованных групп детей по возрасту и полу

Возраст	Дети здоровых матерей (группа контроля)			Дети ВИЧ-инфицированных матерей					
				ВИЧ-негативные			ВИЧ-позитивные		
	всего	мальчики	девочки	всего	мальчики	девочки	всего	мальчики	девочки
От 1 до 6 месяцев	9	5	4	78	38	40	4	3	1
От 6 месяцев до 1 года	10	6	4	28	6	22	4	2	2
От 1 года до 4 лет	34	14	20	12	6	6	7	5	2
Всего	53	25	28	118	50	68	15	10	5

Таблица 2

CD-фенотип лимфоцитов крови детей в возрасте от 1 до 6 месяцев

Показатель		Дети здоровых матерей		Дети ВИЧ-инфицированных матерей				Различия между группами		
				ВИЧ-негативные		ВИЧ-позитивные				
		1		2		3		1–2	1–3	2–3
		<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>			
лейкоциты	абс.	5011 ± 667	9	7805 ± 476	77	9587 ± 1072	4		*	
лимфоциты	%	65,2 ± 3,95	9	64,4 ± 1,34	77	72,5 ± 4,56	4			
	абс.	3264 ± 488	9	4871 ± 242	77	7059 ± 1155	4	*	*	*
CD3 ⁺	%	70,5 ± 2,09	9	6,0 ± 1,11	74	64,8 ± 2,39	4			
	абс.	1472 ± 154	9	1236 ± 125	74	1680 ± 336	4		*	*
CD19 ⁺	%	17,4 ± 1,94	9	24,8 ± 0,97	74	28,5 ± 1,50	4	*	*	
	абс.	605 ± 128	9	1219 ± 83	74	1968 ± 235	4	*	*	*
CD4 ⁺	%	40,6 ± 1,93	9	45,6 ± 1,12	77	41,5 ± 2,60	4			
	абс.	1312 ± 193	9	2182 ± 111	77	3016 ± 684	4	*	*	
CD8 ⁺	%	26,3 ± 1,48	9	21,8 ± 1,03	77	22,8 ± 1,70	4			
	абс.	874 ± 176	9	1044 ± 84	77	1587 ± 274	4		*	
CD16 ⁺ /56 ⁺	%	12,6 ± 1,90	9	10,8 ± 0,78	74	8,0 ± 1,78	4			
	абс.	404 ± 77	9	553 ± 60	74	548 ± 129	4			
Соотношение CD4 ⁺ / CD8 ⁺		1,59 ± 0,15	9	2,41 ± 0,12	77	1,85 ± 0,16	4	*		

Примечание: данные в таблице представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). абс. – абсолютное число клеток в 1 мкл крови, * – достоверные различия по непарному критерию Стьюдента; n – число детей в данной группе.

ростом абсолютного числа CD3⁺-Т-лимфоцитов, включая численность CD4⁺-Т-хелперов и CD8⁺-цитотоксических Т-лимфоцитов, без изменения соотношения CD4⁺/CD8⁺. Напротив, у ВИЧ-негативных детей инфицированных матерей наблюдается увеличение этого соотношения, поскольку более высокое число CD4⁺-клеток не ассоциировано с изменением числа CD8⁺-лимфоцитов.

При исследовании крови детей от 6 месяцев до 1 года (табл. 3) существенных различий в исследованных параметрах между контактными ВИЧ-негативными и детьми здоровых матерей установлено не было. В то же время у ВИЧ-инфицированных детей, по сравнению с детьми контрольной группы, зарегистрировано достоверное снижение процентного числа лимфоцитов в целом и абсолютного числа CD3⁺-CD16⁺/56⁺-NK-клеток.

С увеличением возраста различия между здоровыми и инфицированными детьми вновь стано-

вятся более явными (табл. 4) и по своей структуре схожи с различиями, установленными для младшей возрастной группы до 6 месяцев. Косвенными признаками ВИЧ-инфицирования детей в возрасте от 1 года до 4 лет являются более высокое абсолютное число CD3⁺-Т-лимфоцитов и повышение относительного и абсолютного количества CD3⁺CD8⁺-цитотоксических Т-лимфоцитов. По отношению к детям здоровых матерей в группе ВИЧ-позитивных также отмечается повышенное число лейкоцитов и лимфоцитов, и, как следствие, увеличиваются абсолютные значения CD3⁺CD4⁺-Т-хелперов и CD19⁺-В-лимфоцитов (табл. 4).

Учитывая возможность наличия половых различий в исследованных показателях, нами был проведен их сравнительный анализ отдельно для мальчиков и девочек (табл. 5). Было установлено, что ВИЧ-положительные девочки имеют больше отличий в абсолютных значениях исследованных

Таблица 3

CD-фенотип лимфоцитов крови детей в возрасте от 6 месяцев до 1 года

Показатель		Дети здоровых матерей		Дети ВИЧ-инфицированных матерей				Различия между группами		
				ВИЧ-негативные		ВИЧ-позитивные				
		1		2		3		1–2	1–3	2–3
		<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>			
лейкоциты	абс.	7520 ± 1227	10	8961 ± 605	28	8025 ± 2540	4			
лимфоциты	%	72,8 ± 3,23	10	63,1 ± 3,20	28	49,9 ± 7,37	4		*	
	абс.	5518 ± 929	10	5756 ± 507	28	4030 ± 1271	4			
CD3 ⁺	%	63,7 ± 1,73	10	64,7 ± 1,57	28	65,0 ± 1,87	4			
	абс.	3601 ± 672	10	3685 ± 317	28	2680 ± 893	4			
CD19 ⁺	%	24,0 ± 1,65	10	26,0 ± 1,19	28	25,0 ± 4,22	4			
	абс.	1346 ± 247	10	1523 ± 150	28	1024 ± 376	4			
CD4 ⁺	%	38,3 ± 1,57	10	41,5 ± 1,75	28	33,8 ± 8,22	4			
	абс.	2150 ± 388	10	2318 ± 195	28	1637 ± 771	4			
CD8 ⁺	%	23,1 ± 2,29	10	21,9 ± 1,31	28	30,3 ± 8,08	4			
	абс.	1356 ± 346	10	1239 ± 165	28	994 ± 196	4			
CD16 ⁺ /56 ⁺	%	12,0 ± 1,58	10	9,4 ± 0,76	28	9,0 ± 3,08	4			
	абс.	552 ± 49	10	556 ± 84	28	307 ± 89	4		*	
Соотношение CD4 ⁺ / CD8 ⁺		1,85 ± 0,25	10	2,04 ± 0,12	28	1,60 ± 0,27	4			

Примечание: данные в таблице представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). абс. – абсолютное число клеток в 1 мкл крови, * – достоверные различия по непарному критерию Стьюдента; n – число детей в данной группе.

Таблица 4

CD-фенотип лимфоцитов крови детей в возрасте от 1 года до 4 лет

Показатель		Дети здоровых матерей		Дети ВИЧ-инфицированных матерей				Различия между группами		
				ВИЧ-негативные		ВИЧ-позитивные				
		1		2		3		1–2	1–3	2–3
		<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>			
лейкоциты	абс.	6324 ± 333	33	7108 ± 1025	12	8629 ± 810	7		*	
лимфоциты	%	45,5 ± 2,51	33	52,1 ± 3,61	12	56,0 ± 5,34	7			
	абс.	2743 ± 185	33	3574 ± 415	12	4968 ± 824	7	*	*	
CD3 ⁺	%	67,5 ± 1,72	33	65,3 ± 2,71	12	70,7 ± 2,93	7			
	абс.	1855 ± 146	33	2299 ± 272	12	3488 ± 533	7		*	*
CD19 ⁺	%	19,5 ± 1,04	33	26,1 ± 1,45	12	20,6 ± 2,49	7	*		
	абс.	516 ± 42	33	912 ± 112	12	1050 ± 259	7	*	*	
CD4 ⁺	%	37,4 ± 1,44	33	41,6 ± 2,40	12	40,4 ± 3,31	7			
	абс.	1029 ± 84	33	1451 ± 166	12	1966 ± 314	7	*	*	
CD8 ⁺	%	26,1 ± 1,76	33	21,3 ± 1,78	12	28,6 ± 2,92	7			*
	абс.	711 ± 80	33	773 ± 146	12	1424 ± 272	7		*	*
CD16 ⁺ /56 ⁺	%	11,9 ± 1,24	33	9,5 ± 1,24	12	7,7 ± 0,68	7			
	абс.	314 ± 37	33	351 ± 70	12	381 ± 77	7			
Соотношение CD4 ⁺ / CD8 ⁺		3,19 ± 1,28	33	2,07 ± 0,18	12	1,57 ± 0,27	7			

Примечание: данные в таблице представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). абс. – абсолютное число клеток в 1 мкл крови, * – достоверные различия по непарному критерию Стьюдента; n – число детей в данной группе.

параметров, по сравнению со здоровыми сверстниками, чем мальчики. Инфицированные девочки характеризуются повышенным числом лимфоци-

тов, CD3⁺-клеток, CD19⁺-В-лимфоцитов, CD4⁺-Т-хелперов, CD8⁺-цитотоксических лимфоцитов, в то время как у мальчиков достоверно увеличиваются

общее число лейкоцитов, лимфоцитов и абсолютные значения CD19⁺-В-лимфоцитов, CD4⁺-клеток (табл. 5). В группах детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, половые различия еще более выражены. У девочек увеличиваются общее количество лейкоцитов, процент и абсолютное число лимфоцитов, и среди них — количество как В-клеток, так и CD3⁺-Т-клеток, абсолютные значения CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов, NK-клеток, процент Т-хелперов, соотношение CD4⁺/CD8⁺. Напротив, у мальчиков, на фоне общего повышения числа лимфоцитов, процент среди них CD3⁺-клеток, CD8⁺-цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток

снижен. У девочек с ВИЧ-инфекцией по сравнению с контактными ВИЧ-негативными детьми увеличен процент CD8⁺-лимфоцитов, а при аналогичном сравнении у мальчиков достоверно отличаются абсолютные значения данного показателя. Кроме того, у инфицированных девочек, по сравнению с ВИЧ-негативными детьми инфицированных матерей, снижено соотношение CD4⁺/CD8⁺-клеток. Анализ исследуемых показателей внутри групп показал, что различия между мальчиками и девочками практически отсутствуют в группе здоровых детей, за исключением соотношения CD4⁺/CD8⁺, которое больше у мальчиков, чем у девочек. В

Таблица 5

CD-фенотип лимфоцитов крови мальчиков и девочек

Показатель		Пол	Дети здоровых матерей		Дети ВИЧ-инфицированных матерей				Различия между группами		
					ВИЧ-негативные		ВИЧ-позитивные				
			1		2		3				
			<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	<i>n</i>	1–2	1–3	2–3
Лейкоциты	абс	Д	6225 ± 428	28	8179 ± 449	68	7960 ± 1162	5	*		
		М	6440 ± 552	25	7785 ± 600	50	9105 ± 1013	10		#	
Лимфоциты	%	Д	51,64 ± 3,53	28	63,64 ± 1,70	68	59,88 ± 8,40	5	*		
		М	5616 ± 3,36	25	61,76 ± 1,89	50	58,17 ± 4,48	10			
	абс	Д	3094 ± 294	28	5199 ± 314	68	5050 ± 1379	5	*	*	
		М	3647 ± 454	25	4617 ± 253	50	5388 ± 708	10	#		
CD3 ⁺	%	Д	65,74 ± 1,89	28	65,70 ± 1,04	67	69,20 ± 1,98	5			
		М	6892 ± 1,48	25	63,92 ± 1,45	48	66,80 ± 2,36	10		#	
	абс	Д	2033 ± 205	28	3380 ± 190	67	3529 ± 990	5	*	*	
		М	2513 ± 321	25	2866 ± 173	48	3592 ± 475	10			
CD19 ⁺	%	Д	20,52 ± 1,17	28	23,85 ± 0,82	67	24,6 ± 3,96	5	*		
		М	19,48 ± 1,22	25	27,08 ± 1,21	48	23,5 ± 1,97	10	#		
	абс	Д	653 ± 96	28	1254 ± 89	67	1242 ± 911	5	*	*	
		М	731 ± 111	25	1273 ± 107	48	1310 ± 138	10	#	#	
CD4 ⁺	%	Д	37,19 ± 1,44	28	44,51 ± 1,16	67	37,0 ± 6,0	5	*		
		М	39,08 ± 1,43	25	43,82 ± 1,41	48	39,9 ± 2,88	10	#		
	абс	Д	1176 ± 43	28	2241 ± 129	67	2109 ± 770	5	*	*	
		М	1420 ± 174	25	2002 ± 120	48	2182 ± 321	10	#	#	
CD8 ⁺	%	Д	25,70 ± 1,63	28	22,77 ± 1,05	67	32,4 ± 5,45	5			*
		М	25,36 ± 1,87	25	20,36 ± 1,09	48	25,0 ± 2,4	10		#	
	абс	Д	784 ± 89	28	1166 ± 111	67	1441 ± 269	5		*	
		М	949 ± 169	25	924 ± 64	48	1308 ± 204	10			#
CD16 ⁺ /56 ⁺	%	Д	12,56 ± 1,4	28	11,55 ± 0,86	67	6,4 ± 1,12	5			
		М	11,48 ± 1,09	25	8,63 ± 0,50	48	9 ± 1,19	10	#		
	абс	Д	364 ± 43	28	628 ± 71	67	295 ± 60	5	*		
		М	387 ± 45	25	401 ± 35	48	460 ± 75	10			
Соотношение CD4 ⁺ /CD8 ⁺		Д	1,6 ± 0,12	28	1,33 ± 0,29	67	1,33 ± 0,29	5	*		*
		М	3,79 ± 1,6	25	1,81 ± 0,28	48	1,81 ± 0,28	10			

Примечание: *M ± m* – средняя арифметическая и ее стандартная ошибка. абс. – абсолютное число клеток в 1 мкл крови, * – достоверные различия по непарному критерию Стьюдента для девочек, # – для мальчиков; различия между мальчиками и девочками внутри групп отмечены фоном, *n* – число детей в группе.

группе же детей, рожденных инфицированными матерями, достоверно отличаются процент $CD19^+$ -В-лимфоцитов, процентные и абсолютные значения NK-клеток. ВИЧ-инфицированные мальчики отличаются от ВИЧ-инфицированных девочек только по абсолютному числу NK-клеток (табл. 5).

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов считается одним из ключевых элементов мониторинга состояния здоровья инфицированных ВИЧ детей и взрослых [3, 20]. При этом считается, что снижение $CD4^+$ -лимфоцитов периферической крови является основным маркером развития синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) [25]. В случае вертикального пути передачи вируса у детей выявлено более быстрое падение численности этих клеток, чем у взрослых [10, 12, 13]. Однако в процессе постнатального онтогенеза иммунной системы у здоровых детей также наблюдаются возраст-ассоциированные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, затрагивающие и $CD4^+$ -клетки [7, 20], что существенно осложняет корректную диагностику развития ВИЧ-инфекции. Множество исследований в различных странах проводилось и проводится для определения нормальных колебаний субпопуляций лимфоцитов в зависимости от возраста [5, 6, 19, 22], пола [1, 9, 16, 17, 18, 21] и расовой принадлежности [2, 4, 8, 9, 14, 15, 23, 24]. Большинство авторов цитированных работ сходятся во мнении, что в условиях единой методологии фенотипирования возраст обследованных может быть ключевым фактором, ведущим к дополнительным вариациям результатов. Учитывая вышеизложенное, а также особенности возрастного и полового распределения обследованных детей (табл. 1), статистический анализ различий между CD-фенотипом лимфоцитов крови здоровых детей и их сверстников, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, проводили в трех возрастных диапазонах.

Маловероятно, что выявленное в настоящей работе увеличение числа лейкоцитов в группе ВИЧ-позитивных детей от 1 до 6 месяцев связано с активацией лимфопоэза после перинатального контакта с вирусом, так как значимое увеличение числа лимфоцитов не сопровождается достоверными отличиями по их процентному содержанию и не зависит от наличия или отсутствия инфекции у ребенка. Тем не менее, абсолютное число лимфоцитов оказывается одним из трех параметров, которые реально различаются между ВИЧ-позитивными и ВИЧ-негативными детьми, рожденными инфицированными матерями. Обращает на себя внимание тот факт, что количество фиксируемых различий в CD-фенотипе по отношению к группе здоровых детей меньше среди ВИЧ-негативных, чем среди ВИЧ-позитивных детей, по 4 и 5 показателям, соответственно. Особенно следует отметить факт увеличения соотношения $CD4^+/CD8^+$ у ВИЧ-негативных детей, и отсутствие такового у инфицированных, что предполагает различие реакций со стороны иммунной системы на перинатальный контакт с ВИЧ и непосредственную реакцию на развитие инфекции.

Менее показательной оказалась группа детей в возрасте от 6 месяцев до 1 года, здесь не было выявлено значимых различий между контактными и ВИЧ-позитивными детьми. Однако, по сравнению с детьми здоровых матерей, ВИЧ-инфицированные дети отличаются пониженным процентом лимфоцитов крови и абсолютным количеством $CD3^+CD16^+/CD56^+$ -NK-клеток. В следующей возрастной группе (с 1 года до 4 лет) различия между инфицированными и здоровыми детьми по своей структуре схожи с таковыми для младшей возрастной группы. ВИЧ-позитивные и ВИЧ-негативные дети, рожденные инфицированными матерями, отличаются определенной активацией процессов лейко- и лимфопоэза, что сопровождается изменением абсолютных значений параметров, характеризующих субпопуляционный состав лимфоцитов.

Разделение исследуемых детей по полу подтвердило необходимость учета данного фактора даже в столь раннем возрасте. Как при контакте с вирусом, так и при развитии ВИЧ-инфекции реакции мужского и женского организмов отличаются. Иммунная система мальчиков ВИЧ-инфицированных матерей реагирует более активно по сравнению с девочками — на фоне общего снижения $CD3^+$ -лимфоцитов растет численность Т-хелперов и снижается процент цитотоксических Т-клеток. При развитии инфекции изменения в организме девочек затрагивают в основном только абсолютные значения показателей, в то время как для мальчиков отмечается перераспределение и в процентном соотношении клеток — рост лимфоцитов и, среди них, $CD4^+$ -Т-хелперов.

Полученные нами в ходе настоящего исследования данные возрастных региональных нормативов иммунофенотипирования были сопоставлены с недавно опубликованными материалами Shearer et al. [20] и Kam et al. [7]. Были выявлены определенные различия, зависящие, прежде всего, от возрастного диапазона обследованных детей и затрагивающие абсолютные значения клеток, экспрессирующих определенные CD-маркеры. Для реализации возможности корректного сопоставления данных было проведено перераспределение обследованных нами детей в более узкие возрастные группы, аналогичные используемым в работе Shearer et al. (2003). Среди здоровых детей младших возрастных групп — от рождения до 3 месяцев, с 3 до 6 месяцев и с 6 месяцев до 1 года — на фоне снижения содержания лейкоцитов в периферической крови, выявлено уменьшение абсолютных значений $CD3^+$ -Т-лимфоцитов, $CD3^+CD4^+$ -Т-хелперов и $CD3^+CD19^+$ -В-лимфоцитов. В то же время численность $CD3^+CD16^+CD56^+$ -NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов, как в абсолютных, так и в относительных единицах у детей г. Перми была более высокой, чем у их американских сверстников. С увеличением возраста детей большинство перечисленных различий по абсолютным значениям нивелировались. Однако относительное количе-

ство NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов оставались более высокими у жителей Пермского края. По сравнению с китайскими детьми [7], пермские дети характеризуются более низким уровнем CD3⁺CD16⁺CD56⁺-NK-клеток в возрасте до 1 года и старше 2 лет, а также сниженным абсолютным числом CD3⁺CD8⁺-цитотоксических клеток в группе детей старше 1 года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости продолжения начатых исследований и углублении знаний о функционировании иммунной системы ребенка как здорового, так и имевшего риск передачи ВИЧ-инфекции от матери. Исследования подтверждают важность не только возрастного, но и полового деления детей в ходе оценки их иммунного статуса. В результате проведенной работы получены региональные возрастные нормативы, позволяющие проводить сравнительный анализ CD-фенотипа лимфоцитов крови в соответствии с мировыми стандартами. Проведенный сравнительный анализ клеточного состава крови детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, позволяет разработать качественно новые критерии мониторинга иммунной системы при риске вертикальной передачи ВИЧ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bartlett J.A., Schleifer S.J., Demetrikopoulos M.K., Delaney B.R. et al. Immune function in healthy adolescents // *Clin. Diagn. Immunol.* — 1998. — Vol. 5. — P. 105–113.
2. Chin S.F., Cheong S.K., Lim Y.C., Ton S.H. The distribution of immunoregulatory cells in the peripheral blood of normal Malaysian adults // *J. Patol.* — 1993. — Vol. 15. — P. 49–52.
3. Chng W.J., Tan G.B., Kuperan P. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry influence of age, sex, and race and comparison with other published studies // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2004. — Vol. 11, N 1. — P. 168–173.
4. Choong M.L., Ton S.H., Cheong S.K. Influence of race, age and sex on the lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy Malaysian adults // *Ann. Clin. Biochem.* — 1995. — Vol. 32. — P. 532–539.
5. Denny T., Yorgev R., Gelman R., Skuza C. et al. Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life // *JAMA* — 1992. — Vol. 267. — P. 1481–1488.
6. Erkeller-Yuksel F.M., Deneys V., Yuksel B., Hanne I. et al. Age-related change in human blood lymphocyte subpopulation // *J. Pediatr.* — 1992. — Vol. 120. — P. 216–222.
7. Kam K.M. Maturation changes in peripheral lymphocyte subsets pertinent to monitoring human immunodeficiency virus-infected Chinese pediatric patients // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2001. — Vol. 8, N 5. — P. 926–931.
8. Kam K.M., Leung W.L., Kwork M.Y., Hung M.Y. et al. Lymphocyte subpopulation reference ranges for

monitoring human immunodeficiency virus-infected Chinese adult // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 1996. — Vol. 3. — P. 326–330.

9. Lee B.W., Yap H.K., Chew F.T., Quah T.C. et al. Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy Asian subjects from birth to adult // *Cytometry.* — 1996. — Vol. 26. — P. 8–15.

10. Likanonsakul S. The reference range of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in healthy non-infected infants born to HIV-1 seropositive mothers; a preliminary study at Siriraj Hospital // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.* — 1998. — Vol. 29, N 3. — P. 453–463.

11. Melvin A.J., Mohan K.M. Response to immunization with measles, tetanus, and haemophilus influenzae type b vaccines in children who have human immunodeficiency virus type 1 infection and are treated with highly active antiretroviral therapy // *Pediatrics.* — 2003. — Vol. 111, N 6. — P. 641–644.

12. Peckham C., Gibb D. Mother-to-child transmission of the human immunodeficiency virus // *N. Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 333, N 5. — P. 298–302.

13. Peckham C., Newell M.L. Preventing vertical transmission of HIV infection // *N. Engl. J. Med.* — 2000. — Vol. 343, N 14. — P. 1036–1037.

14. Prince H.E., Hirju K., Waldbeser L.S., Plaeger-Marchal S. et al. Influence of racial background on the distribution of T cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy donors // *Diagn. Immunol.* — 1985. — Vol. 3. — P. 33–37.

15. Quozi A.A., Salamah A.A., Rasheed R.A., Musalam A.A. et al. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes in Saudi men // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2002. — Vol. 9. — P. 279–281.

16. Reichert T., DeBruyere M., Deney V., Totterman T. et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasian // *Clin. Immunol. Immunopathol.* — 1991. — Vol. 60. — P. 190–208.

17. Rudy B.J. Peripheral blood lymphocyte subsets in adolescents: a longitudinal analysis from the REACH project // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2002. — Vol. 9, N 5. — P. 959–965.

18. Santagostino A., Gargassio G., Pistorio A., Bolis V. et al. An Italian national multicenter study for definition of a reference range for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults // *Haematologia.* — 1999. — Vol. 84. — P. 499–504.

19. Shahabuddin S. Quantitative differences in CD8-lymphocytes, CD4/CD8 ratio, NK cells, and HLA-DR – activated T cells of racially different male populations // *Clin. Immunol. Immunopathol.* — 1995. — Vol. 76. — P. 168–170.

20. Shearer W.T. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The pediatric AIDS clinical trials group P1009 study // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2003. — Vol. 112, N 5. — P. 973–980.

21. Tollerud D.J., Clark J.W., Brown L.M., Neuland C.Y. et al. The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy non-smokers // *J. Clin. Immunol.* — 1989. — Vol. 9. — P. 214–222.

22. Tollerud D.J., Ildstad S.T., Brown L.M., Clark J.W. et al. T-cell subsets in healthy teenagers: transition to the adult phenotype // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1990. — Vol. 56. — P. 88–96.
23. Webster H.K., Pattanapanyasat K., Phanupak P., Wasi C. et al. Lymphocyte immunophenotype reference range in healthy Thai Adults: implications for management of HIV/AIDS in Thailand // South-east Asian J. Trop. Med. Public Health. — 1996. — Vol. 27. — P. 418–429.
24. Wiener D.S., Shah S., Malone J., Lowell N. et al. Multiparametric analysis of peripheral blood in normal pediatric population by flow cytometry // J. Clin. Lab. Anal. — 1990. — Vol. 4. — P. 175–179.

Сведения об авторах

Бахметьев Борис Аркадьевич – заведующий лабораторией экологической иммунологии ИЭГМ УрО РАН, кандидат медицинских наук, доцент (614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13; тел. 8-9127896451; e-mail: bachmetyev@iegm.ru)

Зверев Сергей Яковлевич – заведующий диагностической лаборатории Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, доктор медицинских наук

Калашникова Надежда Сергеевна – врач клинко-диагностической лаборатории Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, кандидат биологических наук

Ключникова Лариса Вадимовна – заведующий клинко-диагностической лаборатории Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями

Г.М. Бодиевкова, Р.Ю. Алексеев

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ
ИММУННОГО ОТВЕТА РАБОТАЮЩИХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
ВИНИЛХЛОРИДА****Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (Ангарск)**

Проведено лабораторно-иммунологическое обследование работающих мужчин в производстве винилхлорида. Установлено, что более выраженное напряжение компенсаторно-приспособительных реакций наблюдается у лиц с начальными проявлениями нейроинтоксикации («группы риска») относительно «практически здоровых». С увеличением дозовой нагрузки винилхлоридом, продолжительности (стажа) воздействия, а также повышением концентрацией винилхлорида в крови, выявлено усугубление изменений в системе иммунитета работающих. Установленные повышенные уровни ауто-АТ: к S-100, В-зав. Са-каналу и ДНК, по-видимому, могут свидетельствовать о ранних изменениях в определенных структурах нервной системы. Одними из ранних и чувствительных показателей, характеризующих формирование резистентности организма к неблагоприятным факторам производственной среды, являются: IgM, IL-1 β , TNF- α , IL-8, ауто-АТ к S-100, ауто-АТ к В-зав. Са-каналу, ауто-АТ к ДНК.

Ключевые слова: иммунореактивность, винилхлорид, дозовая нагрузка, работающие

**REGULARITIES OF COMPENSATORY-ADAPTIVE REACTIONS IMMUNE RESPONSE
OF WORKERS IN CHRONIC EXPOSURE TO VINYL CHLORIDE**

G.M. Bodienkova, R.Yu. Alexeyev

Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology ESSC HE SB RAMS, Angarsk

Laboratory and immunological study of male workers in the production of vinyl chloride was conducted. It has established that more pronounced stress of compensatory-adaptive reactions is observed in patients with incipient neurointoxication ("at risk") in comparison to group of "healthy". With increasing radiation exposure to vinyl chloride, duration (length of) exposure, as well as increasing the concentration of chloride in the blood, showed worsening of changes in the immune system of workers. Installed elevated levels of autoantibodies: the S-100, B-head. Ca-channel and the DNA appear to be indicative of early changes in certain structures of the nervous system. Some of the earliest and most sensitive indicators of the formation of body resistance to unfavorable working environment are: IgM, IL-1 β , TNF- α , IL-8, autoantibodies to S-100, autoantibodies to the B-head. Ca-channel, autoantibodies to DNA.

Key words: immunoreactivity, vinyl chloride, the dose load, workers

Химическая промышленность — одна из ведущих отраслей народного хозяйства — является научно-технической и материальной базой химизации народного хозяйства и играет исключительно важную роль в развитии производительных сил, укреплении обороноспособности государства и в обеспечении жизненных потребностей общества [2]. Одним из важных в народном хозяйстве веществ, получаемых химической промышленностью, является винилхлорид (ВХ) и получаемые из него изделия, сфера применения которых с каждым годом расширяется. Так, в настоящее время в России и во многих странах мира является востребованным производство винилхлорида, на котором многочисленные работающие подвергаются воздействию комплекса хлорированных углеводородов, преимущественно винилхлорида и дихлорэтана. И при длительном контакте с ВХ в условиях производства у работающих может развиваться профессиональная хроническая интоксикация винилхлоридом. ВХ оказывает комплексное токсическое воздействие на организм человека, вызывая поражение нервной системы, костной системы, системное поражение соединительной ткани, сердечно-сосудистой системы, оказывает канцеро-

генное, мутагенное и тератогенное действие [1, 5]. В современный период накоплены убедительные данные, свидетельствующие о том, что иммунная система во многом определяет устойчивость организма к воздействию производственных факторов, являясь важнейшей составляющей в комплексе компенсаторно-приспособительных механизмов. Как правило, ранние формы профессиональных поражений нервной системы у работающих могут оставаться клинически незаметными, что затрудняет в последующем обоснование профессиональных и профессионально обусловленных заболеваний. Однако, иммунные механизмы, лежащие в основе патогенеза профессиональной хронической интоксикации винилхлоридом к настоящему времени охарактеризованы недостаточно.

Целью работы явилось изучение компенсаторно-приспособительных реакций иммунного ответа работающих в производстве винилхлорида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено лабораторно-иммунологическое обследование 91 работающего (мужчины) в производстве винилхлорида на ОАО «Саянскхимпласт». В том числе 71 чел. — «практически здоровые»

(стаж работы — $13,7 \pm 0,8$ года, средний возраст — $38,9 \pm 1,2$ года) и 20 работающих, имеющих изменения в психоэмоциональной сфере и/или неврологические расстройства («группа риска») (средний стаж работы — $16,7 \pm 1,4$ года, средний возраст — $48,2 \pm 1,5$ года), установленных в ходе периодического медицинского осмотра. Группу контроля составили 47 практически здоровых мужчин, не имеющих в профессиональном маршруте контакта с веществами нейротропного действия. Концентрации иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG, IgE) и цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ , INF- α) определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем производства «Вектор Бест» г. Новосибирск, уровни аутоантител (ауто-АТ) к миелин-ассоциированному гликопротеину (MAG) с использованием тест-систем производства BÜHLMANN anti-MAG ELISA (Швеция), уровни нейротропных ауто-АТ класса IgG к белкам: NF-200, GFAP, S-100, ОБМ, вольтажзависимому Са-каналу (В-зав. Са-канал), глутаматным рецепторам (Глу-Р), дофаминовым рецепторам (DA-Р), ГАМК- рецептрорам (ГАМК-Р), серотониновым рецепторам (Сер-Р), холинорецепторам (АХ-Р), ДНК, $\beta 2$ гликопротеину ($\beta 2$ GP) с помощью набора ЭЛИ-Н-Тест МИЦ «Иммункулус» г. Москва. Расчет дозовой нагрузки винилхлоридом проводился в лаборатории медицины труда (руководитель — д.м.н. В.А. Панков). Концентрации ВХ в крови работающих определяли в лаборатории физико-химических методов исследования (зав. лабораторией — к.б.н. О.М. Журба). Работа выполнена с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации и была одобрена комитетом по биомедицинской этике ВСНЦ СО РАМН. Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 0.6», Stat-Soft inc., США (правообладатель лицензии Ангарский филиал ВСНЦ ЭЧ СО РАМН). Достоверность различий в группах оценивали с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни. Проводился корреляционный анализ с определением коэффициента корреляции Спирмена. Применяли общепринятый уровень значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований позволили выявить изменения в иммунной системе работающих. Так, у более половины «практически здоровых» работающих и лиц «группы риска» выявлено снижение IgM (в 75,51 и 66,66 % случаев соответственно). Повышенные уровни указанного показателя определены в 2,04 % случаев у «здоровых» работающих, а у лиц группы риска не определены. Концентрации IgM в пределах референтных значений обнаружены в 22,45 % случаев «практически здоровых» и в 33,34 % случаев в «группе риска». Обращает на себя внимание разнонаправленный характер изменений уровня IgG в сыворотке крови в обе-

их группах обследованных. Так, у «практически здоровых» работающих усиление продукции IgG в 22,44 %, снижение — в 38,77 % случаев, у лиц «группы риска» наблюдаются повышенные значения показателя в 5,55 % случаев, в то время как у половины обследованных наблюдается снижение указанного показателя. Что касается IgA, то у «практически здоровых» он снижен в 30,61 % случаев, в то время как у лиц «группы риска» в 16,66 % случаев. Если учесть тот факт, что хлорированные углеводороды обладают раздражающим действием на слизистые оболочки, то низкая концентрация IgA в крови может быть обусловлена не только снижением его продукции, но и переходом в секреты слизистых оболочек в повышенном количестве, учитывая, что IgA является одним из основных защитных факторов серозно-слизистых секретов [3]. Следует отметить и возрастание общего IgE у «практически здоровых» так и у лиц «группы риска» (в 46 и 45 % случаев соответственно), что может свидетельствовать о сенсibiliзирующем действии на организм хлорированных углеводородов. Кроме того, анализ средних уровней показал, что у «практически здоровых» работающих снижался IgM ($1,07 \pm 0,08$ мг/мл в контроле $2,03 \pm 0,12$ мг/мл, $p < 0,05$), IgA ($1,83 \pm 0,1$ мг/мл в контроле $2,07 \pm 0,12$ мг/мл, $p < 0,05$). У лиц «группы риска» снижался IgM ($0,98 \pm 0,1$ мг/мл) и компенсаторно возрастал IgG ($34,48 \pm 18,1$ мг/мл в контроле $10,63 \pm 0,31$ мг/мл, $p < 0,05$). Разнонаправленные изменения отдельных показателей у работающих свидетельствуют о различной степени выраженности адаптационных иммунных реакций организма.

Результаты оценки концентраций про- и противовоспалительных цитокинов у работающих в условиях воздействия хлорированных углеводородов позволили выявить провоспалительную направленность реакций, как у «практически здоровых» - повышение продукции IL-6 (в 4,2 раза), IL-8 (в 14,6 раза), TNF- α (в 4,9 раза), INF- α (в 4,6 раза), INF- γ (в 1,2 раза) так и у лиц «группы риска» IL-1 β (в 1,5 раза), IL-8 (в 17,4 раза), TNF- α (в 2,2 раза) и INF- γ (в 1,2 раза). Вместе с тем, отмечено снижение IL-2 у работающих, но более это выражено у лиц «группы риска» относительно «практически здоровых» и контроля, а также снижение противовоспалительного IL-4 в обеих группах. Гиперпродукция провоспалительных цитокинов у работающих может свидетельствовать о напряжении компенсаторно-приспособительных механизмов.

Известно, что клинические проявления винилхлоридной интоксикации проявляются преимущественно нарушениями в нервной системе [1]. При этом важную роль в патогенезе многих заболеваний нервной системы играют аутоиммунные механизмы. В связи с чем, нами исследованы уровни аутоантител (ауто-АТ) к различным нейротрофическим белкам. Установлено, что у лиц с начальными проявлениями нейроинтоксикации («группа риска») выявлено достоверное возрастание ауто-АТ к S-100 относительно группы «практически здоровых» работающих. Следует отметить,

что повышенные уровни ауто-АТ к S-100 указывают на изменения в структурах ЦНС, регулирующих эмоциональный статус и др. [4]. Одновременно у лиц «группы риска» достоверно повышались средние значения ауто-АТ к В-зав. Са-каналу. Повышение ауто-АТ к которому характерно для мозжечковой атаксии, бокового амиотрофического склероза и др. [4]. Выявленное повышение ауто-АТ к ДНК у лиц «группы риска», может свидетельствовать о неспецифической иммуноактивации. При этом установлена выраженная тенденция к увеличению в обеих группах уровней ауто-АТ к МАГ. Повышение уровней аутоАТ к S-100, В-зав. Са-каналам, ДНК при отсутствии патологических изменений следует расценивать, как защитный физиологический механизм.

Длительность воздействия, и в частности, стаж работы во вредных условиях труда, можно считать фактором риска формирования профессиональных и производственно обусловленных заболеваний, в том числе и изменений иммунологических показателей. Для выявления закономерностей развития иммунного ответа при различной продолжительности воздействия винилхлорида и дихлорэтана работающие были разделены на 3 стажевые группы: I группа — 5–9 лет; II группа — 10–14 лет; III группа — 15 и более лет. В результате исследования (табл. 1), выявлены изменения в иммунной системе в зависимости от продолжительности (стажа) работы, которые характеризовались снижением синтеза в гуморальном звене иммунитета- IgA, IgM в I стажевой группе, далее с увеличением стажа работы (10–14 лет) происходит незначительное повышение IgA, а также наблюдается более выраженное снижение IgM у высокостажированных

работающих относительно контроля. Достоверно высокие концентрации IgG определены у лиц со стажем 5–9 лет. При продолжающемся воздействии отмечено снижение IgG, но при этом его значения остаются выше контроля. Уровень IgE был высоким, но не достоверно. Заслуживает внимания факт изменений цитокинового баланса. А именно, возрастание уровня IL-1 β в 2,5 раза и TNF- α в 9,5 раз у длительно (5–9 лет) работающих в сравнении с контролем. Установлено снижение IL-1 β в II и III стажевой группе относительно I стажевой группы и контроля. Одновременно происходит понижение IL-2 и значительное повышение IL-8 во всех стажевых группах относительно контроля. Тогда как, IL-6 у работающих со стажем 10–14 и более 15 лет был ниже по сравнению с работающими 5–9 лет, но выше контроля. Вместе с тем, в I стажевой группе происходит снижение противовоспалительного IL-4 по сравнению с контролем и снижение во II стажевой группе (10–14 лет) относительно работающих со стажем 5–9 лет и контроля, так у высокостажированных наблюдается повышение указанного показателя относительно II стажевой группы. Кроме того, следует отметить, изменения в интерфероновом статусе работающих, так обнаружен повышенный уровень INF- α во всех 3 стажированных группах относительно контроля, который достиг максимальных уровней у высокостажированных работающих. У работающих со стажем 5–9 лет и у высокостажированных INF- γ был выше по сравнению с контролем, а со стажем 10–14 лет ниже контроля. Что касается белка S-100 β , то выявлены повышенные уровни у высокостажированных работающих относительно работающих со стажем 5–9 лет.

Таблица 1
Изменения показателей иммунореактивности у работающих производства винилхлорида в зависимости от стажа работы ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	Стажевые группы					
		I (5–9 лет)		II (10–14 лет)		III (более 15 лет)	
IgA (мг/мл)	2,07 $\pm$ 0,12	1,71 $\pm$ 0,14 Δ	n = 29	1,78 $\pm$ 0,14 Δ , * II-I	n = 28	2,1 $\pm$ 0,21	n = 34
IgM (мг/мл)	2,03 $\pm$ 0,12	0,96 $\pm$ 0,1 Δ	n = 29	1,32 $\pm$ 0,1 Δ	n = 28	0,9 $\pm$ 0,08 Δ	n = 34
IgG (мг/мл)	10,6 $\pm$ 0,3	61,6 $\pm$ 21,2 Δ	n = 29	33,9 $\pm$ 16,1	n = 28	18,6 $\pm$ 7,1 Δ	n = 34
IgE (МЕ/мл)	60,2 $\pm$ 10,3	115,3 $\pm$ 29,7	n = 29	96,9 $\pm$ 16,9	n = 28	115,0 $\pm$ 25,8	n = 34
IL-1 β (пг/мл)	1,15 $\pm$ 0,4	2,94 $\pm$ 1,8 Δ	n = 29	0,35 $\pm$ 0,1 Δ , * II-I	n = 28	0,38 $\pm$ 0,15 Δ , * III-I, III-II	n = 34
IL-2 (пг/мл)	16,6 $\pm$ 2,5	3,9 $\pm$ 1,6 Δ	n = 29	2,9 $\pm$ 0,8 Δ	n = 28	1,8 $\pm$ 0,7 Δ	n = 34
IL-4 (пг/мл)	10,0 $\pm$ 3,0	4,7 $\pm$ 1,4 Δ	n = 29	1,9 $\pm$ 0,9 Δ , * II-I	n = 28	7,4 $\pm$ 1,7 Δ , * III-II	n = 34
IL-6 (пг/мл)	1,68 $\pm$ 0,4	15,2 $\pm$ 8,6	n = 29	5,4 $\pm$ 3,4 Δ , * II-I	n = 27	6,1 $\pm$ 2,4 * III-I	n = 34
IL-8 (пг/мл)	3,01 $\pm$ 0,5	51,6 $\pm$ 14,4 Δ	n = 29	36,0 $\pm$ 12,4 Δ	n = 27	49,3 $\pm$ 14,6 Δ	n = 34
INF- γ (пг/мл)	4,79 $\pm$ 2,3	7,4 $\pm$ 2,0 Δ	n = 29	2,8 $\pm$ 0,9 Δ	n = 28	7,0 $\pm$ 1,9 Δ	n = 34
INF- α (пг/мл)	2,9 $\pm$ 1,4	11,2 $\pm$ 2,4 Δ	n = 18	9,6 $\pm$ 1,9 Δ	n = 12	15,0 $\pm$ 2,6 Δ , * III-II	n = 34
TNF- α (пг/мл)	2,45 $\pm$ 0,7	23,4 $\pm$ 10,8 Δ	n = 29	3,5 $\pm$ 1,4 Δ	n = 28	5,5 $\pm$ 2,6 Δ	n = 34
S-100 β (нг/л)	66,4 $\pm$ 5,1	62,8 $\pm$ 13,6	n = 19	106,4 $\pm$ 19,2	n = 18	138,7 $\pm$ 25,7 * III-I	n = 34

Примечание: * – различия между стажевыми группами, Δ – различия по сравнению с контролем, статистически значимы при $p < 0,05$ –0,001.

Анализ полученных данных свидетельствует о зависимости изменений в иммунной системе у работающих от стажа работы во вредных условиях труда. С возрастанием продолжительности (стажа) воздействия нарастает напряжение компенсаторно-приспособительных механизмов.

Значительный интерес представляла также оценка взаимосвязи между дозовой нагрузкой винилхлоридом на работающих и изменением иммунологических показателей. В результате исследований установлено, что с увеличением дозовой нагрузки винилхлоридом происходит повышение у «практически здоровых» работающих белка S-100 β и аутоАТ к ОБМ ($r = 0,32$ при $p = 0,03$ и $r = 0,39$ при $p = 0,03$, соответственно) и снижение концентрации IL-8 в сыворотке крови, о чем свидетельствуют достоверные корреляционные связи ($r = 0,29$ при $p = 0,02$). В то время, как у лиц «группы риска» происходит рассогласование этих связей и появляется новая обратная связь с IL-1 β ($r = -0,49$ при $p = 0,02$). Так, с увеличением дозовой нагрузки винилхлоридом наблюдается усиление напряжения адаптивных процессов у работающих. Кроме того, нами проведено изучение зависимости между концентрацией винилхлорида в крови и иммунологическими показателями. Результаты позволили выявить у «практически здоровых» работающих обратные корреляционные связи между концентрацией винилхлорида в крови и IgG ($r = -0,24$ при $p = 0,04$), INF- γ ($r = -0,32$ при $p = 0,006$), INF- α ($r = -0,45$ при $p = 0,006$), ауто-АТ к ОБМ ($r = -0,40$ при $p = 0,02$) и прямые связи с IL-8 ($r = 0,31$ при $p = 0,009$), ауто-АТ к GFAP ($r = 0,40$ при $p = 0,02$). В то же время, у лиц «группы риска» изменяется направленность установленной связи между концентрацией ВХ в крови и INF- γ на прямую связь ($r = 0,36$ при $p = 0,03$) и появляется новая обратная связь с ауто-АТ к $\beta 2$ GP ($r = -0,36$ при $p = 0,03$). На основании чего, можно считать, что с увеличением винилхлорида в крови и дозовой нагрузки происходит более выраженное напряжение процессов адаптации в иммунной системе. Совокупность результатов

наших исследований, а также данные литературы, свидетельствуют, что наиболее ранними показателями, характеризующими состояние иммунорезистентности работающих, являются- IgM, IL-1 β , TNF- α , IL-8, ауто-АТ к S-100, ауто-АТ к ДНК и ауто-АТ к В-зав. Са-каналу.

Таким образом, заключая в целом полученные результаты, следует отметить, что более выраженное напряжение компенсаторно-приспособительных реакций наблюдается у лиц с начальными проявлениями нейроинтоксикации («группы риска») относительно «практически здоровых». С увеличением дозовой нагрузки винилхлоридом, продолжительности (стажа) воздействия, а также повышением концентрации винилхлорида в крови, выявлено усугубление изменений в системе иммунитета. Установленные повышенные уровни ауто-АТ: к S-100, В-зав. Са-каналу и ДНК, по-видимому, могут свидетельствовать о ранних изменениях в определенных структурах нервной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонюженко В.А. Винилхлоридная болезнь — углеводородный нейротоксикоз. — Горький: Волго-Вятское кн. изд-во, 1980. — 87 с.
2. Ивойлов В.М., Штернис Т.А. Условия жизни, состояние здоровья и медицинская активность работающих на химических производствах. — Кемерово, 2006. — 128 с.
3. Литовская А.В., Шмакова Т.В., Шипова Е.Е., Федотова И.В. Особенности иммунитета и эффективность иммунокоррекции у «пожилых работников» химической промышленности (на примере производства оргстекла) // Бюл. науч. совета «Медико-экологические проблемы работающих». — 2006. — № 3. — С. 38 — 44.
4. Полетаев А.Б. Новые подходы к раннему выявлению патологических изменений в организме человека: метод. рек. для врачей. — М., 2010. — 67 с.
5. Трошин В.В., Литовская А.В. Нейроиммунные механизмы хронизации профессиональных токсических энцефалопатий // Аллергология и иммунология. — 2004. — Т. 5, № 1. — С. 189.

Сведения об авторах

Бодиенкова Галина Михайловна — заведующая лабораторией иммунологии Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: (3955) 557-566; e-mail: immun11@yandex.ru, imt@irmail.ru)

Алексеев Роман Юрьевич — очный аспирант лаборатории иммунологии Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: (3955) 557-566; e-mail: rua84@yandex.ru, immun11@yandex.ru)

Г.М. Бодиенкова, С.И. Курчевенко

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
ПАРОВ МЕТАЛЛИЧЕСКОЙ РТУТИ НА РАБОТАЮЩИХ****Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (Ангарск)**

Проведено клинко-иммунологическое обследование работающих в условиях воздействия паров металлической ртути. Выявлены особенности изменений иммунного ответа работающих в зависимости от стадии развития нейротоксикации парами металлической ртути. Показана взаимосвязь изменений отдельных иммунологических параметров от дозовой нагрузки ртутью и содержания ее в крови и моче.

Ключевые слова: ртуть, работающие, иммунологическая реактивность

**CHANGE OF REGULARITIES OF IMMUNE RESPONSE IN WORKERS EXPOSED
TO METAL MERCURY VAPORS**

G.M. Bodienkova, S.I. Kurchevenko

Institute of Occupational Health and Human Ecology ESSC HE SB RAMS, Angarsk

The clinical-immunological examination of the employees working under conditions of the exposure to the metal mercury vapors has been performed. The change peculiarities of the immune responses have been revealed in the employees in dependence on the development stage of the neurointoxication with the metallic mercury vapors. The correlation between the changes of the individual immunological parameters associated with the dosed mercury load and its contents in the blood and urine has been indicated.

Key words: mercury, workers, immunological responsiveness

В настоящее время изучение воздействия ртути на организм человека остается весьма актуальной и приоритетной проблемой. Это обусловлено широким контактом работающих с ртутью, как в химической промышленности, так и в бытовой сфере. Известно, что ртуть, попадая в организм человека ингаляционным, пероральным и перкутантным путями, способна включаться во все виды обмена. Соединения ртути, обладая высокой реакционной способностью, являются универсальными ингибиторами многих ферментных систем, в результате чего изменяется белковый обмен, что обуславливает полиорганность ртутных поражений [1]. К числу структур организма, обладающих высокой чувствительностью к ртутной интоксикации относятся и иммунная система, которая по современному определению является индикаторной системой экологического неблагополучия и чутко реагирует на изменения окружающей среды [3]. Изменения в её деятельности могут приводить к нарушениям в работе других систем организма, усугублению текущего процесса, развитию осложнений, в основе которых лежат агрессивные иммунопатологические реакции.

Установлено, что ртуть и её соединения в больших дозах способна подавлять механизмы клеточного и гуморального иммунитета [5]. Вместе с тем, в клинических [2] и в экспериментах исследований показано, что присутствие даже малых концентраций ртути в организме может сопровождаться патологическими изменениями в органах и тканях и вызывать изменения иммунологических и биохимических процессов. Как правило, ранние формы профессиональных поражений нервной

системы у работающих могут оставаться клинически незаметными, что затрудняет в последующем обоснование профессиональных и профессионально обусловленных заболеваний. В последние десятилетия на основе иммунологических методов ведется активный поиск биомаркеров экспозиции, влияния и эффекта, показателей индивидуальной восприимчивости и устойчивости к воздействию вредных факторов производственной среды.

В связи с вышеизложенным, основной **целью работы** явилось выявление особенностей изменения иммунореактивности организма работающих при воздействии паров металлической ртути, а также зависимости изменения от дозовой нагрузки и содержания ртути в моче и в крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы мужчины, контактирующие в производственных условиях с парами металлической ртути ($n = 133$) со средним стажем работы — $11,33 \pm 0,59$ года, в возрасте от 21 до 60 лет (средний возраст — $36,2 \pm 0,9$ года). В том числе 56 рабочих со стажем работы в контакте с ртутью более 10 лет и/или наличием изменений в психоэмоциональной сфере и/или неврологических расстройств установленных врачами клиники института в ходе медицинского осмотра («группа риска»). А также 38 пациентов с установленным диагнозом хронической ртутной интоксикацией (ХРИ), находившихся на обследовании и лечении в клинике института. Все они ранее контактировали с парами металлической ртути, средний стаж работы их составил $15,7 \pm 1,7$ года (средний возраст — $46,0 \pm 1,4$ года).

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали методом непрямой поверхностной иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ), специфичных к маркерам CD3+ (зрелые Т-лимфоциты), CD4+ (Т-хелперы/индукторы), CD8+ (Т-супрессоры/цитотоксические клетки), CD16+ (натуральные киллеры), CD20+ (В-лимфоциты), CD25+ (активированные лимфоциты), CD95+ (лимфоциты с рецепторами к индукции апоптоза), HLA-DR (маркеры иммунокомпетентных клеток) («МедБио-Спектр», г. Москва). Иммуноглобулин А (IgA), IgM и IgG определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем производства «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Определение сывороточных цитокинов: интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), интерферона- γ (INF- γ) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа производства ООО «Протеиновый контур» (г. Санкт-Петербург). Дозовая нагрузка парами металлической ртути на рабочих основных профессий за годы работы рассчитана в лаборатории медицины труда Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН с учетом потребления объема воздуха за смену в зависимости от тяжести трудового процесса. Содержание ртути в цельной крови и моче определяли на анализаторе «Юлия-2» (погрешность $\pm 1,5$ мкг) в лаборатории физико-химических методов исследования (руководитель лаборатории — д.б.н., профессор В.Б. Дорогова).

Работа не ущемляет права и не подвергает опасности благополучия обследованных рабочих в соответствии с требованиями биомедицинской этики, предъявляемых Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000). Исследования выполнены с информированного согласия пациентов в Ангарском филиале ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН.

Обработка результатов исследования проводилась на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 0.6», Stat-Soft inc, США (правообладатель лицензии Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН). Определяли нормальность распределения количественных признаков. Для полученных данных рассчитывали среднее арифметическое значение (M) и его ошибку (m), достоверность различий средних оценивали с использованием критерия Стьюдента (при нормальном распределении). В случае отсутствия правильного распределения использовали непараметрические методы с помощью критерия Уилкоксона — Манна — Уитни, с указанием средних величин и стандартного отклонения, с учетом поправки Бонферрони. Для оценки взаимосвязи количественных признаков применяли коэффициенты корреляции Спирмана. Корреляционный анализ проводился с определением коэффициента линейной корреляции Спирмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка показателей иммунного статуса у работников, подвергающихся воздействию паров металлической ртути, позволила выявить изменения в клеточном и гуморальном звеньях иммунитета. У рабочих как «группы риска», так и пациентов с ХРИ наблюдается снижение в крови относительного содержания зрелых Т-лимфоцитов до $30,51 \pm 1,34$ и $29,34 \pm 2,30$ %, соответственно против $47,17 \pm 0,72$ % в контроле ($p < 0,001$) и Т-хелперов до $27,24 \pm 1,27$ и $30,21 \pm 2,08$ %, соответственно против $35,95 \pm 0,61$ % в контроле ($p < 0,05$). Заслуживает внимание факт значительного возрастания числа лимфоцитов с рецепторами позднего активационного апоптоза у рабочих «группы риска» до $23,13 \pm 1,38$ против $10,92 \pm 1,52$ % в контроле ($p < 0,001$) и лимфоцитов экспрессирующих HLA-DR до $24,67 \pm 1,40$ против $18,69 \pm 1,06$ % в контроле ($p < 0,001$). Повышение в периферической крови числа лимфоцитов, экспрессирующих CD95-антиген, может свидетельствовать об активации процессов индукции апоптоза лимфоцитов в условиях угнетения иммунной системы. Апоптоз в данном случае, по-видимому, следует рассматривать как механизм защиты организма от генетически измененных (аутореактивных) клеток. Однонаправленные, но более выраженные изменения указанных показателей наблюдаются у пациентов с установленным диагнозом ртутной интоксикации. Кроме того, у пациентов с ХРИ обнаружено достоверное повышение относительного количества натуральных киллеров до $26,47 \pm 2,51$ % ($20,60 \pm 0,45$ % в контроле, $p < 0,05$) и количества В-лимфоцитов до $25,65 \pm 1,62$ % ($19,94 \pm 0,53$ % в контроле, $p < 0,001$). При этом у лиц «группы риска» наблюдалась лишь тенденция к их возрастанию. Сравнительный анализ показателей клеточного иммунитета у лиц «группы риска» и пациентов с ХРИ позволил установить однонаправленный характер изменений отдельных изучаемых параметров. Вместе с тем, следует отметить более выраженный дисбаланс в системе иммунитета у пациентов с ХРИ.

Что касается гуморального звена иммунного ответа, то в группе здоровых работающих наблюдается увеличение содержания сывороточного иммуноглобулина IgA до $7,36 \pm 2,09$ мг/мл (в контроле $2,07 \pm 0,12$ мг/мл, $p < 0,001$), а у лиц «группы риска» и больных с ХРИ выявлено снижение его концентрации до $1,33 \pm 0,11$ и $1,40 \pm 0,21$ мг/мл, соответственно ($p < 0,05$). Низкая концентрация IgA в крови, по-видимому, может быть обусловлена не только снижением его продукции, но и переходом в секреты слизистых оболочек в повышенном количестве. Обращает на себя внимание достоверное снижение IgM во всех группах обследованных как в «группе риска» до $0,65 \pm 0,06$ мг/мл, так и пациентов с ХРИ до $0,67 \pm 0,08$ мг/мл относительно контроля ($2,03 \pm 0,12$ мг/мл, $p < 0,05$). Что касается IgG, то достоверных различий между сравниваемыми группами не обнаружено. При анализе уровней иммуноглобулинов в обследуемых группах

установлен их дисбаланс как в «группе риска», так и пациентов с ХРИ.

Учитывая, что цитокины с одной стороны, выполняют защитную функцию, а с другой — участвуют в патогенезе многих заболеваний [5], нами проведена оценка цитокинового профиля у обследованных групп. У рабочих в «группе риска» выявлено возрастание сывороточных концентраций провоспалительных цитокинов IL-1b (до $176,69 \pm 59,56$ против $20,81 \pm 2,83$ пг/мл в контроле; $p < 0,001$), IL-2 (до $97,62 \pm 36,06$ пг/мл, в контроле $16,20 \pm 6,31$ пг/мл; $p < 0,001$), TNF- α (до $102,18 \pm 31,94$ пг/мл, в контроле $15,21 \pm 1,80$ пг/мл; $p < 0,001$), противовоспалительного IL-4 (до $62,32 \pm 10,83$ пг/мл, в контроле $10,01 \pm 3,04$ пг/мл; $p < 0,05$) и снижение INF- γ (до $7,41 \pm 1,91$ пг/мл, в контроле $25,25 \pm 5,35$ пг/мл; $p < 0,001$). У пациентов с ХРИ относительно «группы риска», подвергающихся воздействию паров металлической ртути, наблюдается снижение провоспалительных цитокинов IL-1 β (до $133,21 \pm 28,9$ пг/мл, $p < 0,05$), IL-6 (до $3,68 \pm 1,19$ пг/мл, $p < 0,05$), TNF- α (до $42,1 \pm 11,3$ пг/мл, $p < 0,05$) с тенденцией к повышению IL-2 (до $127,75 \pm 33,56$ пг/мл) и снижению противовоспалительного цитокина IL-4 (до $21,60 \pm 3,27$ пг/мл, $p < 0,05$). Усиленная продукция цитокинов способствует защите организма и желательна на начальных этапах воспаления, однако положительная роль этого процесса становится проблематичной в тот момент, когда степень активации перестает быть адекватной и первоначально защитный механизм перерастает в патологический процесс.

На следующем этапе наших исследований нами предпринята попытка выявить зависимость между изменением иммунологических показателей от наличия или отсутствия ртути в биосубстратах (кровь, моча) у обследованных групп. У лиц «группы риска» при увеличении содержания ртути в моче происходит увеличение сывороточных концентраций IL-2 и TNF- α и снижение IgA, о чем свидетельствуют прямые корреляционные связи ($r = 0,29$; $p < 0,05$ и $r = 0,33$; $p < 0,05$, соответственно) и обратная корреляционная связь ($r = -0,28$; $p < 0,05$). Кроме того, увеличение концентрации ртути в крови сопряжено со снижением сывороточной концентрации IgA ($r = -0,43$; $p < 0,05$). У пациентов с ХРИ возрастание содержания ртути в моче коррелирует со снижением количества клеток CD4 ($r = -0,37$; $p < 0,05$), CD8 ($r = -0,48$; $p < 0,05$) и CD16 ($r = -0,42$; $p < 0,05$), с одновременным повышением сывороточной концентрации IL-1 β ($r = 0,41$; $p < 0,05$). Наличие ртути в крови сопровождается гиперпродукцией IL-1 β ($r = 0,42$; $p < 0,05$). Полученные данные, по-видимому, могут

свидетельствовать о непосредственном иммунотоксическом действии ртути на иммунокомпетентные клетки.

Значительный интерес представляла также оценка изменений иммунных показателей в зависимости от дозовой нагрузки на работающих паров металлической ртути. Следует отметить, что последняя дополнительно характеризует интенсивность влияния химического фактора. Проведенные исследования показали, что у работающих подвергающихся воздействию ртути с повышением дозовой нагрузки происходит снижение содержания сывороточного IgM, о чем свидетельствует обратная корреляционная связь ($r = -0,25$; $p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, воздействие паров металлической ртути способствует выраженному изменению иммунологической реактивности работающих. Развитие профессиональной нейротоксикации сопровождается увеличением количества лимфоцитов, экспрессирующих маркеры поздней (CD95+ и HLA-DR+) и ранней (CD25+) стадии активации на фоне выраженной иммуносупрессии. Гиперпродукция IL-1 β , IL-2, TNF- α на ранних этапах развития ртутной интоксикации (в «группе риска») свидетельствует о напряжении компенсаторно-приспособительных механизмов. Снижение сывороточных концентраций указанных цитокинов у пациентов с ХРИ свидетельствует о дисрегуляции в системе иммунитета, что, может, способствовать поддержанию патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. — М., 1991. — С. 393—397.
2. Андреева О.К., Колесов В.Г., Лахман О.Л. Неврологические аспекты отдаленного периода хронической ртутной интоксикации // Профессия и здоровье: материалы I Всерос. конгр. — М., 2002. — С. 129—130.
3. Сакиева К.Ж. Пути профилактики и лечения отрицательного действия факторов окружающей среды нефтегазоносного региона на организм // Вестн. Рос. ун-та Дружбы народов. — 2003. — № 1. — С. 120—125.
4. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Особенности продукции фактора некроза опухоли α при туберкулезе легких и внелегочной локализации // Цитокины и воспаление. — 2010. — Т. 9, № 1. — С. 45—48.
5. Toro J.R., Finlay D., Dou X. Detection of type 1 cytokines in discoid lupus erythematosus // Arch. Dermatol. — 2000. — Vol. 136, N 12. — P. 1497—1501.

Сведения об авторах

Бодиенкова Галина Михайловна — заведующая лабораторией иммунологии Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (665827, г. Ангарск, 12-а мр/н, д. 3; тел.: (3955) 55-75-66, 55-40-92; e-mail: immun11@yandex.ru; imt@irmail.ru)

Курчевенко Светлана Ивановна — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии Ангарского филиала ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН (665827, г. Ангарск, 12-а мр/н, д. 3; тел.: (3955) 55-75-66; e-mail: immun11@yandex.ru; svetlanakurchenko@mail.ru)

А.Г. Борисов, А.А. Савченко

ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ В

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)

Исследованы иммунологические показатели у больных острым (ОВГВ) и хроническим вирусным гепатитом В. Установлено, что по изменениям величин иммунологических показателей можно определить характер течения инфекционного процесса при хроническом вирусном гепатите В и выделить, по меньшей мере, два типа иммунного ответа. Первый тип (гиперэргический) характеризуется повышенными значениями иммунологических показателей, определяется увеличением содержания $CD3^+$ -лимфоцитов с дисрегуляцией в субпопуляционном составе Т-клеток и увеличением показателей гуморального звена иммунитета. Второй (гипоэргический) — снижением числа Т-клеток, $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов и различных типов иммуноглобулинов. При ОВГВ развитие острого инфекционного процесса сопряжено со снижением числа Т-лимфоцитов, в основном за счет популяции $CD4^+$ -лимфоцитов, увеличением концентрации иммуноглобулинов и ЦИК, что также свидетельствует о гипоэргическом типе иммунного ответа при острой вирусной инфекции.

Ключевые слова: гепатит, лимфоциты, иммуноглобулины

FEATURES OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN ACUTE AND CHRONIC VIRAL HEPATITIS B

A.G. Borisov, A.A. Savchenko

Research Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk

We investigated immunological parameters in patients with acute (AVHB) and chronic hepatitis B. It is established that changing the values of immunological parameters can determine the nature of the infection course in chronic viral hepatitis B and select at least two types of immune response. The first type (hyperergic) is characterized by high values of immunological indicators, determined by increasing the content of $CD3^+$ -lymphocytes with a dysregulation in the subpopulation of T-cells and an increase in humoral immunity. The second (hypoergic) — decrease in the number of T-cells, $CD4^+$ - and $CD8^+$ -lymphocytes, and various types of immunoglobulins. When AVHB development of acute infection is associated with a reduction in the number of T-lymphocytes, mainly due to the population of $CD4^+$ -lymphocytes, increased concentration of immunoglobulins and the CIC, which also indicates the hypoergic type of immune response in acute viral infection.

Key words: hepatitis, lymphocytes, immunoglobulins

Широкое распространение вирусных гепатитов, их преимущественно хроническое течение с исходом в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному представляет собой серьезную проблему здравоохранения любой страны. Ежегодно в мире от гепатитов умирает около 2 млн. человек [1, 5, 14].

Несмотря на значительный прогресс в изучении этиологии и патогенеза хронических вирусных заболеваний печени, многие вопросы, касающиеся механизмов развития патологического процесса и его прогрессирования, остаются открытыми. Рассматривая процесс цитолиза гепатоцитов как основной составляющей патогенеза гепатитов не вызывает сомнения, что хронические вирусные поражения печени являются иммуноопосредованным состоянием, зависящим от репликативной активности вируса и реакций иммунной системы на этот вирус [4, 6, 11, 12]. Тип этого взаимодействия определяется свойствами микро- и макроорганизма, генетически детерминированными и модифицированными под влиянием различных факторов внешней среды (степень антигенной чужеродности вируса, его репликативная активность и цитотоксическое действие и др.), а также условиями, при которых это взаимодействие происходит (путь за-

ражения, доза вируса, подавление или активация иммунокомпетентных клеток и др.). При этом, иммунная система может являться как защитой, так и повреждающим фактором гепатоцитов [7, 9].

Многочисленные морфологические и иммуногистохимические исследования показали наличие в портальных и перипортальных фокальных очагах некроза большое количество НК-клеток, макрофагов, цитотоксических лимфоцитов, что свидетельствует об аутоагрессии [7, 13]. Это также подтверждается тем, что при вирусных гепатитах происходит сенсibilизация Т-лимфоцитов к различным белковым субстанциям гепатоцитов, угнетение супрессорной активности Т-лимфоцитов, сопровождающееся активацией цитотоксических клеток и прогрессированию цитолитических процессов в печени с инициацией аутоиммунных реакций.

Существенное место в патогенезе гепатитов принадлежит циркулирующим иммунным комплексам (ЦИК). Патогенное действие ЦИК связано с их способностью активировать систему комплемента, кининовую систему, факторы свертывания крови и другие противовоспалительные элементы, что усугубляет развитие воспалительной реакции в зоне локализации вирусных антигенов или ас-

социированных с вирусными белками гепатоцитов. Благодаря наличию на клетках гепатоцитов рецепторов к FC-фрагменту иммуноглобулинов, ЦИК фиксируются на гепатоцитах, эндотелии сосудов, усугубляя как воспалительный процесс в печени, так и внепеченочные поражения (артриты, васкулиты и др.). Повышение содержания ЦИК у больных гепатитами отмечает целый ряд исследователей [1, 8, 15]. Высокий уровень ЦИК у больных с хроническими заболеваниями печени вирусной этиологии обусловлен не только активацией иммунного ответа на вирусные антигены, но и снижением механизма их элиминации. Последнее связано с ослаблением функции клеток моноцитарно-макрофагальной системы — клеток, элиминирующих иммунные комплексы [3]. Для больных гепатитами вирусной этиологии также характерно повышение всех классов иммуноглобулинов. Выявлена корреляция между уровнем иммуноглобулина А и тяжестью процесса.

В связи с этим, **целью** исследования явилось сравнительное изучение особенностей иммунологических показателей при остром и хроническом вирусном гепатите В.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 77 больных острым вирусным гепатитом В (ОВГВ) и 89 больных с хронически вирусным гепатитом В (ХВГВ). Диагноз ОВГВ и ХВГВ устанавливался при помощи стандартных клинико-биохимических методов и верифицировался обнаружением с помощью иммуноферментных методов специфических маркеров — HBsAg, HBeAg, специфических иммуноглобулинов G и M к HBeAg, общих антител к HBeAg и вирусной ДНК. Из обследования исключались лица, инфицированные другими вирусами гепатитов и вирусом иммунодефицита человека. В качестве контроля обследовано 215 здоровых людей.

При обследовании пациентов до лечения и в процессе наблюдения проводилась клиническая оценка состояния иммунной системы, выявлялись проявления дисфункции печени, проведены лабораторные исследования.

Выделение общей фракции лимфоцитов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фикола-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD19. Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный ($CD4^+ / CD8^+$) и индекс относительного содержания В- и Т-лимфоцитов (лейкоциты/ $CD19^+$ и лейкоциты/ $CD3^+$). Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови определяли методом иммунодиффузии по Манчини [10]. Состояние гуморального иммунитета дополнительно характеризовали уровнем относительного синтеза IgA ($IgA / CD19^+$), IgM ($IgM / CD19^+$) и IgG ($IgG / CD19^+$)

[2]. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови изучали методом селективной преципитации в полиэтиленгликоле.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинской Декларации (2001).

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ иммунологических данных у больных ОВГВ и ХВГВ показал значительное разнообразие данных. Так уже в общем анализе крови у 22 больных ОВГВ (28,6 %) и у 18 (20,2 %) больных ХВГВ выявлен лейкоцитоз. Но в то же время у 14 больных ОВГВ (18,2 %) и у 21 больных ХВГВ (23,6 %) нами определено снижение числа лейкоцитов. Т.е. практически у половины больных ОВГВ и ХВГВ определяется изменения общего числа лейкоцитов.

Аналогичные изменения определяются и при определении абсолютного числа лимфоцитов. Лимфоцитоз выявлен в 16,9 % случаях при ОВГВ и в 24,7 % при ХВГВ. Статистически чаще определяется лимфопения при ОВГВ (40,3 %), при ХВГВ лимфопения выявлена реже (20,2 %) ($p < 0,01$). Большое количество больных с лимфопенией дает и достоверное снижение числа лимфоцитов у больных ОВГВ по сравнению с контрольной группой и группой пациентов с ХВГВ (табл. 1). По-видимому, именно с наличием острого инфекционного процесса при ОВГВ и можно объяснить развитие лимфопении. Т.е. развитие острого инфекционного процесса вызванного вирусом гепатита В связано с неадекватной реакцией иммунитета, а именно со снижением пролиферации основных клеток иммунной системы — лимфоцитов.

Помимо снижения общего числа лимфоцитов при ОВГВ определяется снижение числа Т-лимфоцитов и увеличение В-лимфоцитов. Снижение уровня общих Т-лимфоцитов развивается на фоне понижения количества $CD4^+$ -лимфоцитов, но при увеличении относительного числа $CD8^+$ -лимфоцитов, что отражает основной патогенетический процесс развития вирусной инфекции — клеточный ответ и формирование пула цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$ -клеток).

При сравнении иммунологических показателей больных ХВГВ с показателями больных ОВГВ и с контрольными параметрами не выявлено снижение числа $CD3^+$ -лимфоцитов. Однако статистически достоверно уменьшается число В-лимфоцитов. При ХВГВ необходимо отметить значительные изменения в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов: снижение относительного и абсолютного содержания $CD8^+$ -лимфоцитов. За счет количественного перераспределения субпопу-

Таблица 1

Состояние популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных ОВГВ и ХВГВ (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль n = 215		ОВГВ n = 77		ХВГВ n = 89	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,70	4,80–7,25	6,40	5,20–7,40	5,95	4,90–7,10
Лимфоциты, %	36,0	29,0–42,0	28,0	23,0–35,0	37,0	29,0–45,0
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2,05	1,55–2,63	1,70	1,26–2,27	2,15	1,63–2,65
			$p_1 < 0,01$		$p_2 < 0,01$	
CD3 ⁺ , %	64,0	57,0–70,0	60,0	56,0–70,0	60,0	54,0–68,5
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	1,27	0,96–1,74	1,03	0,82–1,47	1,29	0,97–1,59
			$p_1 < 0,01$		$p_2 < 0,02$	
CD4 ⁺ , %	37,0	30,0–45,0	34,0	26,0–40,0	35,0	27,0–42,0
			$p_1 < 0,01$			
CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,72	0,50–1,05	0,52	0,37–0,77	0,68	0,49–0,99
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,01$	
CD8 ⁺ , %	25,0	19,0–32,0	28,0	24,0–34,0	19,0	15,0–28,0
			$p_1 < 0,01$		$p_1 < 0,001$	
CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,50	0,34–0,75	0,49	0,35–0,70	0,43	0,32–0,59
					$p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,47	1,08–1,88	1,15	0,86–1,50	1,81	1,11–2,63
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$	
Лейкоциты/CD3 ⁺	4,52	3,55–5,77	5,38	4,46–6,94	4,48	3,76–5,74
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
CD19 ⁺ , %	11,0	7,0–14,0	19,0	14,0–23,0	8,0	4,0–10,0
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$	
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,21	0,14–0,33	0,27	0,22–0,45	0,13	0,07–0,26
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$	
Лейкоциты/CD19 ⁺	17,0	14,0–21,0	19,84	14,62–27,78	40,56	25,29–64,58
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$	

Примечание: p_1 – статистически достоверные различия с контрольными величинами; p_2 – статистически достоверные различия между показателями больных ОВГВ и ХВГВ.

ляций Т-лимфоцитов при ОВГВ и ХВГВ происходит разнонаправленное изменение величины соотношения CD4⁺/CD8⁺: при ОВГВ – снижение, при ХВГВ – увеличение. Также необходимо отметить, что наиболее наглядно количественные изменения Т- и В-лимфоцитов определяются при определении индексов их относительного содержания. Соответственно при ОВГВ они составили 5,83 и 19,84, при ХВГВ – 4,48 и 40,56. Эти показатели более наглядно свидетельствуют о том, что при ОВГВ происходит снижение числа Т-лимфоцитов с увеличением В-лимфоцитов, а при ХВГВ наоборот происходит снижение В-лимфоцитов, что отражает особенности развития острой и хронической инфекции.

Учитывая полученные результаты, значительный интерес представляет индивидуальное рассмо-

трение показателей клеточного звена иммунной системы. Так, при ОВГВ в 41,6 % случаях выявлено снижение количества CD3⁺-лимфоцитов, в 45,5 % понижение содержания CD4⁺-лимфоцитов и, соответственно, у 45,5 % больных индекс CD4⁺/CD8⁺ был ниже 1,08. При этом у 48,1 % больных установлено увеличение числа В-лимфоцитов. Т.е. практически у половины больных ОВГВ индивидуально выявляются признаки нарушения пролиферации Т-клеток за счет количества CD4⁺-лимфоцитов.

При ХВГВ изменения не такие однонаправленные. Увеличение содержания CD3⁺-лимфоцитов определено у 16,9 % больных, уменьшение – у 22,5 %. Увеличение количества CD4⁺-лимфоцитов установлено у 21,4 % больных ХВГВ, снижение – у 24,7 %. За счет различного распределения больных

Таблица 2

Состояние гуморального иммунитета у больных ОВГВ и ХВГВ (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль n = 215		ОВГВ n = 77		ХВГВ n = 89	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Ig A, г/л	1,80	1,31–2,70	3,30	2,70–4,20	2,10	1,42–3,17
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
Ig M, г/л	1,25	0,77–1,83	2,00	1,50–2,40	1,78	1,14–2,31
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	
Ig G, г/л	11,85	8,80–15,43	16,00	12,80–18,10	13,50	9,76–17,44
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,05$	
Ig A/CD19 ⁺ , нг/клетку	9,71	5,24–20,72	11,03	8,38–17,61	18,54	9,15–33,05
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$	
Ig M/CD19 ⁺ , нг/клетку	7,49	3,37–18,01	6,67	4,34–9,92	13,15	7,66–25,77
					$p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$	
Ig G/CD19 ⁺ , нг/клетку	63,52	36,31–126,76	53,16	37,04–75,15	120,43	55,98–207,66
			$p_1 < 0,05$		$p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$	
ЦИК, о.е.	28,0	15,0–42,0	34,0	20,0–110,0	49,0	28,0–94,0
			$p_1 < 0,01$		$p_1 < 0,001$	

Примечание: то же, что и для табл. 1.

ХВГВ с содержанием CD8⁺-клеток (увеличение содержания у 14,6 % и снижение — у 30,3 %) чаще регистрируются больные с повышением величины соотношения CD4⁺/CD8⁺ (44,9 %), тогда как понижение величины обнаружено у 22,5 % пациентов. Несмотря на то, что у больных ХВГВ выявлено статистически достоверное снижение количества CD19⁺-лимфоцитов, индивидуальное понижение обнаружено только у 18 больных (20,2 %). Полученные результаты подтверждают концепцию о различных механизмах формирования ХВГВ. При индивидуальном анализе иммунограмм возможно выделить группу больных ХВГВ с гиперэргической (увеличение числа Т-клеток, CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов) и гипозэргической (снижение вышеуказанных параметров) реакцией, что предполагает различные подходы к лечению ХВГВ.

Изменения при ОВГВ и ХВГВ выявляются и в гуморальном звене иммунной системы (табл. 2). При ОВГВ и ХВГВ установлено увеличение концентрации IgA, IgM, IgG и ЦИК. Кроме того, у больных ОВГВ обнаружено повышение уровней синтеза IgA и IgG относительно контрольных значений, в то время как при ХВГВ статистически достоверно повышаются уровни относительного синтеза всех исследуемых классов иммуноглобулинов как относительно контрольных диапазонов, так и значений, выявленных у больных ОВГВ. Такое увеличение иммуноглобулинов при ХВГВ характерно для сформировавшегося хронического процесса.

Однако, рассматривая показатели гуморального иммунитета индивидуально, как и при исследовании клеточного звена иммунитета обнаружены некоторые различия с выборочными параметрами. Так при ОВГВ у 72,7 % больных установлено повы-

шение концентрации IgA, у 57,1 % пациентов — повышение уровня IgM и у 52,0 % — повышение содержания IgG. Снижение данных показателей встречается значительно реже: у 1,3 %, 1,3 % и 7,8 % больных соответственно. Такое увеличение концентрации иммуноглобулинов соответствует гуморальному иммунному ответу, который формируется при острой вирусной инфекции.

В группе больных с ХВГВ распределение в показателях гуморального иммунитета не соответствует изменениям у больных с ОВГВ. В 36,0 % определяется повышение количества IgA, в 22,5 % — снижение. Повышение концентрации IgM выявляется при ХВГВ в 48,3 % случаев, снижение — в 9,0 %. Повышение содержания IgG установлено у 38,2 % пациентов с ХВГВ, снижение — у 21,3 % больных. Т.е. как и при анализе клеточного звена иммунитета можно выделить две группы: группу с гиперэргическими реакциями и группу с гипозэргическими реакциями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по изменениям величин иммунологических показателей можно характеризовать характер течения инфекционного процесса при хроническом вирусном гепатите В и выделить по данным иммунограммы по меньшей мере два типа иммунного ответа. Первый тип — гиперэргический — характеризуется повышенными значениями иммунологических показателей (увеличение содержания CD3⁺-клеток с дисрегуляцией в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов и повышением показателей гуморального звена иммунитета). Второй — гипозэргический характеризуется снижением числа Т-клеток, CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов и различных ти-

пов иммуноглобулинов. При ОВГВ развитие острого инфекционного процесса сопряжено со снижением числа Т-лимфоцитов, в основном за счет популяции CD4⁺-лимфоцитов, увеличением концентрации иммуноглобулинов и ЦИК, что так же свидетельствует о гипоэргическом типе иммунного ответа при острой вирусной инфекции. Полученные данные позволяют рекомендовать широкое применение исследования иммунной системы при вирусных гепатитах с целью характеристики развития патологического процесса, более точного определения лиц с различными типами реакции особенно при ХВГВ, что должно послужить основанием для дифференциального подхода к лечению данных пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болезни печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей / под ред. В.Т. Ивашкина. — М.: ООО Издат. дом М-Вести, 2002. — 416 с.
2. Земсков А.М., Земсков В.М. Дополнительные методы оценки иммунного статуса // Клин. лаб. диагностика. — 1994. — № 3. — С. 34—35.
3. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: рук. для врачей / под ред. В.А. Козлова. — Новосибирск: Наука, 2009. — 274 с.
4. Araujo N.M., Vianna C.O., Moraes M.T., Gomes S.A. Expression of Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) from genotypes A, D and F and influence of amino acid variations related or not to genotypes on HBsAg detection // Braz. J. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 13, N 4. — P. 266—271.
5. Chen C.J., Yang H.I., Su J. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level // JAMA. — 2006. — Vol. 295, N 1. — P. 65—73.
6. Ploeje U.H., Yangm J., Su J. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load // Gastroenterology. — 2006. — Vol. 130, N 3. — P. 678—686.
7. Kallenberg C.G., Tadema H. Vasculitis and infections: contribution to the issue of autoimmunity reviews devoted to «autoimmunity and infection» // Autoimmun. Rev. — 2008. — Vol. 8, N 1. — P. 29—32.
8. Liu H., Shi W., Luan F. Hepatitis B virus X protein upregulates transcriptional activation of human telomerase reverse transcriptase // Virus Genes. — 2010. — Vol. 40, N 2. — P. 174—182.
9. Longhi M.S., Ma Y., Mieli-Vergani G., Vergani D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis // J. Autoimmun. — 2010. — Vol. 34, N 1. — P. 7—14.
10. Mancini G., Carbonaro A.O., Haremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial diffusion // Immunochemistry. — 1965. — Vol. 2, N 3. — P. 235—255.
11. Nan X.P., Zhang Y., Yu H.T. Circulating CD4+CD25high regulatory T-cells and expression of PD-1 and BTLA on CD4+ T cells in patients with chronic hepatitis B virus infection // Viral. Immunol. — 2010. — Vol. 23, N 1. — P. 63—70.
12. Qu Z., Liang X., Liu Y. Hepatitis B virus sensitizes hepatocytes to complement-dependent cytotoxicity through downregulating CD59 // Mol. Immunol. — 2009. — Vol. 47, N 2—3. — P. 283—289.
13. Sir D., Tian Y., Chen W.L. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — Vol. 107, N 9. — P. 4383—4388.
14. Te H.S., Jensen D.M. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview // Clin. Liver Dis. — 2010. — Vol. 14, N 1. — P. 1—21.
15. Watts N.R., Cardone G., Vethanayagam J.G. Non-canonical binding of an antibody resembling a naïve B cell receptor immunoglobulin to hepatitis B virus capsids // J. Mol. Biol. — 2008. — Vol. 379, N 5. — P. 1119—1129.

Сведения об авторах

Борисов Александр Геннадьевич — ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, кандидат медицинских наук (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел.: (391) 2125263; e-mail:)

Савченко Андрей Анатольевич — руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии им. проф. А.Т. Пшоники ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел.: (391) 2125263; e-mail:)

И.В. Борисова, С.В. Смирнова

ТАКТИКА ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ У ДЕТЕЙ

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)
Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова (Абакан)

Цель исследования состояла в определении тактики проведения и эффективности диетотерапии у детей, страдающих пищевой аллергией. Под наблюдением находились 162 ребенка в возрасте от 1 года до 18 лет с кожными, респираторными, сочетанными и гастроинтестинальными проявлениями пищевой аллергии. Показано, что эффективность элиминационной диетотерапии зависит от правильного установления причинно-значимых аллергенов, их способности к перекрестному реагированию, от количества аллергенов, участвующих в развитии аллергического воспаления и от длительности заболевания.

Ключевые слова: пищевая аллергия, элиминационная диетотерапия, перекрестные аллергические реакции

TACTICS OF ETIOTROPIC THERAPY OF FOOD ALLERGY OF CHILDREN

I.V. Borisova, S.V. Smirnova

Institute for Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk
Chakasian State University named after N.F. Katanov (Abakan)

The subject of the research is to determine the tactics and the effectiveness of the diet therapy for the children suffered from the food allergy. We examined 162 children with skin, respiratory, combined and gastrointestinal forms of food allergy at age from 1 to 18 years. The effectiveness of the diet therapy turned out to depend on finding the right allergens that cause the illness and the allergens that take part in cross-reactions. It also depends on quantity of allergens that take part in the progress of allergic inflammation and lingering of illness.

Key words: food allergy, elimination diet therapy, cross allergic reactions

Вопросы диагностики и терапии пищевой аллергии являются самой актуальной задачей педиатрии. Особенности сложности при пищевой аллергии касаются вопросов лечения и, в первую очередь, питания, т.к. это является сложной, и вместе с тем недостаточно изученной проблемой. На сегодняшний день основным методом этиотропной терапии пищевой аллергии является диетотерапия. Главный принцип построения диеты при пищевой аллергии — элиминационный. Многообразие клинических проявлений пищевой непереносимости, обусловленных различными механизмами (иммунологическими и неиммунологическими) реакций на пищевые продукты, развитие перекрестных аллергических реакций, отсутствие единых диагностических критериев зачастую приводит к ошибочному диагнозу и как следствие — к неоправданным ограничениям в диете. В последние годы все чаще в литературе встречаются предостережения о вреде диет, назначенных на основе теоретических соображений, без четких доказательств этиологической значимости пищевого аллергена [1]. В связи с этим, чтобы обосновать диетотерапию недостаточно подтверждения наличия сенсibilизации, решающим является клиническая реализация пищевой аллергии. Тактика назначения элиминационных диет зависит от периода обследования, тяжести клинических проявлений, возраста ребенка больного пищевой аллергией. Успех диетотерапии при пищевой аллергии определяется не только точным установлением пищевого продукта, вызывающего развитие аллергических реакций, его способности

к перекрестному реагированию, но и правильным определением целесообразности и длительности элиминации.

Исходя из вышеизложенного, была поставлена **цель исследования:** определить тактику проведения и эффективность элиминационных диет при различных клинических проявлениях пищевой аллергии у детей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось 162 ребенка в возрасте от 1 года до 18 лет, страдающих различными клиническими проявлениями пищевой аллергии. Основным критерием включения детей в исследование было наличие пищевой сенсibilизации. Исследование проводилось с помощью стандартных клинико-лабораторных методов, включающих данные анамнеза (дебют, частоту заболеваний, характер клинических проявлений) и лабораторные показатели. Специфическая аллергологическая диагностика пищевой аллергии проводилась по общепринятой схеме и включала: сбор аллергологического анамнеза, ведение пищевого дневника, постановку кожных проб с пищевыми, бытовыми, пыльцевыми аллергенами, проведение элиминационных и провокационных проб. Кожные пробы проводились со стандартными аллергенами предприятия АОТ «Биомед» им. И.М. Мечникова.

Выделены четыре основные клинические группы пищевой аллергии с учетом «шоковых» органов аллергической реакции: изолированные поражения кожи (атопический дерматит) — $n = 46$;

изолированные поражения респираторного тракта (бронхиальная астма, ринит) — $n = 56$; сочетанные проявления (дерматореспираторный синдром, ДРС) — $n = 43$; гастроинтестинальные проявления — $n = 17$. Характеристика больных по длительности заболевания: до 3 лет — 59 (37 %) больных, до 6 лет — 57 (35 %), свыше 8 лет — 46 (28 %). Характеристика больных по тяжести заболевания: легкая и средняя степень тяжести отмечалась у 125 (77 %) детей, тяжелая — у 37 (23 %).

При выявлении причинно-значимых аллергенов назначались индивидуальные элиминационные диеты. В зависимости от вида элиминационной диеты больные были разделены на 2 группы. I группа больных ($n = 132$) — в питании исключались продукты, обладающие явным сенсибилизирующим действием (яйца, орехи, молоко) и продукты, обладающие возможными перекрестными реакциями (говядина, курица, ряд овощей, фруктов и злаки). II группа больных ($n = 13$) — в питании исключались продукты, обладающие явным сенсибилизирующим действием и частично сохранялись продукты (после специальных методов кулинарной обработки), обладающие перекрестными аллергическими реакциями.

Эффективность элиминационных диет оценивалась по динамике клинических проявлений аллергии, общего состояния ребенка. Оценка результатов после курса этиотропной терапии проводилась в ближайшем (в течение 1 месяца) и отдаленном (позже 1 месяца) периодах. Продолжительность наблюдения за больными в ходе диетотерапии составила 6 месяцев. Результаты оценивались как: хорошие — в случае исчезновения клинических симптомов или значительного их уменьшения; удовлетворительные — при незначительном улучшении клиники; без эффекта — при отсутствии какой-либо динамики со стороны клинических показателей.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием прикладных программ «Excel» и «Statistica for Windows 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ проведенного исследования позволил нам определить особенности течения пищевой аллергии у детей: 1) в большинстве случаев (более 80 %) наличие поливалентной пищевой сенсибилизации (к 3 и более продуктам); 2) наличие у большинства больных сочетанных иммунологических механизмов; 3) с увеличением возраста ребенка — расширение спектра сенсибилизации к аллергенам других групп (84 % случаев). При этом установлено, что у больных пищевой аллергией значительно возрастает доля повышенной чувствительности к пыльцевым аллергенам (в 79 % случаев). Сходство антигенных детерминант в пыльцевых аллергенах и продуктах питания растительного происхождения являются причиной формирования ассоциированных с пылью пищевых аллергий, что клинически проявляется непереносимостью многих овощей, фруктов и злаков (табл. 1).

Таблица 1
Этиологическая структура пищевой аллергии
в зависимости от возраста детей
(по результатам кожных и провокационных проб)

Пищевые аллергены	Возрастные группы		
	1–3 года (%)	4–7 лет (%)	8–18 лет (%)
коровье молоко	80	57	68
говядина	39	27	30
куриное яйцо	67	57	68
курица	42	31	43
рыба	17	7	4
пшеничная мука	32	43	57
цитрусовые	45	49	52
овощи	10	36	48
фрукты	10	22	32

С учетом выявленных особенностей течения пищевой аллергии у детей следует подчеркнуть основные принципы подбора индивидуальной элиминационной диеты: 1) точное установление аллергена и перекрестно реагирующих с ним продуктов; 2) адекватная замена элиминированных продуктов равноценными по питательной ценности и калорийности продуктами с целью сохранения сбалансированности пищевого рациона ребенка.

Результаты клинического исследования позволили выделить этапы в проведении разгрузочно-диетической терапии пищевой аллергии у детей: I этап — подбор элиминационной диеты; II этап — поддерживающая диета; III этап — расширение диеты.

I этап — подбор индивидуальных элиминационных диет является самым сложным из всех этапов. Основными трудностями при проведении данного этапа являются:

1. Редкое присутствие у детей аллергии к одному пищевому продукту (15–20 % случаев), в результате длительность подбора индивидуальной элиминационной диеты находится в прямой зависимости от количества пищевых антигенов, вызывающих аллергические реакции. Чем меньшее число причинно-значимых аллергенов, тем более короткий срок необходим для положительной динамики клинических проявлений (табл. 2).

Таблица 2
Длительность подбора диеты
в зависимости от спектра сенсибилизации

Спектр сенсибилизации	Длительность I этапа диетотерапии (дни)
Сенсибилизация к одному аллергену	3–4 дня
Сенсибилизация к 3–5 аллергенам	7–10 дней
Сенсибилизация к 5–10 аллергенам	14–18 дней

2. Частое наличие поливалентной (особенно пыльцевой) сенсибилизации, вследствие которой,

на основе общности антигенных детерминант, между пыльцевыми и пищевыми аллергенами формируются перекрестные аллергические реакции. Поэтому диетическая коррекция, особенно у детей, старше 3-летнего возраста, затрагивает исключение не только общепризнанных высокоаллергенных белков коровьего молока, яиц, рыбы, орехов, но и злаков, овощей и фруктов. Таким образом, с учетом перекрестно-реагирующих реакций спектр причинно-значимых пищевых продуктов представляет широкий диапазон, особенно у детей с тяжелыми формами аллергии или с длительным сроком заболевания. На основании этих причин длительность I этапа увеличивалась в зависимости от спектра и уровня сопутствующей сенсibilизации.

При подборе элиминационной диеты проблемы заключаются не столько в установлении и удалении причинно-значимого аллергена, сколько в определении всех перекрестно-реагирующих с ним продуктов. Если из рациона питания ребенка исключить только «главные» виновные аллергены, так или иначе, поступление аллергенов в организм будет происходить через перекрестно-реагирующие продукты, следовательно, эффективность элиминационной диеты будет низкой. Хотя существует мнение, что пищевые аллергены, ответственные за развитие перекрестных реакций, в большинстве случаев термолабильные, поэтому часто бывает достаточным употреблять их в вареном виде [2]. В ходе проведенных нами исследований, была изучена эффективность элиминационной диеты при частичном или полном удалении причинно-значимых пищевых аллергенов из рациона питания ребенка (дети I и II групп). Результаты показали, что эффективность элиминационной диеты значительно выше при элиминации не только основных, причинно-значимых, но и перекрестно-реагирующих аллергенов (табл. 3). Положительная динамика клинических проявлений отмечалась на 2–4 день от начала элиминации у 100 детей I группы (76 %), причем у девочек положительный эффект был выше, чем у мальчиков (85 % против 61 %, соответственно). Уменьшение клинических проявлений пищевой аллергии отмечалось у 18 детей (14 %) к концу 1 недели от начала лечения, а у 8 (6 %) — свыше 7 дней элиминации. Причем в этой группе больных у мальчиков процент уменьшения клинических симптомов был значительно выше, чем у девочек (29 и 12 %, соответственно). Лишь у 6 (4 %) детей элиминационная диета не принесла положительных результатов. Отрицательный эффект элиминации можно объяснить тем, что у этих детей была выявлена сопутствующая пыльцевая и бытовая сенсibilизация. Естественно, эффективность элиминационных диет у детей II группы с исключением только основных аллергенов, обладающих явным сенсibilизирующим действием, была ниже и отмечалась в более длительные сроки. Так, хороших результатов удалось добиться в 31 % случаев в течение 5–7 дней, не отмечено явного эффекта элиминации в 69 %. Динамическое на-

блюдение показало, что только в 8 % достигнута ремиссия заболевания к 10 дню от начала диеты, в 38 % — к 1 месяцу, а в 54 % — эффекта элиминации не отмечено. Эти данные еще раз доказывают целесообразность максимальной элиминации всех причинно-значимых аллергенов из рациона питания ребенка, страдающего пищевой аллергией.

Таблица 3
Эффективность элиминационной диеты
в зависимости от вида элиминации

Элиминационные диетические мероприятия	Эффект элиминации			
	улучшение		из них — полная ремиссия	
	%	Сроки (дни)	%	Сроки (дни)
Элиминация причинно-значимого аллергена и перекрестно-реагирующих аллергенов (I группа)	76	2–4	43	5–7
Элиминация только причинно-значимого аллергена (II группа)	31	5–7	8	10

3. Частое присутствие скрытых аллергенов в готовых продуктах питания. С целью избежания случайного употребления скрытых аллергенов необходимо тщательно изучать состав используемого пищевого продукта. В связи с этим, в странах Европейского Союза действуют директивы в отношении производителей продуктов питания, обязывающие их декларировать на этикетках полный перечень используемых продуктов [7].

Отрицательный эффект от элиминационного теста свидетельствует об отсутствии пищевой аллергии и больному снимаются жесткие ограничения в диете. Если удастся достичь уменьшения симптомов болезни, то следующим шагом с целью уточнения причинно-значимого продукта является проведение провокационных тестов. Конечно, данный метод диагностики пищевой аллергии является достаточно трудоемким для врача и обременительным для пациента. Но, в конечном счете, проведение элиминационных и провокационных тестов оправданно, поскольку они являются надежными, высокоэффективными методами диагностики пищевой аллергии, позволяющими выявить полный спектр причинно-значимых и перекрестно-реагирующих аллергенов.

Положительная динамика клинических симптомов болезни является критерием для проведения II этапа — поддерживающей диетотерапии. Основным принципом II этапа разгрузочно-диетической терапии пищевой аллергии является строгое соблюдение элиминационной диеты и адекватная замена в рационе питания исключенных продуктов на альтернативные (натуральные или специализированные) с целью тщательной коррекции пищи как по энергетической ценности, так и основным нутриентам и микронутриентному составу. С этой целью рабочей группой Немецкого общества аллергологии и иммунологии разработаны подробные диеты при аллергии ко многим продуктам питания. В диетах указывается, с одной

стороны, подробный перечень продуктов, содержащих причинно-значимые аллергены, с другой стороны, даются указания их альтернативной замены с целью сохранения сбалансированного питания пациента [8]. Особенно это касается основных продуктов питания, таких как коровье молоко, пшеница, яйца, рыба. При аллергии к коровьему молоку возникает вопрос о полноценном замещении питательных компонентов молока. У детей грудного возраста используются смеси, приготовленные на основе гидролизатов казеина. У детей старшего возраста молоко компенсируется продуктами, обладающими высокой биологической ценностью: мясо животных и птиц, бобовые. Продукты из сои (молоко, творог) содержат необходимые для организма минеральные вещества, витамины группы В и Е. Другим важным компонентом молока является кальций. Поэтому, при назначении безмолочных диет остро встает вопрос о возмещении потребности кальция. Альтернативными продуктами с повышенным содержанием кальция являются: бобовые, рыба, особенно консервированная, некоторые овощи. Кроме продуктов питания недостаток кальция может быть восполнен препаратами кальция и по необходимости витамином Д, который способствует усвоению кальция. Альтернативными видами пшеничной муки является мука других злаковых культур (ячмень, овес, рожь, рис). Также соевая, гречневая, кукурузная мука может быть рекомендована в питании таким пациентам. Необходимо помнить о том, что существует ботаническое родство между белками пшеницы и других злаков, которое часто является причиной развития перекрестных аллергических реакций.

В период проведения II этапа элиминационной диетотерапии в 43 % случаев отмечен положительный эффект элиминации — достигнута полная ремиссия заболевания на 5–7 день, а в 11 % случаев ремиссия наступала в течение двух недель и в 23 % — в течение 1 месяца от начала диетотерапии без применения дополнительного медикаментозного лечения. Стабилизация аллергического процесса в более поздние сроки (в течение 2–6 месяцев) отмечалась у 10 % детей. Изучение эффективности диетотерапии показывает, что ее положительное влияние на течение болезни, в зависимости от клинических проявлений пищевой аллергии, различно. Считается общепризнанным, что наибольшая эффективность отмечается при заболеваниях, обусловленных реактивным типом аллергических реакций, особенно при гастроинтестинальной аллергии [5]. В отношении эффективности при атопическом дерматите, крапивнице встречаются как положительные, так и отрицательные отзывы [4]. Изучение нами эффективности элиминационной диетотерапии с учетом «шокового» органа развития аллергической реакции показало, что положительный эффект элиминации достигается чаще при изолированных проявлениях пищевой аллергии (гастроинтестинальных, респираторных, кожных) и реже — при системных проявлениях (дермореспираторном синдроме) (рис. 1).

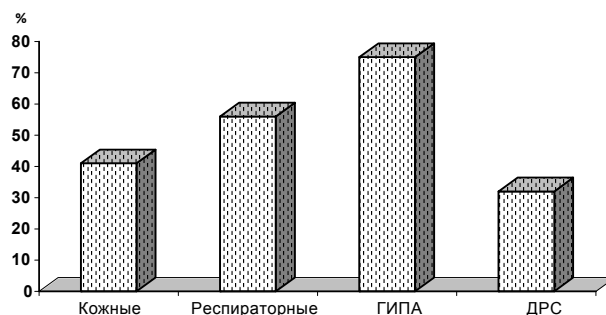


Рис. 1. Эффективность элиминационной диетотерапии в зависимости от клинических проявлений пищевой аллергии.

Определена зависимость эффективности элиминационной диетотерапии от длительности заболевания. Так, если длительность заболевания не превышала 3 лет, то у половины больных ремиссия была достигнута в короткий срок (5–7 дней), и у трети больных — в течение месяца (рис. 2). При длительности болезни более 4 лет ремиссия достигалась дольше, чаще в течение 1 месяца. Эти данные подтверждают высокую значимость влияния расширения спектра сенсibilизации, чаще за счет ингаляционных аллергенов (пыльцевых, бытовых), на течение аллергического воспаления, особенно, при сочетанных клинических проявлениях пищевой аллергии. Так как у больных пищевой аллергией с увеличением возраста меняется спектр сенсibilизации, поскольку значительно возрастает доля повышенной чувствительности, особенно к пыльцевым аллергенам, следовательно, чем раньше после возникновения болезни начата элиминационная диетотерапия, тем быстрее достигается стабилизация аллергического процесса.

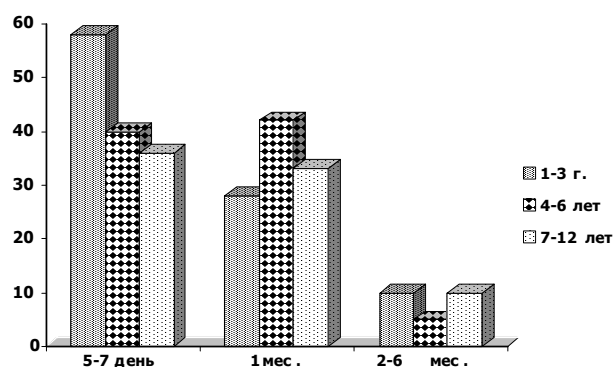


Рис. 2. Эффективность элиминационной диеты в зависимости от длительности заболевания (%).

Итак, удаление всех причинно-значимых аллергенов из рациона питания больного, страдающего пищевой аллергией, позволяет в 76 % случаев добиться положительных результатов в короткие сроки — на 2–4 день от начала диеты. При неполной элиминации положительный эффект отмечается только в 31 % случаев и в более длительные сроки — на 5–7 день от начала диеты. Таким образом, полученные нами результаты доказывают, что для достижения быстрого терапевтического эффекта

при пищевой аллергии, независимо от ее клинических проявлений, необходимо полное исключение причинно-значимого аллергена с учетом его способности к перекрестному реагированию.

Критерием для перехода к III этапу диетической коррекции является: полная клиническая ремиссия аллергического процесса, при этом учитывается выраженность степени сенсибилизации к причинному аллергену и улучшение со стороны иммунологических показателей. О сроках элиминации аллергенных продуктов не существует единого мнения. Одни авторы считают, что продукты слабой аллергенности можно вводить через 1–3 месяца после наступления ремиссии аллергических реакций, улучшения иммунологических показателей и снижения спектра сенсибилизации [6]. Другие авторы считают необходимым увеличение сроков элиминации от 12 месяцев до 1–3 лет, при этом сроки элиминации зависят от вида аллергена [5]. Так, при аллергии на молоко, яйцо, пшеницу элиминация должна составлять 12–18 месяцев; при аллергии на сою — 12 месяцев; на орехи, рыбу — 3 года; при аллергии на другие продукты — от 12 до 18 месяцев. Нами установлено, что при невысокой степени сенсибилизации к пищевому аллергену расширение диеты возможно через 3–6 месяцев, причем начиная с продуктов, обладающих свойствами перекрестно реагировать с причинно-значимым аллергеном [1]. При высокой степени сенсибилизации сроки элиминационной диеты удлиняются от 1 года и более. Тактика повторного введения пищевого продукта, исключенного на длительное время, заключается в постепенном введении, начиная с 30–50 гр. и с ежедневным увеличением дозы в течение 3–5 дней до возрастных норм.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена зависимость спектра непереносимых пищевых продуктов от возраста ребенка.
2. У больных пищевой аллергией с увеличением возраста расширяется спектр сенсибилизации, поскольку значительно возрастает доля повышенной чувствительности к аллергенам других групп (в 84 % случаев). Сходство антигенных детерминант

между респираторными и пищевыми аллергенами часто является причиной развития перекрестных аллергических реакций между пищевыми продуктами и аллергенами других групп.

3. Своевременное проведение этиотропной диетотерапии при пищевой аллергии позволяет сократить сроки стабилизации аллергического воспаления.

4. Достижение терапевтического эффекта при пищевой аллергии возможно только при полном исключении причинно-значимых аллергенов с учетом их способности к перекрестному реагированию.

5. Элиминационная диетотерапия менее эффективна при системных проявлениях пищевой аллергии, чем при моно проявлениях (гастроинтестинальных, респираторных, кожных).

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова И.В., Смирнова С.В. Пищевая аллергия у детей. — Красноярск, 2011. — 150 с.
2. Ногаллер А.М. Дискуссионные и нерешенные проблемы пищевой аллергии: сб. науч. тр. — Рязань, 1990. — С. 9–17.
3. Eigenmann P. Tucken der allergenfreien Diat // Allergologie. — 1998. — Vol. 21б, N 2. — P. 65–68.
4. Kleine-Tebbe J., Herold D., Lepp U. Von Aktuelles zur Therapie Nahrungsmittelallergien // Allergologie. — 2005. — Vol. 28, N 2. — P. 66–74.
5. Lepp U.S., Ehlers I., Erdmann S. Therapiemoglichkeiten bei der IgE — vermittelten Nahrungsmittelallergie // Allergologie. — 2002. — Vol. 25, N 11. — P. 585–590.
6. Rudzka-Kantoch Z. Dietary therapy used for food allergy in infants and young children // Pol. Pediatr. — 1996. — Vol. 71, N 1. — P. 41–46.
7. Vieths S., Fuchs T., Kleine-Tebbe J. Neue Deklarationspflicht fur Nahrungsmittelallergene in Lebensmitteln // Allergologie. — 2006. — Vol. 29, N 10. — P. 403–409.
8. Werfel T., Reese I. Zur Nahrungsmittelallergie: Diatvorschlage und Positiopapiere fur Diagnostik und Therapie // Allergologie. — Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle. — 2003. — P. 1–60.

Сведения об авторах

Борисова Ирина Васильевна — доцент кафедры внутренних болезней Хакасского государственного университета им. Н.Ф. Катанова, кандидат медицинских наук (660077, г. Красноярск, ул. Батурина, д. 34, кв. 26; тел. раб.: 8 (3912) 771-133; e-mail: krasdoctor@yandex.ru)

Смирнова Светлана Витальевна — заместитель директора по научной работе ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (660100, г. Красноярск, ул. Чкалова, д. 41, кв. 117; тел. раб.: 8 (3912) 280-681; e-mail: svetvita@mail.ru)

Ж.В. Веселова, Л.С. Козлова, Ю.П. Джиоев, Е.И. Иванова, С.М. Попкова

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КИШЕЧНОГО БИОТОПА У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

Приведены результаты бактериологического исследования копрологического материала от детей, страдающих аллергическими заболеваниями (атопический дерматит, бронхиальная астма в сочетании с аллергическим ринитом, дермо-респираторный синдром, аллергический ринит) в г. Иркутске. Обследовано 62 пациента в возрасте от 1 года до 17 лет. Выявлены значительные отклонения от микробиологической нормы кишечного биотопа: по лактобактериям у 75,8 % лиц, плотность бифидобактерий была снижена у 58 % пациентов. Из условно-патогенной микрофлоры наиболее часто встречаемыми оказались бактерии *S. aureus* (24,2 %) и *K. pneumoniae* (14,5 %).

Ключевые слова: кишечная микробиота, индигенная микрофлора, условно-патогенные микроорганизмы, бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит, дермо-респираторный синдром

MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF INTESTINAL BIOTOPE IN CHILDREN WITH ALLERGIC DISEASES

Zh.V. Veselova, L.S. Kozlova, Yu.P. Dzhioev, E.I. Ivanova, S.M. Popkova

Scientific Center of the Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

The results of bacteriological examination of scatological material from children with allergic diseases (atopic dermatitis, bronchial asthma combined with allergic rhinitis, dermal and respiratory syndrome, allergic rhinitis) in Irkutsk are presented. The study involved 62 patients aged from 1 year to 17 years. Significant deviations from the microecological norm were revealed: of lactic acid bacteria — 75,8 %, while the number of bifidobacteria was reduced in 58 % of patients. The most frequently identified opportunistic bacteria were *S. aureus* (24,2 %) and *K. pneumoniae* (14,5 %).

Key words: intestinal microbiota, indigenous microflora, opportunistic pathogens, bronchial asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, dermal and respiratory syndrome

В последнее время научный интерес к аллергическим заболеваниям (АЗ) неуклонно растет, т.к. возрастает частота проявлений этой патологии, особенно в развитых странах. Как показывают исследования, за последние 30 лет распространенность аллергических заболеваний повсеместно каждые 10 лет удваивается, приобретая эпидемический характер [2]. По данным ВОЗ, в настоящее время от 10 до 30 % населения планеты страдают аллергическими заболеваниями. Но, как известно, аллергическая патология — это мультифакторное заболевание, однако важную роль играет и наследственность. Патогенетическую основу АЗ составляют иммунопатологические реакции, развитие которых связано с реакцией организма к веществам и соединениям, обладающим сенсибилизирующими свойствами. Проникновение аллергена во внутренние среды организма происходит в том числе через пищеварительный тракт, и имеющаяся патология желудочно-кишечного тракта в виде нарушения микробиоценоза кишечника в значительной степени может влиять на тяжесть течения заболевания [5]. Дисбактериозу кишечника как фактору, способствующему развитию сенсибилизации организма к условно-патогенной флоре и отягощающему клиническое течение аллергических заболеваний, уделяют особое внимание. Известно об иммуномодулирующей роли кишечной микрофлоры, обусловленной влиянием

на дифференцировку Т-лимфоцитов в пейеровых бляшках. Индуцированная нормальной микрофлорой субпопуляция Th-3 продуцирует фактор некроза опухоли TNF β , который препятствует атопии, и противовоспалительный цитокин IL-10, переключающий иммунный ответ с Th1 на Th2. При имеющемся дисбактериозе это соотношение сдвигается в обратную сторону. Поэтому наличие нарушения микробиоценоза кишечника приводит к утяжелению аллергического заболевания [3, 6].

В условиях физиологической нормы организм человека содержит сотни различных видов микроорганизмов. Видовой состав микробного биоценоза различных отделов кишечника периодически меняется, но каждому индивидууму свойственны характерные микробные сообщества. Сам термин «нормальная микрофлора» объединяет спектр микроорганизмов, наиболее часто выделяемых из организма здорового человека. Верхние отделы тонкой кишки относительно свободны от бактерий (менее 10³/мл), в них можно обнаружить грибы рода *Candida*, стрептококки и лактобациллы. Но нижние отделы тонкой и, особенно, толстой кишки представляют поистине резервуар бактерий всего организма человека. На состав микробных сообществ различных полостей организма влияют самые разнообразные факторы: состав и качество пищи, курение и употребление алкоголя, нормальная перистальтика и своевременное опорожнение

кишечника и мочевого пузыря, качество пережевывания пищи и даже характер трудовой деятельности (сидячий или иной). Однако наибольшее воздействие оказывают заболевания, патогенез которых включает изменения физико-химических свойств эпителиальных поверхностей и прием antimикробных препаратов [4].

Целью настоящей работы являлась оценка состояния микрoэкологического статуса кишечника у детей с аллергопатологией, проживающих в условиях городской среды обитания (г. Иркутск).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования состояли из двух этапов:

1. Верификация врачом аллергологом-иммунологом диагноза АЗ (бронхиальной астмы, протекающей в сочетании с аллергическим ринитом (БА + АР), атопического дерматита (АтД), дермореспираторного синдрома (ДРС), аллергического ринита (АР)) проводилась в аллергоцентре клиники ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН.

2. Исследование кала на дисбактериоз кишечника проводилось в лаборатории микрoэкологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН.

Бактериологическому анализу подвергался клинический материал от 62 детей в возрасте от 1 года до 17 лет, страдающих аллергическими заболеваниями. Кoproлогические пробы от детей на дис-

биоз для определения облигатной факультативной микрофлоры и грибов рода *Candida* проводился с помощью общепринятых бактериологических методов исследования, согласно отраслевому стандарту (ОСТ) [1]. Полученные данные сопоставляли с нормативными показателями [5]. При исследовании микробиоценоза кишечника определялось количество бифидо- и лактобактерий, кишечной палочки с нормальной и сниженной ферментативной активностью, энтерококков, стафилококков, гемолизующей кишечной палочки, условно патогенных лактозонегативных энтеробактерий (клебсиелла, протей, энтеробактер, цитробактер), дрожжеподобных и грибов рода *Candida*. Забор материала осуществлялся в стерильную посуду. Время от момента забора и проведения исследования составляло не более 2-х часов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения бактериологического исследования было установлено, что у обследованных детей имелись значительные отклонения от показателей физиологической нормы микрoэкологического статуса. Концентрация бифидобактерий была снижена у 58 % пациентов, и лишь у 22 % данный показатель находился в норме, а нормативные значения по лактобактериям наблюдались лишь у 14,5 % больных детей (рис. 1). Содержание *E. coli* с

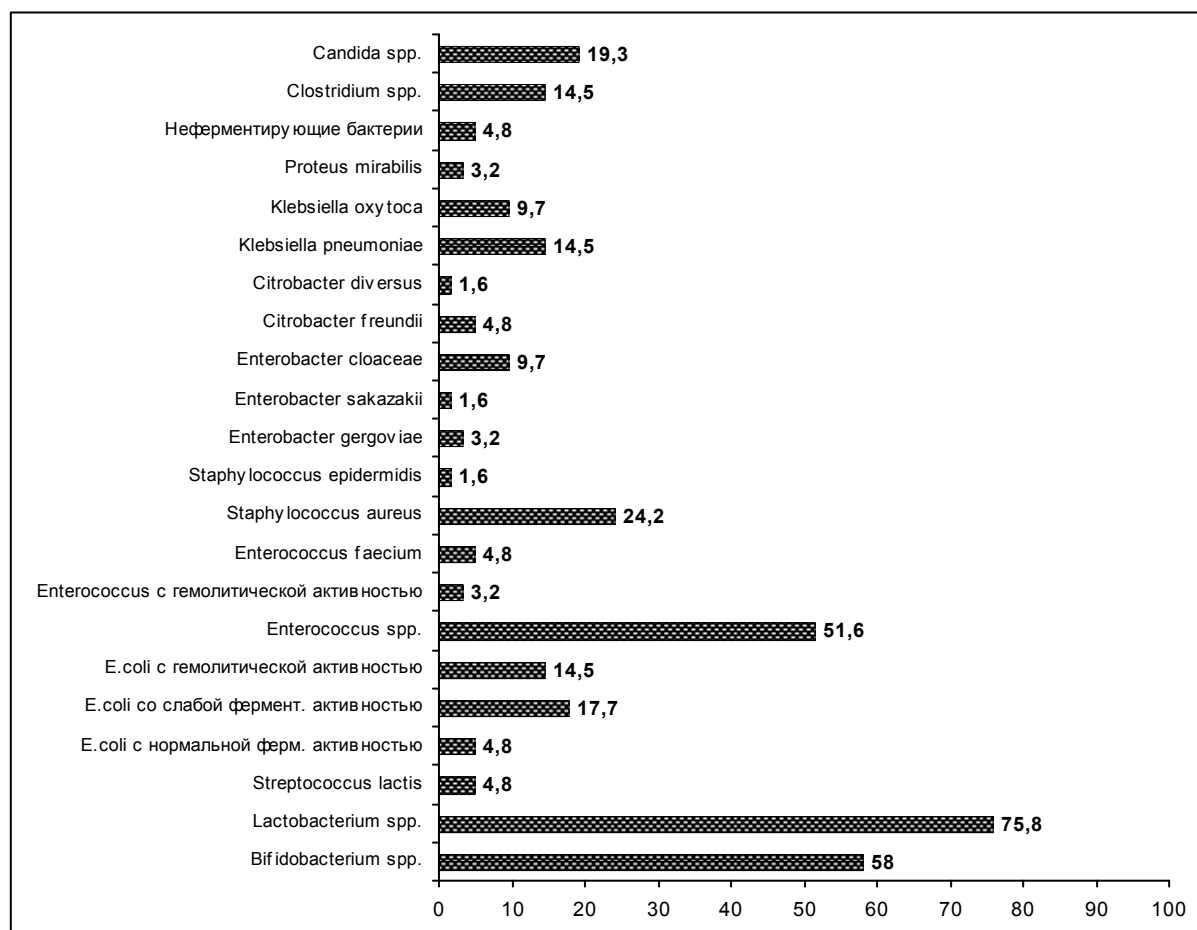


Рис. 1. Отклонения от нормы компонентов кишечной микрофлоры, %.

нормальной ферментативной активностью имело незначительные отклонения от нормы (до 4,8 %), а количество *E. coli* со слабой ферментативной активностью превышали норму в 17,7 % случаев. Также были обнаружены гемолитические и лактозонегативные *E. coli* (14,5 % и 8,1 % соответственно), чье присутствие в кишечнике несвойственно при здоровом состоянии организма. Однако в то же время общее количество *E. coli* в кишечнике находилось в пределах физиологической нормы. Молочно-кислый стрептококк встречался в копрологическом материале с частотой 4,8 %. Содержание энтерококков у половины обследованных лиц (51,6 %)

было в норме, но также в 3,2 % случаев встречались гемолитические энтерококки.

В спектре условно-патогенной микрофлоры (УПМ) больший удельный вес представлял *S. aureus* (24,2 % детей, страдающих аллергическими заболеваниями). *E. faecium* превышал норму в 4,8 %. Род *Enterobacter* был представлен видами *E. sakazakii*, *E. gergoviae*, *E. cloacae*, встречаемость которых варьировала от 1,6 до 9,7 %. Содержание *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* превышало допустимую для них норму в 14,5 и 9,7 % соответственно. Из представителей рода *Citrobacter* были обнаружены *C. freundii* (4,8 %) и *C. diversus* (1,6 %). Не типичный

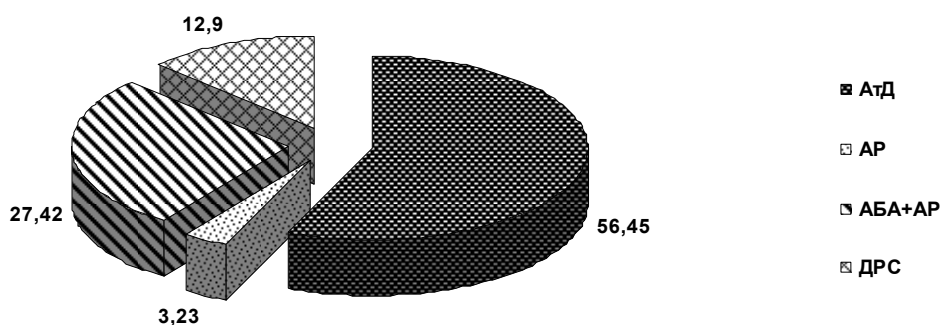


Рис. 2. Распределение больных с нарушениями кишечной микрофлоры по различным нозологическим формам АЗ, %.

Таблица 1
Компоненты кишечного биотопа с отклонениями от нормативных значений при различных аллергических заболеваниях, в %

Компоненты кишечной биоты с отклонениями от нормы, %	АтД	АР	АБА+АР	ДРС
<i>Bifidobacterium spp.</i>	68,57	50	70,59	50
<i>Lactobacterium spp.</i>	80	100	94,12	87,5
<i>Streptococcus lactis</i>	8,57	–	–	–
<i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью	8,57	–	–	12,5
<i>E. coli</i> со слабой ферментативной активностью	31,43	–	17,65	–
<i>E. coli</i> с гемолитической активностью	22,86	–	5,88	–
<i>Enterococcus spp.</i>	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i> с гемолитической активностью	5,71	–	–	–
<i>Enterococcus faecium</i>	–	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	37,14	–	5,88	12,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,86	–	–	–
<i>Enterobacter gergoviae</i>	2,86	–	5,88	–
<i>Enterobacter sakazakii</i>	–	–	5,88	–
<i>Enterobacter cloacae</i>	8,57	50	5,88	12,5
<i>Citrobacter freundii</i>	8,57	–	–	–
<i>Citrobacter diversus</i>	2,86	–	–	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22,86	–	–	12,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	14,29	–	–	12,5
<i>Proteus mirabilis</i>	5,71	–	–	–
неферментирующие бактерии	8,57	–	–	–
<i>Clostridium spp.</i>	22,86	–	–	–
<i>Candida spp.</i>	22,86	–	17,65	12,5

для данного биотопа у здоровых лиц *P. mirabilis* был обнаружен в 3,2 % случаев. Грибы рода *Candida* встречались в 19,3 % образцов. Дрожжеподобные грибы также выделялись в 1,6 % проб. Доля проб с клостридиями, превышающими диагностически значимую концентрацию, составило 14,5 %. Неферментирующие бактерии в исследованном материале встречались до 4,8 % (рис. 1). Показатель соотношения кишечной палочки к бифидобактериям превышал допустимую норму (менее 5 %) у 51,6 % обследованных лиц с АЗ.

На рис. 2 показано соотношение разных форм аллергии у обследованных детей. Наибольшее количество детей было зарегистрировано с АтД (56,5 %), на втором месте по распространенности оказалась БА, сочетанная с АР (27,4 %). Значительно реже встречались ДРС (12,9 %) и АР (3,2 %).

Отклонения от нормы компонентов кишечной биоты при нозологических формах АЗ распределились следующим образом: дефицит бифидобактерий при АтД регистрировался у 68,6 %, при АБА + АР — 70,6 %, ДРС — 50 %, а лактобактерий при АтД — 80 %, АБА + АР — 94,1 %, ДРС — 87,5 %. *E. coli* со слабой ферментативной активностью при АтД встречалась в 31,4 % случаев, АБА + АР — 17,7 %. Из УПМ чаще всего отклонения выявлялись по высеваемости *K. pneumoniae*: у детей с АтД — в 22,9 % случаев, ДРС — 12,5 %. *S. aureus* чаще выделялся при АтД (37,1 %), реже — при АБА + АР (5,9 %) и ДРС (12,5 %). Дрожжеподобные грибы рода *Candida* встречались в 22,9 % случаев, АБА + АР — 17,7 %, ДРС — 12,5 %. Микроорганизмы рода *Clostridium* высевались практически у каждого пятого ребенка (22,9 %) с аутопическим дерматитом (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдения показали, что при разных нозологических формах АЗ наблюдалась разнообразная структура микробиоценологического состава кишечника. Как видно из результатов исследования, для детей, болеющих АБ + АР, характерна следующая видовая структура индигенной и условно-патогенной микрофлоры кишечника: дефицит как бифидобактерий (70,6 %), так и видов лактобактерий (94 %), хотя при этом большинство представителей УПМ выявлялись в норме. Довольно часто был отмечен

рост *E. coli* со слабой ферментативной активностью (17,7 %) и *Candida spp.* (17,7 %). Среди детей, страдающих АтД, на фоне частого дефицита бифидо (68,6 %) и лактобактерий (80 %) отмечалась разнообразная сочетаемость видов и условно-патогенной микрофлоры. Отклонения от нормы наблюдались по высеваемости следующих УПМ: *K. pneumoniae*, *Clostridium spp.*, *Candida spp.*, *E. coli* с гемолитической активностью (22,9 %), *K. oxytoca* (14,3 %), *S. aureus* (37,1 %), *E. coli* со слабой ферментативной активностью (31,4 %). У детей с ДРС также наблюдался дефицит индигенной микрофлоры: бифидобактерий у 50 % пациентов, отклонения от нормы по лактобактериям наблюдались у 87,5 % лиц. Содержание *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Candida spp.* и *S. aureus* до 12,5 % случаев не соответствовали физиологическим нормативам. Отклонения от нормы по индигенной микрофлоре (бифидобактерий — 50 %, лактобактерий — 100 %), а из УПМ наиболее часто выделяющиеся из копропроб *E. cloacae* (до 50 %) характерны для детей с АР. Проведенные исследования подтверждают исследования других авторов [6] и дополнительно свидетельствуют о том, что в стандартное лечение АЗ необходимо включать коррекцию выявленных нарушений микробиоценоза кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дисбактериоз кишечника: Отраслевой стандарт 91500.11.0004; протокол ведения больных. — М., 2003. — 86 с.
2. Лусс Л.В. Этиология, патогенез, проблемы диагностики и лечения аллергического ринита // РМЖ. — 2003. — Т. 11, № 12. — С. 718—728.
3. Паттерсон Р., Грэммер Л.К., Гринбергер П.А. Аллергические болезни: диагностика и лечение. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000. — 768 с.
4. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 1998. — 1183 с.
5. Ткаченко Е.И., Суворова А.Н. Дисбактериоз кишечника: рук. по диагностике и лечению. — СПб.: Спецлит, 2007. — 238 с.
6. Яковлева В.К., Федосеев Г.Б. Влияние лечения паразитозов и дисбактериоза кишечника на течение бронхиальной астмы // Рос. аллергол. журн. — 2011. — № 5. — С. 16—20.

Сведения об авторах

Веселова Жанна Викторовна — младший научный сотрудник, ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952) 24-03-52; e-mail: jei.ja@mail.ru)

Козлова Любовь Сергеевна — научный сотрудник, ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, кандидат медицинских наук (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952) 24-03-52; e-mail: kozlovals-2011@mail.ru)

Джиоев Юрий Павлович — старший научный сотрудник, ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, кандидат биологических наук (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952) 24-03-52; e-mail: alanir07@mail.ru)

Иванова Елена Иннокентьевна — младший научный сотрудник, ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952) 24-03-52; e-mail: ivanova.iem@gmail.com)

Попкова София Марковна — заведующая лабораторией Микроэкологии, ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, доктор биологических наук (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952) 24-03-52; e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru)

Е.А. Голикова, Ю.А. Лопатникова, Н.С. Шкаруба, А.Э. Сизиков, С.В. Сенников

TNF, РАСТВОРИМЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И АУТОАНТИТЕЛА К TNF У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Исследовано содержание аутоантител к TNF в сыворотках крови больных ревматоидным артритом (РА) совместно с определением содержания растворимых рецепторов и самого медиатора TNF. Показано достоверное повышение содержания TNF и растворимых рецепторов к TNF I и II типов в сыворотках крови больных РА в стадии обострения и больных РА, ответивших на терапию, по сравнению с условно здоровыми донорами. При определении субклассов аутоантител показано достоверное увеличение относительного содержания аутоантител субклассов IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови больных РА в стадии обострения по сравнению с условно здоровыми донорами, а также достоверное увеличение относительного содержания аутоантител субклассов IgG2 и IgG4 у больных РА в стадии обострения по сравнению с больными РА, ответившими на терапию. Таким образом, показано наличие аутоантител, растворимых рецепторов к TNF и самого цитокина в сыворотке условно здоровых доноров и больных РА, при этом учитывая достоверные изменения в относительном содержании подклассов аутоантител и содержании TNF и растворимых рецепторов, можно говорить о функциональной роли аутоантител и растворимых рецепторов к TNF и медиатора при патологии.

Ключевые слова: аутоантитела, фактор некроза опухоли, ревматоидный артрит

TNF, SOLUBLE RECEPTORS AND AUTOANTIBODIES TO TNF OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND HEALTHY DONORS

Е.А. Golikova, J.A. Lopatnikova, N.S. Shkaruba, A.E. Sizikov, S.V. Sennikov

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

The content of autoantibodies to TNF in the sera of patients with rheumatoid arthritis (RA) in conjunction with the definition of soluble receptors and TNF was investigated. A significant increase in the content of TNF and I and II types soluble receptors to TNF in sera of RA patients in the acute stage and of responding to therapy RA patients compared with relatively healthy donors was demonstrated. In determining autoantibodies subclasses a significant increase in the relative content of subclasses IgG2, IgG3 and IgG4 autoantibodies in sera of RA patients in the acute stage compared with relatively healthy donors, as well as a significant increase in the relative content of subclasses IgG2 and IgG4 autoantibodies in RA patients in the acute stage compared with RA patients, responding to therapy were shown. Thus we have shown the presence of antibodies, soluble receptors to TNF and cytokine in the serum of relatively healthy donors and RA patients, herewith taking into account significant changes in the relative content of the subclasses of autoantibodies and in the content of TNF and soluble receptors we can talk about the functional role of the autoantibodies and soluble receptors to TNF in the pathology.

Key words: autoantibodies, tumor necrosis factor, rheumatoid arthritis

В последние годы в многочисленных работах сообщается об обнаружении в системной циркуляции в норме и при различных инфекционных и аутоиммунных заболеваниях аутоантител, специфичных к интерферонам (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), некоторым интерлейкинам (IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12), факторам роста (GM-CSF, M-CSF, LIF, Oncostatin M, VEGF) и фактору некроза опухолей [7, 13], причем в некоторых случаях, продемонстрировано участие аутоантител в патогенезе заболеваний или предрасположенности к ним. Показано, что в дополнение к блокировке специфических функций цитокинов, аутоантитела могут играть важную роль в регуляции иммунного ответа в силу их способности к образованию иммунных комплексов с соответствующими цитокинами или антиидиотипическими антителами, представляя собой один из механизмов регуляции биологической активности цитокинов, наряду с растворимыми и мембраносвязанными рецепторами [13].

Одним из значимых цитокинов с широким спектром действия является фактор некроза опухоли (TNF), для которого показано увеличение содержания при различных состояниях [11]. Существует широкий спектр заболеваний, при которых роль TNF считается крайне важной [4, 12].

При ревматоидном артрите TNF продуцируется макрофагами синовиальной ткани, и в активной стадии заболевания достигается его максимальная концентрация. Основными патогенетическими эффектами TNF при РА являются увеличение продукции фактора дифференцировки остеокластов — лиганда остеопротегерина (RANKL), отвечающего за резорбцию костной ткани, а также индукция экспрессии молекул адгезии, металлопротеиназ, коллагеназ, хемокинов и простагландинов [3].

На сегодняшний день исследованию аутоантител к фактору некроза опухоли посвящено небольшое количество работ. Так, аутоантитела к TNF были обнаружены в сыворотках крови здоровых доноров, в большем количестве — в сыворотках

крови пациентов с туберкулезом, грамотрицательной бактериальной септициемией, кистозным фиброзом с хронической легочной инфекцией, рассеянным склерозом, а также с различными ревматическими заболеваниями [2, 8]. Вместе с тем, наличие аутоантител к TNF, их вклад в регуляцию биологической активности самого цитокина и участие в патогенетических процессах при различных заболеваниях изучены недостаточно. В связи с этим представляется актуальным исследовать содержание аутоантител к TNF в сыворотках крови больных ревматоидным артритом совместно с определением содержания растворимых рецепторов и самого медиатора TNF.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась периферическая кровь 24 условно здоровых доноров, включенных в группу по результатам опроса и результатам латекс-теста на С-реактивный белок (ООО «Ольвекс диагностика»), в соответствии с методикой производства. Результат считали отрицательным при концентрации СРБ в сыворотке крови < 6 мкг/мл.

Группа больных ревматоидным артритом составила 18 человек, находившихся на госпитализации в клинике ИКИ г. Новосибирск. Диагноз ревматоидного артрита верифицирован в соответствии с критериями ACR 1987 г. Активность РА определялась с помощью подсчета количества болезненных и припухших суставов из 28, определения СОЭ, оценки пациентом общего состояния здоровья по ВАШ (визуальной аналоговой шкале от 0 до 100 мм) и дальнейшего вычисления индекса DAS28. Все пациенты на момент поступления в клинику ИКИ имели высокую активность заболевания ($\text{DAS28} > 5.1$). У каждого пациента была взята кровь для исследования в стадии обострения заболевания и после коррекции базисной терапии, включая добавление глюкокортикостероидов или биологических агентов (мабтера), при условии эффективности лечения (по критерию EULAR) и выявления положительной клинической и/или лабораторной динамики: изменение индекса $\text{DAS28} > 1.2$ при исходном значении > 5.1 (далее — больные, ответившие на терапию).

Сыворотку получали центрифугированием цельной крови в течение 15 мин (3000 об./мин).

Определение компонентов системы TNF

Определение сывороточного содержания медиаторов проводили методом твердофазного ИФА. Уровень общего уровня TNF определяли с использованием набора альфа-TNF — ИФА — БЕСТ (Вектор-Бест, Россия). Уровень растворимых рецепторов TNF I и II типов определяли с помощью наборов Human soluble TNFR1 ELISA Kit и Human soluble TNF RII ELISA Kit (RayBioTech, Англия). Иммуноферментный анализ с использованием коммерческих тест систем проводили согласно инструкции производителя. Относительное содержание антител классов IgA, IgG, IgM и субклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 определяли с использова-

нием сборного набора: рекомбинантный человеческий TNF (ООО «Центр инженерной иммунологии»), планшеты с высокоадсорбционной поверхностью Costar (США), реактивы фирмы Иммунотех (Москва): фосфатно-солевой буферный раствор, ТМБ раствор 1-компонентный и СТОП-раствор, а также моноклональные антитела к классам и субклассам иммуноглобулинов человека меченные пероксидазой хрена фирмы «Полигност» (Санкт-Петербург). Для работы со сборным набором ИФА для определения относительного содержания аутоантител был отработан метод с использованием имеющихся реактивов по оптимизации разведений сывороток и конъюгатов. Был выбран следующий протокол иммуноанализа: проводили сорбцию рекомбинантного белка TNF на поверхности лунок планшета для ИФА в дозе 40 мкг/мл, в объеме 100 мкл, инкубировали 2 часа при 37 °C, и затем 16–18 часов при 4 °C; блокирование сайтов неспецифического связывания осуществляли путем инкубации с 1 % БСА в течение 1 часа при 37 °C, с предварительной отмывкой планшета фосфатно-солевым буфером с 0,05 % Tween20; далее после каждой инкубации отмывали планшет пятикратно фосфатно-солевым буфером; после отмывки вносили сыворотки в объеме 100 мкл, с разведением 1:5; инкубировали планшет 2 часа при 37 °C; после отмывки вносили конъюгаты в объеме 100 мкл с разведением 1:100; инкубировали планшет 1 час при 37 °C; после отмывки вносили раствор ТМБ в объеме 100 мкл; инкубировали планшет 30 минут при 37 °C; вносили стоп раствор в объеме 100 мкл; проводили анализ на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм с референс волной 620 нм. Анализ проводился с использованием спектрофотометров Anthos 2020.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе мы измерили содержание TNF, растворимых рецепторов и аутоантител к TNF в сыворотках крови 18 больных с РА в стадии обострения, 15 больных с РА, ответивших на терапию, и 24 условно здоровых доноров. Детектируемые уровни медиатора, растворимых рецепторов и аутоантител были обнаружены во всех исследованных группах.

Результаты определения содержания TNF и растворимых рецепторов к TNF (sTNFR) I и II типов в сыворотках крови больных ревматоидным артритом (РА) в стадии обострения, больных РА, ответивших на терапию, и условно здоровых доноров представлены в таблице 1. Нами было показано, что содержание TNF в сыворотках крови больных РА в стадии обострения и больных РА, ответивших на терапию, достоверно выше такового в сыворотках крови условно здоровых доноров, что подтверждает активное участие исследуемого цитокина в патогенезе данного заболевания. Несколькими группами исследователей ранее также сообщалось об обнаружении более высокого содержания TNF в сыворотке крови пациентов с РА, по сравнению с условно здоровыми донорами [9]. Также было показано, что концентрация данного цитокина

была выше в сыворотке крови больных с более активными формами РА, по сравнению с менее активными формами заболевания и обнаружена положительная корреляцию с длительностью заболевания [9, 11]. В нашей работе также показано недостоверное снижение уровня TNF у больных РА, ответивших на терапию, по сравнению с активной стадией заболевания.

Определено 2 типа растворимых рецепторов к TNF, клеточная продукция которых под действием TNF усиливается. При ревматоидном артрите данные рецепторы продуцируются не только локально синовиальными клетками, но также и циркулирующими клетками периферической крови [9].

Растворимые рецепторы регулируют функции TNF. С одной стороны, они (особенно sTNFR1) нейтрализуют TNF в системной циркуляции и ингибируют его биологическую активность, блокируя действие цитокина и конкурируя с рецепторами TNF на поверхности клеток, а также усиливают его паракринные эффекты [11]. С другой стороны, комплексы рецепторов с TNF можно рассматривать в качестве своеобразного пула связанного рецептора, из которого он постепенно высвобождается [10].

TNF практически не определяется в сыворотке крови здоровых людей. При различных патологических состояниях, таких как граммотрицательный сепсис и не бактериальные инфекции подобные малярии, содержание sTNFR1 и sTNFR2 может повышаться на порядок. Менее значимое повышение содержания растворимых рецепторов показано при онкологии, вирусных инфекциях и аутоиммунных заболеваниях. Уровень sTNFR1 повышен в сыворотке пациентов с онкологическими заболеваниями, сердечной недостаточностью, хронической почечной недостаточностью, системной склеродермией и в бронхо-альвеолярном лаваже пациентов, страдающих респираторным дистресс-синдромом взрослых, а также коррелирует со степенью тяжести паразитемии и малярии у человека [5].

Определение растворимых рецепторов к TNF I и II типов в нашей работе, показало преобладание содержания рецептора II типа по сравнению с содержанием рецептора I типа во всех исследованных группах, что согласуется с литературными данными [11]. Также нами было определено, что содержание рецепторов к TNF обоих типов в сыворотках крови больных РА в стадии обострения и больных РА, от-

ветивших на терапию, достоверно выше таковых в сыворотках крови условно здоровых доноров, что говорит об активном вовлечении растворимых рецепторов к TNF в протекание патологических процессов при РА и подтверждается литературными данными [6].

Существуют сведения о корреляции между концентрациями TNF и его растворимых рецепторов, говорящие о том, что стимулы, увеличивающие уровень TNF, также могут индуцировать и «выброс» TNF-рецепторов в системную циркуляцию. Другие исследования говорят о том, что появление этих двух типов рецепторов в системной циркуляции происходит независимо. В конечном счете, появление растворимых рецепторов в ответ на повышение концентрации TNF может являться механизмом, благодаря которому предотвращается немедленное связывание TNF его поверхностными клеточными рецепторами, что защищает клетки от эффектов TNF и способствует локализации воспалительной реакции [6]. Однако повышенной продукции растворимых рецепторов в синовиальной оболочке сустава может оказаться недостаточно, чтобы нейтрализовать патологические эффекты TNF при РА.

В нашей работе была получена положительная корреляция между содержанием TNF и растворимым рецептором к TNF II типа у больных РА, ответивших на терапию. При этом в сыворотках крови больных РА в стадии обострения заболевания содержание рецептора к TNF I типа положительно коррелирует с содержанием рецептора к TNF II типа. Что совместно с полученными в нашей работе данными о более высоком, по сравнению с рецептором I типа, содержанием в сыворотке больных РА рецептора II типа к TNF может указывать преимущественную реализацию эффектов медиатора посредством данного рецептора в патогенезе РА. Данное предположение согласуется с данными о том, что у больных ревматоидным артритом происходит преимущественное повышение растворимого рецептора II типа [5]. С другой стороны при сравнении групп больных с РА и условно здоровых доноров видно, что концентрация рецептора I типа возрастает намного активнее, чем рецептора II типа, что в свою очередь может указывать на то, что TNFR1 более активно реагирует на воспалительный процесс при РА, нейтрализуя TNF в системной циркуляции и ингибируя его биологическую ак-

Таблица 1

Содержание TNF и растворимых рецепторов к TNF I и II типов в сыворотке крови больных ревматоидным артритом в стадии обострения, больных ревматоидным артритом, ответивших на терапию, и условно здоровых доноров

Группа	TNF (пг/мл)	sTNFR1 (пг/мл)	sTNFR2 (пг/мл)
Больные РА в стадии обострения	2,190 ± 0,638*	1529,015 ± 159,113*	3051,021 ± 195,251**
Больные РА, ответившие на терапию	1,55 ± 0,915*	1566,206 ± 185,804*	3240,903 ± 410,364**
Условно здоровые доноры	0,216 ± 0,127	132,554 ± 26,428	1620,887 ± 169,241#

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с условно здоровыми донорами; # – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с содержанием TNF RI (пг/мл).

Таблица 2

Относительное содержание аутоантител к TNF по классам и субклассам в сыворотке крови больных ревматоидным артритом в стадии обострения, больных РА, ответивших на терапию, и условно здоровых доноров. Результаты получены в иммуноферментном анализе, и представлены в условных единицах оптической плотности (OD)

Группа	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgG	IgM
Больные РА в стадии обострения	0,056 ± 0,003	0,099 ± 0,010*	0,118 ± 0,013*	0,067 ± 0,009*	0,484 ± 0,050	1,794 ± 0,128	1,605 ± 0,109
Больные РА, ответившие на терапию	0,057 ± 0,005	0,071 ± 0,006#	0,090 ± 0,010	0,040 ± 0,005#	0,415 ± 0,046	1,837 ± 0,168	1,587 ± 0,104
Условно здоровые доноры	0,055 ± 0,005	0,070 ± 0,006	0,081 ± 0,007	0,042 ± 0,005	0,534 ± 0,046	1,691 ± 0,160	1,423 ± 0,054

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с условно здоровыми донорами; # – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с больными РА в стадии обострения.

тивность, посредством блокады действия цитокина и конкуренции растворимого рецептора I типа с рецепторами TNF на поверхности клеток.

Также в нашей работе было измерено относительное содержание аутоантител к TNF. На сегодняшний день исследованию аутоантител к фактору некроза опухоли посвящено небольшое количество работ. Так, аутоантитела к TNF альфа были обнаружены в сыворотках крови здоровых доноров, в большем количестве – в сыворотках крови пациентов с грамотрицательной бактериальной септициемией, кистозным фиброзом с хронической легочной инфекцией, а также с различными ревматическими заболеваниями [8].

Результаты определения относительного содержания аутоантител классов IgA, IgG, IgM и субклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови больных РА в стадии обострения, больных РА, ответивших на терапию, и условно здоровых доноров, полученные в нашей работе, представлены в таблице 2. Для определения относительных значений использовали условные единицы оптической плотности, получаемые на спектрофотометре Anthos 2020. Достоверных отличий в относительном содержании классов IgA, IgG, IgM между исследованными группами получено не было. Было показано, что относительное содержание субклассов IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови больных РА в стадии обострения достоверно выше такового в сыворотках крови условно здоровых доноров, при этом относительное содержание субклассов IgG2 и IgG4 достоверно выше в сыворотках крови больных РА в стадии обострения по сравнению с данными, полученными для больных РА, ответивших на терапию, что может говорить о том, что уровни данных субклассов могут быть ассоциированы с тяжестью течения РА и, соответственно, с патогенезом рассматриваемой патологии. Также в нашей работе была обнаружена положительная корреляция между относительным содержанием субклассов IgG2 и IgG4 у больных РА в стадии обострения и больных РА, ответивших на терапию, что дополнительно указывает на важность аутоантител к TNF субклассов IgG2 и IgG4 при протекании РА. Можно предположить, что аутоантитела данных подклассов регулируют иммунные реакции при РА путем депонирования TNF посредством образова-

ния иммунных комплексов и увеличения длительности его существования в системной циркуляции аналогично роли растворимых рецепторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения нашей работы показано достоверное повышение содержания TNF и растворимых рецепторов к TNF I и II типов в сыворотках крови больных РА в стадии обострения и больных РА, ответивших на терапию, по сравнению с условно здоровыми донорами. При определении субклассов аутоантител показано достоверное увеличение относительного содержания аутоантител субклассов IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови больных РА в стадии обострения по сравнению с условно здоровыми донорами, а также достоверное увеличение относительного содержания аутоантител субклассов IgG2 и IgG4 у больных РА в стадии обострения по сравнению с больными РА, ответившими на терапию. Таким образом, показано наличие аутоантител, растворимых рецепторов к TNF и самого цитокина в сыворотке условно здоровых доноров и больных РА, при этом учитывая достоверные изменения в относительном содержании подклассов аутоантител и содержании TNF и растворимых рецепторов, можно говорить о функциональной роли аутоантител и растворимых рецепторов к TNF и медиатора при патологии.

Работа поддержана грантом ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 гг. (Госконтракт П1305).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кричевская О.А., Клюквина, Н.Г., Александрова Е.Н. Фактор некроза опухоли α и его растворимые рецепторы при ревматических заболеваниях: клиническое и патогенетическое значение // Науч.-практ. ревматология. – 2005. – № 2. – С. 43 – 46.
2. Лопатникова Ю.А., Аутеншлюс А.И., Голикова Е.А., Киреев Ф.Д. и др. Аутоантитела к ФНО-альфа в норме и при патологии // Мед. акад. журн. – 2010. – Т. 10, № 5. – С. 212.
3. Новиков А.А., Александрова Е.Н., Диагтроптова М.А., Насонов Е.Л. Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита // Науч.-практ. ревматология. – 2010. – № 2. – С. 71 – 82.

4. Aggarwal B.B., Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during last decade // *Eur. Cytokine Netw.* — 1996. — Vol. 7. — P. 93–124.
5. Cañete J.D., Albaladejo C., Hernandez M.V., Lainez B. et al. Clinical significance of high levels of soluble tumour necrosis factor- α receptor-2 produced by alternative splicing in rheumatoid arthritis: a longitudinal prospective cohort study // *Rheumatology (Oxford)*. — 2011. — Vol. 50, N 4. — P. 721–728.
6. Cope A.P., Aderka D., Doherty M., Engelmann H. et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases // *Arthritis Rheum.* — 1992. — Vol. 35. — P. 1160–1169.
7. de Lemos Rieper C., Galle P., Hansen M.B. Characterization and potential clinical applications of autoantibodies against cytokines // *Cytokine & Growth Factor Reviews.* — 2009. — Vol. 20. — P. 61–75.
8. Fomsgaard A., Svenson M., Bendtzen K. Autoantibodies to tumour necrosis factor alpha in healthy humans and patients with inflammatory diseases and gram-negative bacterial infections // *Scand. J. Immunol.* — 1989. — Vol. 30, N 2. — P. 219–223.
9. Klimiuk P.A., Sierakowski S., Latosiewicz R., Cylwik J.P. et al. Circulating tumour necrosis factor α and soluble tumour necrosis factor receptors in patients with different patterns of rheumatoid synovitis // *Ann Rheum Dis.* — 2003. — Vol. 62. — P. 472–475.
10. Pennica D., Lam V.T., Mize N.K., Weber R.F. et al. Biochemical properties of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. Characterization of ligand binding, internalization, and receptor phosphorylation // *J. Biol. Chem.* — 1992. — Vol. 267, N 29. — P. 21172–21178.
11. Robak T., Gladalska A., Stepiec H. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis // *Eur. Cytokine Netw.* — 1998. — Vol. 9, N 2. — P. 145–154.
12. Tracey K.J., Czura C., Ivanova S. Mind over immunity // *The FASEB J.* — 2001. — Vol. 15. — P. 1575–1576.
13. Watanabe M., Kanji U., Kazuhide N., Bruce C. et al. High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: Pathogenesis and mechanisms // *Cytokine & Growth Factor Reviews.* — 2010. — Vol. 10, N 3. — P. 28.

Сведения об авторах

Голикова Елена Алексеевна – младший научный сотрудник лаборатории регуляции иммунорезиса, аспирант (630060, г. Новосибирск, ул. Экваторная, д. 2, кв. 164; тел.: (383) 222-19-10)

Лопатникова Юлия Анатольевна – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН

Шкаруба Надежда Сергеевна – врач-ревматолог отделения ревматологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН

Сизиков Алексей Эдуардович – заведующий отделением ревматологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Сенников Сергей Витальевич – заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

И.Н. Данусевич, Л.С. Козлова, Л.В. Сутурина, В.П. Ильин, И.С. Бекетова

СОСТОЯНИЕ ОСНОВНЫХ ЗВЕНЬЕВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЖЕНЩИН С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА И ПРИ ЕГО ОТСУТСТВИИ

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

Данное исследование посвящено изучению особенностей иммунной системы у женщин с репродуктивными нарушениями на фоне хронического эндометрита и при его отсутствии. Репродуктивные нарушения сопровождаются снижением противоинфекционной защиты организма, обусловленной вторичным иммунодефицитным состоянием, с характерной супрессорной активностью Т-лимфоцитов и изменениями в фагоцитарном звене иммунитета.

Ключевые слова: репродуктивные нарушения, хронический эндометрит, иммунитет

STATUS OF MAIN COMPONENTS OF IMMUNITY IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE DISORDERS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS AND IN ITS ABSENCE

I.N. Danusevich, L.S. Kozlova, L.V. Suturina, V.P. Iljin, I.S. Beketova

Research Center of Family Health Problems and Human Reproduction SB RAMS, Irkutsk

This study investigates the characteristics of immune response in women with reproductive disorders with chronic endometritis and in its absence. Reproductive disorders are accompanied by decrease of anti-infective protection of the organism with is associated with secondary immunodeficiency state with the suppressive activity of T-lymphocytes and changes of phagocytes chain of immune system.

Key words: reproductive disorders, chronic endometritis, immune system

Состояние репродуктивной функции обеспечивается эффективной деятельностью многих систем организма, в частности иммунной. При неосложненных процессах имплантации, беременности и развитии плода, как правило, протекают преимущественно гуморальные реакции иммунной системы, когда под влиянием изоантител, Т-лимфоцитов и натуральных киллеров, привлекаются в плаценту и выделяются цитокины, стимулирующие рост и дифференцировку тканей плода [9, 13]. В развитии нарушений репродуктивной функции большую роль играет патология эндометрия, особенно хронический эндометрит (ХЭ) [4, 8, 11]. У 59,9 % женщин с неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения в анамнезе отмечено наличие хронического эндометрита [1, 6]. Среди женщин с ХЭ в 60,4 % случаев диагностируется бесплодие [12]. При привычном невынашивании беременности у более 70 % женщин встречается ХЭ [3]. При хроническом воспалении в эндометрии происходит резкая активация клеточных и гуморальных реакций воспаления на локальном уровне, что приводит к нарушению процессов имплантации, инвазии и развития хориона и, в конечном итоге, к прерыванию беременности в случае ее наступления на фоне хронического эндометрита [8, 9]. Имеются немногочисленные данные о состоянии иммунитета при хронических заболеваниях органов малого таза.

В связи с этим, **целью исследования** явилось изучение состояния иммунитета (основных звеньев иммунитета) у пациенток с репродуктивными нарушениями при наличии и отсутствии хронического эндометрита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 19 пациенток с репродуктивными нарушениями без хронического эндометрита (ХЭ), 17 пациенток с репродуктивными нарушениями и гистологически подтвержденным диагнозом хронического эндометрита. Группу контроля составили 20 женщин с сохранной фертильностью. Критериями включения пациенток в исследование явились жалобы на бесплодие (первичное или вторичное), невынашивание беременности, неудачные попытки ЭКО и потери эмбриона, гистологическое подтверждение наличия хронического эндометрита. Из исследования были исключены пациентки с хроническими соматическими и аллергическими заболеваниями, пациентки с эндокринными факторами репродуктивных нарушений, с системными заболеваниями, в том числе с врожденной тромбофилией, антифосфолипидным синдромом, острыми воспалительными заболеваниями гениталий, а также получавшие иммуномодуляторы менее 6 месяцев тому назад. Все пациентки с хронической урогенитальной инфекцией на момент исследования находились в стадии ремиссии.

Исследование иммунного статуса с учетом всех показателей клеточного и гуморального иммунитета проводилось в лаборатории клинической иммунологии и иммунопрофилактики НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН. Показатели иммунитета определяли в периферической крови, подсчет иммунных клеток проводили на проточном цитофлуориметре (BD FACS KCALABUR). В исследовании использовали

методы математической статистики, реализованные в ППП STATISTICA 6.1 (Statsoft Inc, США). Статистическую обработку данных, имеющих распределение близкое к нормальному, проводили параметрическими критериями: Т-критерий Стьюдента и F-критерий Фишера. Различия средних величин считали значимыми при отсутствии различий по дисперсиям. Достоверность различий данных анамнеза оценивали по величине относительного риска (ОР) по формуле:

$$OP = A \times D / B \times C,$$

где А — число лиц из группы с хроническим эндометритом и имеющие изучаемый признак, С — не имеющие данный признак; В — число лиц из группы контроля, имеющих изучаемый признак; D — не имеющие изучаемый признак. Для оценки различий в группах для изучаемых признаков использовали критерий χ^2 для четырехпольной таблицы и одной степенью свободы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У пациенток исследуемых групп средний возраст достоверно не отличался и составил $30 \pm 4,2$ года. Все они были сопоставимы по массе тела, соматическому и гинекологическому статусу. Невынашивание беременности в анамнезе имели 59 % пациенток, а 41 % женщин жаловались на бесплодие: первичное было отмечено у 13 %, вторичное у 28 %.

При проведении обработки собранного анамнестического материала выявлено, что пациентки с хроническим эндометритом значительно чаще имели хронические заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (ОР = 2,9, $p(\chi^2) < 0,001$), почек (ОР = 2,7, $p(\chi^2) < 0,001$), ЛОР-органов (ОР = 2, $p(\chi^2) < 0,001$), перенесли аппендэктомию (ОР = 6, $p(\chi^2) < 0,001$). Нами отмечено, что лишь 4 % женщин основной группы использовали внутриматочную контрацепцию, а медицинские неосложненные аборт имели 21 % женщин (ОР = 1,5, $p(\chi^2) < 0,05$).

Из перенесенных инфекций, передающихся половым путем, хламидиоз встречался у 23 % случаев, трихомониаз — у 14 %. На момент обследования выявлены антитела класса G к цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ) у 32 %, антитела класса G к вирусу простого герпеса (ВПГ) встречались у 32 % пациенток, ассоциация ВПГ с ЦМВ — инфекцией имела место у 46 % женщин с высокими титрами антител класса G с низкой авидностью. Вирус простого герпеса (ВПГ) встречался у 20 % группы контроля (ОР = 1,5, $p(\chi^2) < 0,05$). Анализ микробного фактора показал, что 56,8 % женщин основной группы имели ассоциацию вирусов с условно-патогенной микрофлорой, из них: *Staph. epid.*, *Citobacter spp.*, *E. coli* — 14,3 %; уреаплазма — 42,8 %; у 14,3 % пациенток выделен *Staph. epid.*; *Candida alb.* — у 28,6 % женщин.

Известно, что Т-супрессоры регулируют развитие адекватного иммунного ответа, как на собственные, так и на чужие антигены, обеспечивая иммунологическую толерантность [5, 7]. У пациенток с репродуктивными нарушениями независимо от наличия или отсутствия хронического эндометрита, а также в сравнении с контролем, выявлено повышение абсолютного числа Т-лимфоцитов с супрессорной активностью. Кроме этого, отмечены изменения в фагоцитарно-макрофагальном звене иммунитета, отражающиеся в снижении показателей фагоцитоза, одного из основных звеньев в процессе воспаления, который обеспечивает гибель микроорганизмов. Гуморальное звено представлено снижением всех классов иммуноглобулинов, более выраженных у пациенток с хроническим эндометритом. Хочется отметить, что в нашем исследовании показатели клеточного иммунитета и фагоцитоза имели статистически значимые различия с аналогичными показателями у здоровых, но их уровни находились в рамках референтных значений, что указывать на новый устойчивый уровень взаимоотношений в организме.

Показатели основных звеньев иммунитета пациенток с репродуктивными нарушениями (при наличии и отсутствии хронического эндометрита) и группы контроля

Таблица 1

Показатели иммунитета	Пациентки с ХЭ (1) (n = 17) M ± m	Пациентки без ХЭ (2) (n = 19) M ± m	Группа контроля (3) (n = 20) M ± m	p (t-критерий)
Т-лимфоциты (кл/мл)	1738 ± 374	1733 ± 244	1390 ± 289	< 0,05 (1, 3) (2, 3)
Т-супрессоры (кл/мл)	596 ± 154	642 ± 132	471 ± 142	< 0,05 (1, 3) (2, 3)
Т-хелперы (кл/мл)	944 ± 291	1007 ± 187	907 ± 229	
ФАГ (%)	53 ± 10	54 ± 8,6	63 ± 7	< 0,001 (1, 3) (2, 3)
НСТ спонтанный (%)	5,53 ± 3,4	4,4 ± 3,4	8 ± 5,5	< 0,05 (2, 3)
НСТ индуцированный (%)	26,65 ± 7,7	23,8 ± 10,4	33,8 ± 12	< 0,05 (1, 3) (2, 3)
IgA (мг/мл)	0,95 ± 0,47	2,64 ± 1,1	2,47 ± 1,12	≤ 0,001 (1, 3), (1, 2), (2, 3)
IgM (мг/мл)	1,2 ± 0,6	2,41 ± 0,8	2,89 ± 0,86	≤ 0,001 (1, 3), (1, 2), (2, 3)
IgG (мг/мл)	9,36 ± 2,6	14,1 ± 3,1	13,5 ± 3,48	≤ 0,001 (1, 3), (1, 2), (2, 3)

У пациенток с репродуктивными нарушениями и хроническим эндометритом отмечено снижение фагоцитарной активности нейтрофилов, что подтверждается снижением показателя индуцированного НСТ теста и резким снижением уровня всех классов иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG ($p \leq 0,001$)) в сравнении с таковыми показателями у здоровых женщин. Полученные результаты информативны при вторичных иммунодефицитных состояниях, а их снижение при воспалительных заболеваниях свидетельствует о тяжести заболевания, высокой вероятности хронизации процесса и возможно рецидивирования [10]. Специфические антитела играют значительную роль в нейтрализации вирусов на этапе проникновения его через входные ворота в кровь до фиксации его на клетках-мишенях (IgG, IgM), или при первичном попадании его на эпителий слизистых (IgA). Антитела обеспечивают защиту от реинфекции. Отмечается угнетение гуморального звена иммунитета по трем классам иммуноглобулинов (IgA, M, G) у женщин с репродуктивными нарушениями при наличии хронического эндометрита в сравнении с группой здоровых женщин и женщин без хронического эндометрита. Можно предположить, что не срабатывает защитная функция секреторного IgA, что приводит к персистенции возбудителя в эндометрии [2, 11]. Методом многофакторного дискриминантного анализа показателей иммунограмм выявлены значимые изменения клеточного (Т-лимфоциты), гуморального (иммуноглобулины А, М, G) и фагоцитарно-макрофагального (фагоцитоз) звеньев иммунитета с информативностью 97 % у женщин с наличием хронического эндометрита.

У пациенток с репродуктивными нарушениями, но при отсутствии хронического эндометрита отмечено снижение показателя спонтанно НСТ теста ($p \leq 0,05$), так и показателя индуцированного НСТ теста ($p \leq 0,05$) с достоверным уменьшением иммунорегуляторного индекса ($p \leq 0,001$) при адекватном ответе гуморального звена иммунитета. Достоверные изменения фагоцитарно-макрофагального (фагоцитоз) и клеточного (Т-супрессоры) звеньев определены методом многофакторного дискриминантного анализа у женщин при отсутствии хронического воспаления в эндометрии с информативностью 90 %.

ВЫВОДЫ

Таким образом, репродуктивные нарушения сопровождаются снижением противоинфекцион-

ной защиты организма, обусловленной вторичным иммунодефицитным состоянием, с характерной супрессорной активностью Т-лимфоцитов и снижением иммунного ответа в фагоцитарном звене иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адо А.Д., Адо М.А., Пыцкой В.И., Порядин Г.В. и др. Патологическая физиология. — М.: Триада-Х, 2000. — 574 с.
2. Баранов В.Н. Хронические воспалительные заболевания матки и их отдаленные последствия: особенности патогенеза, клинко-морфологическая характеристика, лечение и медицинская реабилитация: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Челябинск, 2002. — 21 с.
3. Дубницкая Л.В., Назаренко Т.А. Хронический эндометрит: возможности диагностики и лечения // Consilium medicum. — 2007. — Т. 9, № 6. — С. 25—28.
4. Марченко Л.А. Генитальная герпетическая инфекция у женщин (клиника, диагностика, лечение): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1997. — 18 с.
5. Никулин Б.А. Оценка и коррекция иммунного статуса. — М., 2008. — С. 376.
6. Ремезов А.П. Системная энзимотерапия в комплексном лечении хронической хламидийной инфекции и простого герпеса с преимущественно генитальными поражениями // Венеролог. — 2005. — № 12. — С. 52—55.
7. Ройт А. Основы иммунологии: пер. с англ. — М., 1991. — 86 с.
8. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. — М.: Триада-Х, 2005. — 304 с.
9. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Иммунология беременности. — М.: РАМН, 2003. — 400 с.
10. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: рук. для врачей. — М.: ГЭОТАР — Медиа, 2009. — 352 с.: ил.
11. Шуршалина А.В. Роль хронического эндометрита в развитии патологии репродуктивной функции // Рос. мед. журн. — 2007. — № 4. — С. 25—27.
12. Joyce S. Natural T cell Cranking up the immune system by prompt cytokine secretion // PNAS. — 2000. — Vol. 97, N 13. — P. 6933—6935.
13. Rusbworlb F.H., Backos M., Rai R. Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarries with thyroid // Hum Reprod. — 2000. — Vol. 15, N 7. — P. 1637—1639.

Сведения об авторах

Данусевич Ирина Николаевна — научный сотрудник лаборатории гинекологической эндокринологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, кандидат медицинских наук (664003, г. Иркутск ул. Тимирязева, 16; тел.: 8(3952)20-73-67, факс: 8(3952) 20-76-36; e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru)

Козлова Любовь Сергеевна — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Сутурина Лариса Викторовна — заведующая отделом охраны репродуктивного здоровья ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Ильин Владимир Петрович — ведущий научный сотрудник лаборатории гормональных исследований ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, доктор биологических наук, профессор

Бекетова Инга Степановна — врач-лаборант лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Т.И. Долгих, Ю.И. Тирская, С.В. Барinov, Т.Н. Белкова

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ВНУТРИУТРОБНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ ПЛОДА

Омская государственная медицинская академия (Омск)

В результате проведенных исследований установлена значимость иммунологических критериев для прогноза внутриутробной инфекции. Проведено сравнительное исследование показателей иммунной и цитокиновой системы у женщин группы риска развития внутриутробной инфекции (ВУИ). Показано, что реализация ВУИ сопровождается повышением содержания провоспалительных цитокинов в крови матери и активацией фагоцитарного звена. С учетом полученных результатов составлен алгоритм ведения женщин группы риска.

Ключевые слова: внутриутробная инфекция, цитокины, факторы риска

IMMUNOLOGIC MARKER OF INTRANATAL INFECTIONS

T.I. Dolgikh, Yu.I. Tirskaia, S.V. Barinov, T.N. Belkova

Omsk State Medical Academy, Omsk

The results of the research established determination of immunologic marker for prognosis of intranatal infection. The authors performed a comparative study of the immunity values of women in a risk group for prenatal infection. As it was shown when prenatal infection develops, there is an increase in the content of proinflammatory cytokines in the pregnant woman serum and activation of the ingestion rate. Account the results to devise an algorithm the pregnant woman care.

Key words: prenatal infection, cytokines, risk factor

В России подтвержденная частота перинатальной смертности в результате инфекционно-воспалительных процессов составляет около 10,1 %, уступающая только внутриутробной асфиксии и врожденным аномалиям. Новорожденные с клиническими проявлениями инфекции требуют дорогостоящей терапии и последующей реабилитации, которая полностью не исключает хронизации процесса и даже полной инвалидизации ребенка.

В связи с большой распространенностью и возможными тяжелыми клиническими последствиями ВУИ особое значение приобретает разработка методов прогнозирования и диагностики внутриутробного инфицирования плода. Сложность проблемы прогноза и антенатальной диагностики ВУИ обусловлена как широким набором микроорганизмов, способных вызвать ВУИ, так и малой клинической выраженностью инфекционных процессов [1, 2].

Цель исследования: изучить иммунологические критерии внутриутробного инфицирования у беременных группы риска, плода и новорожденного.

Работа выполнялась в рамках темы Минздравсоцразвития России «Изучение инфекционной перинатальной патологии» (Приказ от 20.05.2009 г. № 257).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено открытое, когортное, проспективное, продленное, контролируемое исследование пар мать-новорожденный группы риска ВУИ. Исследование матерей осуществлялось с 22 недель гестации.

Определение ДНК потенциальных возбудителей: Herpes simplex virus 1/2 (HSV-1 и 2),

Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus, (EBV), Human herpes virus-6 (HHV-6), Toxoplasma gondii (T. gondii) — проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наборах «ДНК-сорб-АМ» и «ДНК-сорб-В».

Субпопуляционный состав лимфоцитов крови изучали на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC 500» «Вектор-Бест» (Новосибирская обл.).

Статистическая обработка осуществлялась с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA-6», стандартных математических таблиц «Microsoft Excel» и авторской программы для ЭВМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обследование беременных группы риска по ВУИ осуществлялось с 22 недель гестации. Отбор беременных осуществлялся по данным анамнеза (септические осложнения абортa и родов, неразвивающаяся беременность, рождение детей с ВУИ, преждевременные роды, перинатальные потери); на основании данных об осложнениях данной беременности (вирусно-бактериальная инфекция, герпесвирусные инфекции в стадии активации и первичное инфицирование, проявление инфекционной патологии репродуктивного тракта, респираторно-вирусные заболевания); при наличии очагов экстрагенитальной инфекции; а так же на основании наличия ультразвуковых маркеров ВУИ (задержка развития плода, нарушение плодово-плацентарного кровотока, многоводие/маловодие, пиелоктазия у плода, утолщение плаценты, взвесь в околоплодных водах). Проводилось оценка клеточного звена иммунитета, исследовался уровень провоспалительных и противовоспалитель-

ных цитокинов, осуществлялась этиологическая расшифровка [7].

После рождения, на первые сутки, проводилось дообследование новорожденных, по результатам которого проводилось распределение на детей на группы и ретроспективная оценка результатов обследования матерей.

Внутриутробное инфицирование было установлено у 42 % детей (основная группа), из которых в 12 % на основании наличия клинических симптомов был выставлен диагноз ВУИ, а у остальных подтвержден факт внутриутробного инфицирования без клинических проявлений болезни. В зависимости от наличия (отсутствия) клинических проявлений детей распределили на две группы: основная группа — дети с ВУИ; группа сравнения — дети с инфицированием, без клинических проявлений ВУИ.

В контрольную группу были включены 18 здоровых беременных женщин с нормально протекающей беременностью и их новорожденные, обследование проводилось на тех же сроках, что и пациенток основной группы и группы сравнения.

В группе новорожденных с диагнозом ВУИ преждевременно родились 76,47 % детей (средний срок гестации составил $31 \pm 3,4$ недели). При этом в 76 % случаев причиной преждевременных родов явилось дородовое излитие околоплодных вод, в 11 % развилась спонтанная родовая деятельность, не поддающаяся медикаментозной коррекции, и в оставшихся случаях досрочно было проведено оперативное родоразрешение. Среди показаний к оперативному родоразрешению преобладала острая гипоксия плода (23 %). В анамнезе течения беременности у данной подгруппы пациенток отмечено проведение неоднократных курсов сохраняющей терапии. У каждого второго ребенка диагностировали тяжелую или средней степени тяжести асфиксию, при этом ее частота у доношенных была в 3 раза выше по сравнению с доношенными ($p = 0,000$).

В группе с гематогенным вариантом инфицирования у 23,53 % новорожденных отмечалась клиника поражения ЦНС в виде менингоэнцефалита и органического поражения головного мозга. При этиологической расшифровке из крови и/или ликвора была детектирована ДНК следующих патогенов: EBV — в 50 % случаев; HSV 1, 2 типа — в 6,25 %; HHV-6 — в 12,5; CMV — в 6,25 % случаев. Частота микст-инфекции при различных ассоциациях возбудителей составила 12,5 %. При герпес-вирусной инфекции отмечалось более раннее начало заболевания — на 5–7-й день жизни, острое течение с повышением температуры тела, гипертензионным синдромом, нарушением микроциркуляции, гепатолиенальным синдромом, без специфических высыпаний на коже и слизистых, в ряде случаев с поражением кишечника в виде некротизирующего энтероколита. При исследовании ликвора определялся сегментоядерный цитоз со сменой на лимфоцитарный на фоне специфической терапии. При стандартном бактериологическом исследовании

ликвора во всех случаях получен отрицательный результат [4].

При восходящем варианте инфицирования выявлялись следующие возбудители: уреаплазменная инфекция — в 57,14 %; *E. coli* — в 14,2 %; *E. faecalis* — в 7,14 %; *E. faecium* — в 28,5 %; *Klebsiella* — в 21,4 %; *Staph. pyogenus* — в 7,14 %; *Strep. mutans* — в 14,2 %; коагулазонегативные стафилококки — в 14,2 %. Частота микст-инфекции при различных ассоциациях возбудителей составила 28,57 %. В случаях восходящего инфицирования клинические проявления пневмонии зарегистрированы в 17,6 %, энтероколита в 11,8 %; поражения кожи и слизистых оболочек, такие как омфалит, конъюнктивит, везикулез различной степени выраженности встречались в 70,6 % случаев. У 29,4 % новорожденных имелось сочетание нескольких инфекционных очагов. Необходимо отметить, что при подтверждении восходящего пути инфицирования у всех матерей в той или иной степени выявлялись нарушения видового состава вагинальной микрофлоры на момент данной беременности и в анамнезе женщины отмечали неоднократные курсы лечения воспалительных заболеваний нижнего отдела репродуктивной системы [4].

Результаты проведенного исследования клеточного звена иммунитета беременных представлены в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о повышении ($p = 0,001$) лимфоцитов с фенотипом CD3 + CD16 + /CD56 + (Т-NK), CD3 + /CD4 + и снижение CD3 + /CD8 + в группе пациенток родивших детей с ВУИ, по остальным показателям достоверных различий между группами выявлено не было. При этом отмечается более высокий уровень Т-NK клеток у женщин с гематогенным вариантом инфицирования (табл. 2).

Результаты исследования уровня цитокинов (TNF и интерлейкинов (IL): IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) представлены в табл. 1.

Уровень IL-1 β был в 15 раз выше в основной группе ($p = 1e^{-04}$) по сравнению с контрольной и в 11 раз выше, чем в группе сравнения (табл. 1). Активность TNF α в группе сравнения была в 12 раз ниже по сравнению ($p = 1e^{-04}$) с пациентками в основной группе, родивших детей с ВУИ. При анализе уровня IL-10 отмечается ($p = 1e^{-04}$) снижение его количества у беременных основной группы по сравнению с группой контроля и группой сравнения. Особого внимания заслуживают результаты, полученные при исследовании уровня ИФН- γ (табл. 1). У женщин основной группы, родивших детей с ВУИ уровень ИФН- γ как спонтанного ($p = 0,002$) так и стимулированного ($p = 0,022$) был значительно ниже, чем в группе сравнения и контроля.

При оценке состояния цитокиновой системы у пациенток с различными вариантами реализации перехода возбудителей к плоду отмечено существенно повышение значения провоспалительных цитокинов в группе с гематогенным типом инфицирования в отличие от восходящего (табл. 2). Так уровень IL-1 β в группе с гематогенным инфицированием был в 2 раза ($p = 1e^{-04}$) выше по сравнению

Таблица 1

Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов и уровень цитокинов периферической крови беременных (Me(Q₁;Q₂))

Показатели	Контрольная группа (n = 18)	Группа сравнения (n = 52)	Основная группа (n = 35)
CD3+	68,0 (60,5; 76,5)	68,2 (54,6; 74,4)	66,8 (59,8; 73,8)
CD3+/CD4+	30,6 (28,8; 34,7)	31,03 (25,5; 33,6)	34,01 (30,2; 40,1)*
CD3+/CD8+	31,6 (30,0; 37,0)	32,4 (27,6; 36,8)	28,4 (24,8; 31,5)*
CD19+/CD20+	12,5 (9,18; 15,3)	10,6 (9,22; 12,6)	11,2 (6,0; 15,5)
CD3+CD16+/ CD56+	8,85 (6,5; 11,7)	8,4 (6,5; 12,5)	12,2 (9,83; 17,2)*
CD5+/CD19+	1,05 (0,25; 1,4)	1,1 (0,1; 2,1)	1,1 (0,25; 2,35)
T-лимф. HLA-DR	6,8 (6,2; 12,5)	9,45 (5,2; 11,9)	6,45 (5,0; 10,2)
CD14+/HLA-DR+	81,6 (80,1; 85,4)	84,9 (76,8; 90,8)	81,5 (77,3; 89,9)
ИНФγ спонтан.	114 (75,7; 181)	71,85 (51,6; 125,4)	10,92 (3,08; 16,9)*
ИНФγ стимул.	1640 (1540; 1700)	1374,6(1030,2; 1660,1)	1130,4 (902; 1550)*
IL-1β	6,12 (2,3; 8,5)	8,38 (6,82; 12,35)	91,26 (74,1; 111,6)*
IL-6	3,2 (1,1; 8)	13,6 (7,17; 24,1)	12,4 (4,3; 32,2)
IL-8	18,4 (5,58; 35,1)	58,3 (26,4; 108)	50,3 (7; 122)
IL-10	26,2 (12,4; 38,6)	15,52 (12,5; 20,5)	4,19 (3,1; 4,95)*
TNFα	4,1 (1,35; 14,6)	6,8 (2,2; 8,85)	80,83 (61,6; 72,7)*

Примечание: * – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой и группой сравнения. Me – медиана, Q₁ – нижний квартиль, Q₂ – верхний квартиль.

Таблица 2

Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов и уровень цитокинов периферической крови беременных родивших детей с ВУИ

Показатели	Гематогенное (n = 16)	Восходящее (n = 14)	Смешанное (n = 5)
CD3+	69,6 (65,49÷73,64)	63,3 (57,49÷69,09)	67,0 (53,12÷80,89)
CD3+/CD4+	36,8 (31,82÷41,69)	31,0 (27,69÷34,22)	33,8 (23,75÷43,81)
CD3+/CD8+	27,5 (24,12÷30,79)	28,8 (24,01÷33,68)	30,5 (26,37÷34,63)
CD19+/CD20+	11,5 (8,7÷14,31)	9,7 (6,92÷12,48)	13,7 (7,41÷20,08)
CD5+/CD19+	1,48 (0,84÷2,11)	2,93 (1,25÷6,11)	0,92 (0,49÷2,33)
HLA-DR+	7,21 (4,69÷9,71)	9,3 (5,67÷12,94)	5,61 (2,99÷8,23)
ИРИ	2,23 (1,0÷3,25)	1,11 (0,85÷1,32)	1,11 (0,79÷1,43)
CD3+CD16+/CD56+	15,82* (8,21÷17,42)	11,18 (9,11÷13,23)	12,67 (9,03÷14,41)
ИНФγ спонтан.	7,04 (3,01÷9,51)	12,3 (7,25÷17,36)	19,7 (5,15÷26,23)
ИНФγ стимулир.	1060,0(820,5÷1307,23)	1300 (1030÷1590)	1050 (576,64÷1521,81)
IL-1β	122 (95,32÷149,48)	59,5* (44,06÷74,92)	80,6* (58,61÷102,51)
IL-6	29 (17,51÷40,58)	9,29* (3,73÷14,84)	19,6* (1,16÷40,28)
IL-8	97,4 (47,46÷147,26)	51,5* (28,09÷74,92)	53,5* (18,24÷125,16)
IL-10	3,99 (1,05÷6,48)	5,52 (3,25÷9,05)	1,14 (0,7÷4,2)
TNFα	84,0 (41,9÷144,48)	87,2 (46,9÷72,8)	52,9* (34,84÷71,04)
Лактоферрин	1230 (894,64÷1557,58)	1290 (891,2÷1698,5)	1690 (513÷3190)
CD14+/HLA-DR+	81,3 (75,46÷87,18)	85,9 (82,16÷89,65)	77,6 (65,34÷89,78)
Признак: ВУИ: гематогенное/восходящее ИЛ-1β $p = 1e-04$ ИЛ-6 $p = 0,005$ ИЛ-8 $p = 0,003$ CD3+CD16+56+ $p = 0,0019$		Признак: ВУИ: гематогенное/смешанное ИЛ-1β $p = 0,011$ ИЛ-6 $p = 0,001$ ИЛ-8 $p = 0,043$ ФНО $p = 0,004$	

уровнем данного показателя в группе с восходящим вариантом инфицирования. Та же закономерность присутствует при анализе уровней IL-6 и IL-8. В груп-

пе с гематогенным вариантом инфицирования показатели IL-6 в 3 раза выше ($p = 0,005$), чем при восходящем пути инфицирования. IL-8 при гематогенном

инфицировании почти в 2 раза выше ($p = 0,003$) чем при восходящем. В тоже время при смешанном типе инфицирования плода уровень провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) был в среднем в 1,5 раза ниже, чем при гематогенном, но значимо ($p < 0,05$) превышал аналогичные показатели при восходящем пути инфицирования. Возможно, это связано с недостаточностью иммунного ответа при сочетанной инфекции. Уровни ИФН γ , лактоферина, IL-10, существенного различия не имели в зависимости от типа внутриутробного инфицирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало повышение CD3 + CD16 + / CD56 + (T-NK) в группе женщин с реализацией ВУИ, что свидетельствует об усиленной киллерной активности лимфоидных клеток. У женщин, родивших детей с ВУИ, показатели провоспалительных цитокинов (IL-1 β ; TNF α) были значимо выше, чем у женщин из группы сравнения, что свидетельствует об активации фагоцитоза. Превышение определенного порогового значения данных факторов во время беременности является одним из механизмов, запускающих развитие патологических реакций, приводящих к срыву адаптации способствующих развитию таких осложнений как преждевременное прерывание беременности, антенатальная гибель плода [1, 3, 8].

Снижение уровня IL-10 у беременных основной группы приводила к нивелированию его ингибирующей роли в воспалительной реакции и свидетельствовала о нарушении процессов адаптации иммунорегуляторных механизмов при развитии инфекции.

Снижение уровня ИФН- γ у женщин с реализацией ВУИ у их новорожденных свидетельствовала о несостоятельности противовирусного ответа у беременных при высокой антигенной нагрузке и, как следствие, об увеличении риска проникновения возбудителей от матери к плоду.

Проведенное исследование показало, что реализация ВУИ сопровождается нарушением соотношения про- и противовоспалительных цитокинов, достоверным повышением содержания TNF α , IL-1 β , и снижением IL-10 и ИФН γ в сыворотке крови беременных с внутриутробным инфицированием плода (в отличие от группы сравнения). Риск развития внутриутробной патологии у новорожденного был высоким при повышении уровня TNF α более 24,35 pg/ml, а IL-1 β — более 19,25 pg/ml.

Сведения об авторах

Долгих Татьяна Ивановна — заведующая Центральной научно-исследовательской лаборатории ОмГМА, доктор медицинских наук, профессор

Тирская Юлия Игоревна — ассистент кафедры акушерства и гинекологии № 2 ОмГМА, кандидат медицинских наук (644001, г. Омск, ул. Б. Хмельницкого, 126-36; тел.: 8913-145-28-17; e-mail: yulia.tirskaya@yandex.ru)

Баринин Сергей Владимирович — заведующий кафедрой акушерства и гинекологии №2 ОмГМА, доктор медицинских наук, профессор

Белкова Татьяна Николаевна — доцент кафедры педиатрии ПДО ОмГМА, кандидат медицинских наук

Таким образом, проведенные исследования позволили сделать вывод о том, что реализация ВУИ сопровождается достоверным повышением уровня провоспалительных цитокинов параллельно со снижением противовоспалительных цитокинов, что может быть использовано в качестве критериев прогноза развития инфекционного процесса у плода и новорожденного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бубнова Н.И., Тютюнник В.А., Михайлова О.И. Репродуктивные потери при декомпенсированной плацентарной недостаточности, вызванной инфекцией // Акушерство и гинекология. — 2010. — № 4. — С. 55–58.
2. Буданов П.В., Стрижаков А.Н. Этиология, патогенез, диагностика и лечение внутриутробной инфекции // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2010. — Т. 9, № 3. — С. 61–71.
3. Буданов П.В., Стрижаков А.Н., Малиновская В.В., Казарова Ю.В. Дискоординация системного воспаления при внутриутробной инфекции // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2009. — Т. 8, № 2. — С. 61–68.
4. Долгих Т.И., Шелев М.В., Нестеренко Э.В., Белкова Т.Н. Иммунофенотипирование лимфоцитов крови новорожденных детей различного срока гестации с внутриутробной инфекцией // Мед. иммунология. — 2010. — Т. 12, № 4–5. — С. 417–420.
5. Кулаков В.И., Сухих Г.Т., Кан Н.Е., Верясов В.Н. и др. Содержание цитокинов в амниотической жидкости, пуповинной крови и сыворотке крови женщин с внутриутробной инфекцией // Акушерство и гинекология. — 2005. — № 5. — С. 14–17.
6. Пастман Н.М., Черных Е.Р., Хонина Н.А., Дударева А.В. и др. Иммунный статус женщин группы высокого риска по преждевременному прерыванию беременности // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2010. — Т. 9, № 4. — С. 28–32.
7. Тирская Ю.И., Белкова Т.Н., Рудакова Е.Б., Долгих Т.И. и др. Врачебная тактика при внутриутробных инфекциях // Акушерство и гинекология. — 2011. — № 8. — С. 42–47.
8. Чистякова Г.Н., Газилова И.А., Ремизова И.И., Черданцева Г.А. и др. Оценка цитокинового профиля при физиологической и патологически протекающей беременности // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, № 1. — С. 3–8.

И.П. Иванова, И.В. Савкин, Г.В. Селедцова, А.А. Шишков, В.И. Селедцов

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ЦИТОКИНЫ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ У БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ ПОСЛЕ Т-КЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

ИИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)
Инновационный парк БФУ им. И. Канта (Калининград)

Пациенты с рассеянным склерозом (РС) были пролечены с использованием вакцины, состоящей из аутологичных, миелин-реактивных Т-клеток. Установлено, что у больных РС по сравнению со здоровыми людьми содержание CD8+CD45RO+CD62L- эффекторных Т-клеток памяти, а также количество центральных CD4+CD45RO+CD62L+ и CD8+CD45RO+CD62L+ Т-клеток памяти было достоверно увеличено. Проведение Т-клеточной вакцинации не оказывало существенного влияния на субпопуляционный состав Т-клеток памяти. Однако, после лечения у вакцинированных пациентов наблюдалось достоверное (в 2 раза) снижение относительного количества CD4+IFN γ +IL-4- и CD8+IFN γ +IL-4-клеток памяти, а также значительное (в 6 раз) уменьшение числа CD4+ клеток памяти, продуцирующих оба цитокина.

Ключевые слова: Т-клетки памяти, рассеянный склероз

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND INTRACELLULAR CYTOKINES OF MEMORY T-CELLS IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS AFTER T-CELL VACCINATION

I.P. Ivanova, I.V. Savkin, G.V. Seledtsova, A.A. Shishkov, V.I. Seledtsov

Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk
Innovation Center of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

Multiple sclerosis (RS) patients were treated with a vaccine consisted of autological myelin-reactive T-cells. Effector memory CD8+ CD45RO+CD62L- T-cells as well as central memory CD4+ CD45RO+CD62L+ and CD8+ CD45RO+CD62L+ T-cells were significantly increased in MS patients as compared with levels in healthy individuals. T-cells vaccination had no effect on the T-cells memory subpopulation composition. However, vaccine-treated RS patients had significant (by 2 fold) reduction of relative quantity of CD4+IFN γ +IL-4- and CD8+IFN γ +IL-4- memory T-cells, as well as suppression by 6 fold of CD4+ memory cells number, which produce both kinds of cytokines.

Key words: memory T-cells, multiple sclerosis

Аутоиммунный процесс, опосредуемый Т-хелперами I типа, лежит в основе патогенеза таких заболеваний как рассеянный склероз (РС), ревматоидный артрит, аутоиммунный тиреоидит. В литературе накапливаются данные о важной роли в развитии аутоиммунного заболевания Т-клеток памяти с фенотипом CD4⁺ CD45RO⁺ и CD8⁺ CD45RO⁺. Показано, что на стадии обострения количество этих клеток на периферии может возрасти в несколько раз и есть вероятность, что именно они являются локомотивами иммунопатологического процесса [2, 5, 8, 9].

Фенотипическим признаком дифференцировки наивных Т-клеток в Т-клетки памяти принято считать появление на клеточной поверхности изоформы CD45RO⁺ взамен изоформы CD45RA⁺. На сегодняшний день Т-клетки памяти подразделяются на центральные и эффекторные. Первые являются долгоживущими, тогда как вторые — относительно короткоживущими. Подобно наивным Т-лимфоцитам, долгоживущие центральные клетки памяти (ЦКП) экспрессируют на своей поверхности молекулу CD62L (лектин типа С) и хемокиновые рецепторы CCR7, которые способствуют их миграции в лимфоидные ткани. Эффекторные Т-клетки памяти (ЭКП) экспрессируют на своей

поверхности хемокиновые рецепторы CCR3, способствующие их проникновению в нелимфоидные органы и ткани. Активированные ЭКП обладают цитотоксичностью и продуцируют интерферон-гамма. Если ЭКП служат для немедленной защиты от воздействия антигена на периферии, то ЦКП обеспечивают защиту от системных воздействий. При повторной встрече с антигеном именно ЦКП, обладая повышенной пролиферативной активностью, могут генерировать большое количество терминально дифференцированных эффекторных Т-клеток, которые инфильтрируют периферические ткани и очищают их от антигена [2].

Является очевидным то, что элиминация аутоиммунных Т-лимфоцитов из организма должна лежать в основе патогенетического лечения аутоиммунных заболеваний. Один из наиболее реальных путей к достижению этой цели связан с возможностью стимуляции у больного антиидиотипического иммунного ответа, направленного на вариабельные фрагменты (идиотипы) антигенных рецепторов патогенных лимфоцитов. В экспериментальных моделях, а также в ряде клинических исследований показано, что вакцинация аутоантиген-реактивными клонированными Т-лимфоцитами или Т-клеточными линиями может быть эффективна

в лечении аутоиммунного энцефаломиелита, аутоиммунного увеита, аутоиммунного тиреоидита рассеянного склероза и ревматоидного артрита [3, 4, 6].

Механизм влияния Т-клеточной вакцинации на аутоиммунный процесс включает в себя несколько основных компонентов: 1) генерацию антиидиотипических цитотоксических CD8 + Т-лимфоцитов; 2) генерацию антиидиотипических CD4 + Th2 и Th3; 3) индукцию и стимуляцию функциональной активности Т-reg; и 3) индукцию синтеза антиидиотипических антител. Возможно, что Т-клеточная вакцинация также способна влиять на механизм формирования иммунной памяти [6, 7, 10].

Целью нашего исследования стало изучение фенотипических характеристик различных популяций Т-клеток памяти и количественная оценка содержания CD4 + и CD8 + Т-клеток памяти, продуцирующих внутриклеточные цитокины IFN γ и IL4, у больных рассеянным склерозом до и после проведения Т-клеточной вакцинации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические и экспериментальные исследования проводились в соответствии с протоколом, утвержденным Ученым советом и Этическим комитетом Института клинической иммунологии СО РАМН. От каждого больного, участвующего в исследовании, было получено информированное согласие. В исследование было включено 11 больных РС (7 женщин, 4 мужчин) в возрасте с 28 до 43 лет. Способ приготовления индивидуальной Т-клеточной вакцины описан нами ранее [1]. Контрольную группу составили 6 здоровых доноров, сопоставимых по возрасту. Схема иммунотерапевтического лечения Т-клеточной вакциной включала в себя 4 еженедельных подкожных вакцинации и последующие вакцинации с интервалом в 1 месяц. Вакцинальная доза варьировала в пределах $2,0 - 4,0 \times 10^7$ клеток.

Для иммунологического исследования у больных забирали 20 мл периферической крови перед вакцинацией, а также через 1 – 1,5 года после её на-

чала. Поверхностные маркеры выделенных мононуклеарных клеток определяли с помощью меченных фикоэритрином (PE) моноклональных антител (МА) LT4 (CD4) и LT8 (CD8), («Сорбент», Москва), конъюгированных с флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) МА к CD45RO («eBioscience», США), APC-меченных анти-CD62L МА («eBioscience», США). В соответствии с наличием или отсутствием на клеточной поверхности соответствующих молекул определяли следующие клеточные популяции: «наивные» клетки – (CD45RO-CD62L +), центральные клетки памяти – (CD45RO + CD62L +), эф- фекторные клетки памяти – (CD45RO + CD62L –). В таблице указан процент каждой популяции от общего числа лимфоцитов.

Для оценки относительного количества цито- кин-продуцирующих клеток памяти использовали меченные PE CP МА к CD4 и CD8 («eBioscience», США) и конъюгированных с APC МА к CD45RO («eBioscience», США). IFN γ - и IL-4-продуцирующие Т-клетки оценивали с помощью меченных FITC МА к IFN γ и меченных PE МА к IL-4 («eBioscience», США). Процент позитивных клеток определяли на иммуноцитометре «FACS Calibur» («Becton Dickinson») с использованием программы «CELLQuest» («Becton Dickinson»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования нами обнаружено, что у как у здоровых лиц, так и у больных РС количество «наивных» CD4 + CD45RO-CD62L + и CD8 + CD45RO-CD62L + достоверно не различалось (табл. 1).

В то же время, у больных РС содержание CD8 + CD45RO + CD62L- эф- фекторных клеток памяти было увеличено в 4 раза, а количество центральных CD45RO + CD62L + клеток памяти было значительно увеличено как среди CD4 +, так и среди CD8 + Т-клеток (табл. 1).

Наши исследования указывают, что при РА может иметь место ускоренная дифференцировка

Таблица 1

Содержание Т-клеток памяти у больных рассеянным склерозом до и после лечения Т-клеточной вакциной

	Доноры n = 10	Больные РС до лечения n = 11	Больные РС после лечения n = 11
CD4+	45,46 ± 3,27	40,67 ± 1,39	35,66 ± 3,13
CD4+CD45RO+CD62L+	1,11 ± 0,48	4,89 ± 0,56**	3,35 ± 0,94
CD4+CD45RO+CD62L-	9,28 ± 4,16	7,64 ± 1,38	8,65 ± 2,58
CD4+CD45RO-CD62L+	10,18 ± 3,86	6,55 ± 0,54	9,09 ± 2,61
CD4+CD45RO-CD62L-	24,1 ± 5,7	19,06 ± 3,79	14,78 ± 4,11
CD8+	18,1 ± 1,12	21,98 ± 3,25**	15,41 ± 2,80
CD8+CD45RO+CD62L+	0,1 ± 0,03	0,37 ± 0,10**	0,52 ± 0,18
CD8+CD45RO+CD62L-	0,31 ± 0,07	1,28 ± 0,3**	1,45 ± 0,34
CD8+CD45RO-CD62L+	3,93 ± 1,29	4,67 ± 1,37	2,78 ± 0,86
CD8+CD45RO-CD62L-	11,47 ± 1,77	14,61 ± 2,32	9,91 ± 2,02

Примечание: ** – $p < 0,01$ – статистическая значимость различий показателей при сравнении группы доноров и больных до начала лечения, (непарный t-тест).

Таблица 2

Содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти, продуцирующих внутриклеточные IFN γ и IL-4, у больных рассеянным склерозом до и после лечения Т-клеточной вакциной

	Группа больных РС до лечения n = 10	Группа больных РС после лечения n = 10
CD4+	45,59 $\pm$ 5,77	35,11 $\pm$ 8,05
CD4+/CD45RO+/IFN γ /IL4-	8,60 $\pm$ 3,64	3,72 $\pm$ 1,23*
CD4+/CD45RO+/IFN γ /IL4+	2,68 $\pm$ 1,09	1,53 $\pm$ 0,49
CD4+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	8,69 $\pm$ 4,91	1,41 $\pm$ 1,01***
CD4+/CD45RO-/IFN γ /IL4-	1,93 $\pm$ 0,9	0,95 $\pm$ 0,84**
CD4+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	0,96 $\pm$ 0,29	0,39 $\pm$ 0,13
CD4+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	0,48 $\pm$ 0,22	0,31 $\pm$ 0,13
CD8+	29,49 $\pm$ 3,52	20,23 $\pm$ 4,27
CD8+/CD45RO+/IFN γ /IL4-	11,1 $\pm$ 4,23	5,87 $\pm$ 1,84*
CD8+/CD45RO+/IFN γ /IL4+	4,39 $\pm$ 2,48	2,01 $\pm$ 1,16
CD8+/CD45RO+/IFN γ /IL4+	1,47 $\pm$ 0,84	0,79 $\pm$ 0,40
CD8+/CD45RO-/IFN γ /IL4-	7,48 $\pm$ 2,09	3,42 $\pm$ 1,2
CD8+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	1,43 $\pm$ 0,56	0,69 $\pm$ 0,27
CD8+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	0,74 $\pm$ 0,25	0,45 $\pm$ 0,19

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,005$ – статистическая значимость различий по сравнению с исходным уровнем (непарный t-тест).

«наивных» клеток в центральные CD4+ и CD8+ Т-клетки памяти и цитотоксические эффекторные CD8+ Т-клетки, которая отражает антигенспецифическую экспансию Т-клеток в ответ на повторные, системные воздействия антигена [8, 9].

После проведения Т-клеточной вакцинации в течение 1 года или 1,5 лет существенных изменений субпопуляционного состава клеток памяти отмечено не было, так как их количественные характеристики были близки к исходным величинам.

Вместе с тем, у вакцинированных пациентов с РС наблюдалось достоверное снижение (в 2 раза) числа IFN γ -продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти, а также значительное снижение (в 6 раз) числа CD4+ Т-клеток памяти, продуцирующих оба цитокина (табл. 2). Этот эффект, по-видимому, был стойким, так как регистрировался у больных, находящихся на лечении длительное время.

Таким образом, иммунотерапия аутологичными антиген-реактивными клетками у больных РС приводит к снижению количества IFN γ -продуцирующих клеток памяти, что может свидетельствовать о функциональной перестройке миелин-реактивных Т-клеток и включении неспецифических иммунных механизмов в торможение иммунопатологического процесса. Наши данные указывают на значительный иммунорегуляторный потенциал Т-клеточной вакцинации, которая в перспективе может найти широкое применение в лечении аутоиммунных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова И.П., Селедцов В.И., Банул Н.В., Самарин Д.М. и др. Получение Т-клеточной вак-

цины и ее применение для лечения рассеянного склероза // Мед. иммунология. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 27–32.

2. Селедцов В.И., Литвинова Л.С., Гончаров А.Г., Шуплецова В.В. и др. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 9–15.

3. Селедцов Д.В., Селедцов В.И., Иванова И.П., Литвинова Л.С. Антиген-специфическая иммунотерапия рассеянного склероза // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 3–12.

4. Bourdette D.N., Edmonds E., Smith C., Bowen J.D. et al. A highly immunogenic trivalent T cell receptor peptide vaccine for multiple sclerosis // Multiple Sclerosis. – 2005. – Vol. 11, N 5. – P. 552–561.

5. Burns J., Bartholomew B., Lobo S. Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis // Ann Neurol. – 1999. – Vol. 45. – P. 33–39.

6. Correale J., Farez M., Gilmore W. Vaccines for Multiple sclerosis. CNS Drugs. – 2008. – Vol. 22, N 3. – P. 175–198.

7. Hellings N., Raus J., Stinissen P. T-cell vaccination in multiple sclerosis: update on clinical application and mode of action // Autoimm. Rev. – 2004. – Vol. 3. – P. 267–275.

8. Liu G.Z., Fang L.B., Hjelmström P., Gao X.G. Increased CD8+ central memory T-cells in patients with multiple sclerosis // Mult. Scler. – 2007. – Vol. 13, N 2. – P. 149–155.

9. Okuda Y., Okuda M., Apatoff B.R., Posnett D.N. The activation memory CD4+ T cells and CD8+ T cells in patients with multiple sclerosis // J. Neurol. Sci. – 2005. – Vol. 235, N 1–2. – P. 11–17.

10. Vandenbark A.A., Morgan E., Bartholomew R., Bourdette D. et al. TCR peptide therapy in human autoimmune diseases // Neurochem Res. — 2001. — Vol. 26. — P. 713—730.

Сведения об авторах

Иванова Ирина Петровна – старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБУ «НИИКИ СО РАМН», кандидат медицинских наук (630099, г. Новосибирск-99, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383) 228-25-47, 228-26-73, факс: (383) 228-26-73; e-mail: irinaiki@rambler.ru)

Савкин Иван Владимирович – научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИКИ СО РАМН»

Селедцова Галина Викторовна – заведующая лабораторией клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИ клинической иммунологии СО РАМН», доктор медицинских наук

Шишков Алексей Анатольевич – научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИКИ СО РАМН»

Селедцов Виктор Иванович – доктор медицинских наук, профессор, директор Центра биотехнологий инновационного парка (236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14; тел.: 8 (4012) 595549; факс: 8 (4012) 466313; e-mail: info@innopark.kantiana.ru)

О.А. Коленчукова, С.В. Смирнова, А.А. Савченко

**ОСОБЕННОСТИ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНОСИНУСИТОМ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИМУНОПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ОСНОВЫ ЗАПУСКА
АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ**

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)

Статья посвящена исследованию особенностей иммунитета у больных аллергическим риносинуситом (АРС) в зависимости от иммунопатологической основы запуска аллергической реакции. Обследовано 310 человек больных АРС, которые были разделены на 4 типа: больные атопией (АтРС), с антителозависимым цитотоксическим типом (АТзЦТ), с иммунокомплексным типом (ИК), с гиперчувствительностью замедленного типа (ГЗТ) и группа контроля — 87 человек. В группах исследовано состояние иммунитета и цитокиновый статус. В результате исследования при атопии, цитотоксическом и иммунокомплексном типах АРС выявлена активация гуморального иммунитета и при ГЗТ клеточного иммунитета.

Ключевые слова: риносинусит, аллергия, иммунитет, цитокины

**PECULIARITIES OF IMMUNITY IN PATIENTS WITH ALLERGIC RHINOSINUSITIS
DEPENDING ON IMMUNE PATHOLOGICAL BACKGROUND OF ALLERGIC REACTION
TRIGGERING**

O.A. Kolenchukova, S.V. Smirnova, A.A. Savchenko

Research Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk

The article is devoted to the research of peculiarities of immunity in patients with allergic rhinosinusitis (AR) depending on immune pathological background of allergic reaction triggering. 310 patients with AR were examined and divided into 4 types: patients with atopy, with antibody-dependent cytotoxic type, with immune complex type, with hypersensitivity of slow type and the control group — 87 patients. In the groups the state of immunity and cytokine status were studied. In patients with atopy, cytotoxic and immune-complex types of rhinosinusitis activation of humoral immunity, and in patients with hypersensitivity of slow type — activation of cellular immunity were revealed.

Key words: rhinosinusitis, allergy, immunity, cytokines

В настоящее время наблюдается значительный рост распространенности аллергических заболеваний. Аллергические заболевания определяют как «болезни цивилизации», которые по социально-экономическому ущербу занимают одно из первых мест. В структуре аллергических заболеваний удельный вес АРС весьма высок (60–70 %) [1, 5]. В большинстве случаев развитие аллергического риносинусита связано с IgE-опосредованным атопическим механизмом. По данным различных исследований атопическим ринитом страдают от 10 до 30 % населения планеты. В других случаях в основе патогенеза риносинуситов могут лежать механизмы II, III и IV типов гиперчувствительности [11].

Одним из важных факторов, способствующих развитию аллергических риносинуситов, является состояние иммунной системы макроорганизма. Реактивность клеток иммунной системы обуславливает функциональное и патоморфологическое проявление патологии. В то же время исследуемые клетки имеют богатый набор рецепторов, что делает их высокочувствительными к разнообразным нарушениям системы гомеостаза организма [3, 7].

Таким образом, целью исследования является изучение особенностей иммунологических показателей и цитокиновой регуляции при аллергическом риносинусите в зависимости от иммунопатологической основы запуска аллергической реакции.

Материалы и методы

Обследовано 310 больных аллергическим риносинуситом (АРС). В качестве контроля обследовано 87 здоровых людей. Больные обследованы в аллергологическом кабинете с использованием дифференциальных критериев диагностики истинной аллергии [8], а также современных методов специфической аллергологической диагностики: 1) целенаправленный и тщательный сбор аллергологического анамнеза; 2) оценка клинической картины заболевания; 3) постановка скарификационных проб с неинфекционными аллергенами; 4) проведение элиминационных и провокационных тестов (по показаниям); 5) определение и специфического IgE в сыворотке крови на аппарате 3M Diagnostic Systems Bio Whittakes (USA): Total IgE II FAST и IgE FAST-Plus. На основании проведенных тестов больные АРС разделены на группы в зависимости от иммунопатологической основы запуска аллергической реакции по классификации P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs (1968) [8]: с атопическим риносинуситом (АтРС) выявлено 98 человек; с антителозависимым цитотоксическим типом (АТзЦТ) — 91; с иммунокомплексным типом (ИК) — 62; с гиперчувствительностью замедленного типа (ГЗТ) — 59.

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода

непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD56, CD19, CD25, HLA-DR. Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли соотношение ($CD4^+/CD8^+$). Концентрацию иммуноглобулинов А, М и G в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в агарозном геле по Манчини. Состояние гуморального иммунитета характеризовали также уровнем относительного синтеза IgA ($IgA/CD19^+$), IgM ($IgM/CD19^+$) и IgG ($IgG/CD19^+$) [3]. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови изучали методом селективной преципитации в полиэтиленгликоле.

Продукция цитокинов оценивалась иммуноферментным методом с использованием тест-систем производства Вектор-Бест (г. Новосибирск).

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна – Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2003 г. Номенклатурным комитетом Всемирной организации по аллергии выработана новая программа, в основу которой «положены ведущие иммунологические механизмы, инициирующие и опосредующие аллергические реакции», согласно которым: аллергия может быть антитело- или клеточно-опосредованной: IgE – опосредованная аллергия и не IgE – опосредованная аллергия,

индуцированная аллерген специфическими лимфоцитами или антителами класса G с образованием иммунных комплексов (ИК) [1]. Вместе с тем хорошо известна классификация типов аллергических реакций Р. Gell, R. Coombs, в которых определены аллергические реакции немедленного типа (гуморальные IgE-опосредованные) и аллергические реакции замедленного типа (клеточные реакции сенсibilизированных лимфоцитов), а также цитотоксические и иммунокомплексные реакции [8].

При изучении особенностей иммунологических показателей у больных аллергическим риносинуситом в группе с ГЗТ обнаружен лимфоцитоз, в случае трех других типов было выявлено снижение общего количества лимфоцитов (табл. 1). Выраженный лейкоцитоз наблюдался в группах с ГЗТ и иммунокомплексным типами. В группах с АtrPC, АТзЦТ и ИК типами выявлен иммунодефицит по Т-клеточному звену иммунитета, тогда как в группе с ГЗТ уровень Т-лимфоцитов значительно возрастает, за счет высокого содержания ЦТЛ (табл. 2). Уровень NK-лимфоцитов повышен в группах АtrPC, ГЗТ и ИК типами и снижен в группе с АТзЦТ. Концентрация IgE значительно повышена у больных атопией и снижена во всех остальных группах. Характерной особенностью иммунных проявлений у больных атопией является повышенное количество В-лимфоцитов, что связано с экспрессией IgE.

В группе с АТзЦТ наблюдаются выраженные изменения иммунологических показателей, так, происходит повышение количества клеток с $CD25^+$ -маркером относительно контрольного уровня. Так же, обнаружено повышение содержания HLA-DR⁺-клеток. Значительное содержание HLA-

Таблица 1

Популяционный состав лимфоцитов крови у больных APC в зависимости от иммунопатологической основы запуска аллергической реакции (Me (C_{25} – C_{75}))

Показатели	Контроль (n = 87)	АtrPC (n = 98)	АТзЦТ (n = 91)	ИК (n = 62)	ГЗТ (n = 59)
Лейкоциты ($10^9/л$)	5,75 (4,25–7,25)	6,40 (5,00–8,00) $P_1 = 0,003$	6,10 (4,90–7,73)	6,85 (5,75–8,50) $P_1 < 0,001$	7,75 (6,15–9,50) $P_{1,2,3} < 0,001$ $P_4 = 0,002$
Лимфоциты (%)	39,0 (34,0–45,0)	31,0 (17,0–39,0) $P_1 < 0,001$	26,0 (15,0–37,0) $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,003$	22,5 (16,0–36,0) $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,005$	42,0 (36,0–53,0) $P_{1,2,3,4} < 0,001$
Лимфоциты, ($10^9/л$)	2,16 (1,60–3,00)	1,65 (1,11–2,47) $P_1 < 0,001$	1,44 (0,91–2,21) $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,007$	1,68 (1,11–2,33) $P_1 = 0,002$	3,24 (2,64–4,35) $P_{1,2,3,4} < 0,001$
CD3+ (%)	67,0 (62,0–73,0)	64,0 (59,0–68,0) $P_1 < 0,001$	64,0 (58,0–70,0) $P_1 < 0,01$	64,5 (59,5–70,5) $P_2 = 0,015$	65,00 (59,0–71,0) $P_2 = 0,011$
CD3+ ($10^9/л$)	1,48 (1,08–2,04)	1,07 (0,70–1,60) $P_1 < 0,001$	0,86 (0,61–1,34) $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,014$	1,06 (0,70–1,54) $P_1 < 0,001$	2,14 (1,70–2,71) $P_{1,2,3,4} < 0,001$
CD19+ (%)	15,0 (11,0–21,0)	17,00 (13,5–20,0)	16,0 (12,0–21,0) $P_2 = 0,018$	17,0 (13,0–20,0) $P_2 = 0,025$	17,0 (11,0–20,0) $P_2 = 0,028$
CD19+ ($10^9/л$)	0,33 (0,23–0,46)	0,27 (0,17–0,45)	0,21 (0,13–0,36) $P_{1,2} < 0,001$	0,25 (0,15–0,42) $P_1 = 0,023$ $P_2 = 0,036$	0,51 (0,39–0,71) $P_{1,2,3,4} < 0,001$

DR⁺-экспрессирующих клеток у больных данной группы связано с повышением функциональной активности В-лимфоцитов (по уровню относительного синтеза иммуноглобулинов). Также, в данной группе обнаружено увеличение концентрации IgA, появляющегося на первом этапе иммунного ответа при инфекциях (табл. 3).

Углубленное изучение иммунокомплексной патологии позволило констатировать ряд последовательных реакций, в которых специфичность самого антигена утрачивает свое доминирующее значение. Установлен механизм формирования иммунокомплексной патологии в слизистой оболочке носа как проявление аутоиммунных процессов риносинусита [10]. Иммунокомплексный тип воспаления имеет место при формировании рецидивирующих риносинуситов. Иммунный комплекс фиксируется в стенках сосудов и отдельных клетках, вызывая повреждение микроциркуляторного русла — васкулит, что может характеризовать неблагоприятное течение риносинуситов, частые рецидивы, нарушение трофики и развитие фиброза в носовых раковинах [2]. Со стороны иммунитета характерной особенностью данного типа реакции является повышение функциональной активности

В-лимфоцитов, проявляющееся через увеличение концентрации IgM и относительного уровня синтеза IgM относительно контроля. Это подтверждает снижение HLA-Dr⁺-клеток и индекса активации Т-лимфоцитов. Таким образом, при иммунокомплексном воспалении наблюдается дисбаланс по Т-клеточному типу и активация гуморального звена иммунитета.

Патогенетически в развитии аллергических реакций замедленного типа ведущее значение имеют клеточные механизмы с участием макрофагов сенсibilизированных Т-лимфоцитов, эозинофилов с соответствующим спектром цитокинов [6]. Антигенами для этих реакций являются бактерии, вирусы, тканевые белки. Исследование иммунологических показателей в группе APC с ГЗТ выявило активацию Т-лимфоцитов вследствие увеличения уровня ЦТЛ, при этом содержание Т-хелперов снижено и в результате снижается соотношение CD4⁺/CD8⁺. Содержанием NK клеток и лимфоцитов с CD25⁺-маркером, при данном типе иммунологической реакции, также, значительно увеличено относительно контроля.

Исследование спектра цитокинов в группах с APC в зависимости от иммунного ответа пока-

Таблица 2
Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у больных APC в зависимости от иммунопатологической основы запуска аллергической реакции (Ме (C₂₅–C₇₅))

Показатели	Контроль n = 87	АтРС n = 98	АТзЦТ n = 91	ИК n = 62	ГЗТ n = 59
CD4 ⁺ (%)	42,2 (36,0–47,3)	38,0 (30,0–43,0) P ₁ < 0,001	37,0 (30,0–42,0) P _{1,2} < 0,001	41,0 (35,0–47,0) P ₂ < 0,001	34,0 (26,0–40,0) P _{1,4} < 0,001
CD4 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,81 (0,64–1,24)	0,56 (0,39–0,91) P ₁ < 0,001	0,47 (0,34–0,80) P ₁ < 0,001 P ₂ = 0,036	0,62 (0,43–1,08) P ₁ = 0,005	1,13 (0,71–1,67) P ₁ = 0,008 P _{2,4} < 0,001
CD8 ⁺ (%)	25,7 (22,0–29,4)	25,0 (21,0–32,0)	27,0 (21,0–31,0) P ₂ = 0,027	22,0 (19,0–29,0) P ₁ = 0,032	30,0 (25,0–36,0) P _{1,2,4} < 0,001
CD8 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,57 (0,35–0,79)	0,44 (0,27–0,63) P ₁ = 0,007	0,37 (0,25–0,56) P ₁ < 0,001 P ₂ = 0,021	0,40 (0,23–0,56) P ₁ < 0,001	1,00 (0,84–1,34) P _{1,2,3,4} < 0,001
CD56 ⁺ (%)	16,9 (13,0–22,0)	18,0 (15,0–21,0)	18,0 (15,0–24,0) P ₁ = 0,049	18,0 (12,0–21,0)	18,0 (15,0–21,0)
CD56 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,35 (0,23–0,54)	0,32 (0,19–0,47)	0,26 (0,15–0,43) P ₁ = 0,011 P ₂ = 0,022	0,28 (0,18–0,40) P ₁ = 0,018 P ₂ = 0,035	0,55 (0,44–0,91) P _{1,2,3,4} < 0,001
CD25 ⁺ (%)	17,5 (14,5–23,0)	39,5 (29,0–43,0) P ₁ = 0,003	58,0 (23,4–124,0)	52,5 (28,0–64,5)	29,0 (22,5–40,0) P ₁ < 0,001
CD25 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,45 (0,32–0,62)	0,92 (0,69–1,65) P ₁ = 0,024	1,03 (0,75–2,70) P ₁ = 0,019	1,53 (0,61–2,37)	1,65 (0,92–1,86) P _{1,2} < 0,001
HLA-DR ⁺ (%)	24,0 (19,0–28,0)	19,0 (15,0–23,5) P ₁ = 0,014	23,0 (18,0–26,0)	16,0 (11,0–20,0) P ₁ = 0,016 P _{2,3} = 0,04	19,0 (16,0–25,0)
HLA-DR ⁺ (10 ⁹ /л)	0,53 (0,37–0,72)	0,44 (0,33–0,60)	0,48 (0,33–0,60)	0,30 (0,11–0,41) P ₁ = 0,01 P _{2,3} = 0,047	0,78 (0,56–1,06) P _{1,2,3,4} < 0,001
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,67 (1,20–2,10)	1,45 (1,00–2,00)	1,33 (1,00–1,86) P ₁ = 0,036 P ₂ = 0,002	1,90 (1,23–2,53) P ₂ < 0,001	1,10 (0,84–1,60) P _{1,4} < 0,001 P _{2,3} = 0,05

Таблица 3

Показатели гуморального звена иммунитета больных АРС в зависимости от иммунопатологической основы запуска (Ме (С₂₅–С₇₅))

Показатели	Контроль n = 87	АтРС n = 98	АТзЦТ n = 91	ИК n = 62	ГЗТ n = 59
Ig A (r/n)	1,3 (0,8–2,8)	1,7 (1,10–3,10) P ₁ = 0,044	1,9 (1,5–3,4) P _{1,2} < 0,001	1,5 (1,1–1,8) P ₃ < 0,001	1,5 (1,1–2,3) P ₃ = 0,009
Ig M (r/n)	1,0 (0,4–2,1)	1,1 (0,8–1,6)	1,4 (1,0–1,6)	1,3 (1,1–1,7) P ₁ = 0,041 P ₂ = 0,043	1,1 (0,7–1,4) P ₄ < 0,001 P ₃ = 0,017
Ig G (r/n)	11,4 (5,4–17,5)	11,0 (8,0–14,4)	14,0 (11,8–16,1) P _{1,2} < 0,001	10,4 (7,1–13,6) P ₃ < 0,001	9,6 (7,0–14,1) P ₃ < 0,001
IgE (МЕ/мл)	35,0 (35,0–58,0)	178,0 (16,0–220,0) P ₁ < 0,001	30,5 (11,0–56,0) P _{1,2} < 0,001	34,5 (16,0–53,5) P _{1,2} < 0,001	15,0 (5,0–35,0) P _{1,2} < 0,001
sIgA (МЕ/мл)	20,0 (10,0–47,0)	92,5 (23,0–125,0) P ₁ < 0,001	60,0 (5,0–125,0) P ₁ < 0,001	87,5 (15,0–125,0) P _{1,2,3} < 0,001	67,5 (10,0–92,5) P _{1,4} < 0,001
Ig A/CD19 ⁺ (нг/клетку)	4,05 (2,00–10,19)	6,12 (2,91–12,58)	10,04 (3,85–21,26) P _{1,2} < 0,001	6,53 (2,80–11,65) P ₃ = 0,012	2,90 (1,82–5,01) P ₂ = 0,026 P _{3,4} < 0,001
Ig M/CD19 ⁺ (нг/клетку)	3,24 (0,92–7,04)	3,74 (2,16–7,82)	5,45 (2,72–11,37) P ₁ = 0,013 P ₂ = 0,002	5,24 (3,08–8,53) P ₁ = 0,019 P ₂ = 0,004	1,91 (1,20–2,77) P _{2,3,4} < 0,001
Ig G/CD19 ⁺ (нг/клетку)	32,37 (20,11–69,22)	38,36 (21,45–71,87)	59,80 (30,51–112,19) P _{1,2} < 0,001	41,57 (23,43–68,28) P ₂ = 0,026 P ₃ = 0,006	17,99 (11,34–28,26) P _{1,2,3,4} < 0,001
ЦИК (о.е.)	6,00 (3,00–9,00)	16,00 (11,00–45,00) P ₁ < 0,001	14,00 (8,00–18,00) P ₁ < 0,001	84,00 (60,00–114,00) P _{1,2,3} < 0,001	20,25 (11,50–38,00) P _{1,3,4} < 0,001

зало, что наибольшая концентрация ИЛ-4 и ИЛ-6 определялся в группах с атопией, АТзЦТ и ИК как в сыворотке, так и в назальных смывах. Указанные цитокины способны регулировать синтез IgE при помощи как прямых, так и опосредованных механизмов с возможностью негативной и позитивной регуляции. Прямое влияние проявляется преимущественно в увеличении продукции цитокинов Th2-лимфоцитами, увеличении экспрессии генов ИЛ-4, усилении активности В-лимфоцитов [4, 9]. Специфика цитокинового профиля для АТзЦТ реакции при АРС состоит в значительном повышении количества ФНОα в сыворотке крови. В группе с ГЗТ наблюдалось повышение концентрации ИЛ-2 и содержание γИФН в сыворотке крови и назальном секрете (табл. 4).

Таким образом, оценка содержания интерлейкинов при АРС в зависимости от патогенетической формы характеризуется общими закономерностями в динамике локального и системного цитокинового профиля, отражающие общие патогенетические механизмы воспаления и отражает активацию гуморального иммунитета при атопии, цитотоксическом и иммунокомплексном типах АРС и клеточного при ГЗТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеевская О.А., Назаров И.И., Косяков С.Я. Рациональные основы лечения аллергического ринита // Рос. ринология. — 2008. — № 3. — С. 34–37.
2. Арефьева Н.А., Азнабаева Л.Ф. Иммунология, иммунопатология, диагностика иммунных нарушений и их коррекция при заболеваниях верхних дыхательных путей // Рос. ринология. — 2007. — № 3. — С. 11–14.
3. Булкина О.З., Маркова Т.П. Клинико-иммунологическая характеристика больных с круглогодичным аллергическим ринитом с очагами хронической инфекции рото- и носоглотки // Иммунология. — 2007. — № 1. — С. 46–49.
4. Завгородняя Е.Г. Цитокины и их место в диагностике и лечении ряда заболеваний ЛОР-органов // Вестн. оториноларингологии. — 2008. — № 3. — С. 74–76.
5. Игнатова И.А., Смирнова С.В., Покидышева Л.И., Манчук В.Т. Аллергическая риносинусопатия у жителей Сибири и севера. — Новосибирск: Наука, 2005. — 152 с.
6. Капустина Т.А., Парилова О.В., Коленчукова О.А., Савченко А.А. и др. Характеристика иммунопатологических нарушений у больных с хронической патологией носа и его придаточных пазух, ассоциированной с хламидийной инфекцией // Иммунология. — 2007. — Т. 28, № 1. — С. 42–46.
7. Коленчукова О.А., Савченко А.А., Борисов А.Г., Бородин Н.А. и др. Состояние иммунного статуса и метаболизма лимфоцитов у больных острым и хроническим гайморитом // Сибир. мед. журн. — 2008. — № 3. — С. 23–26.
8. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии (диа-

Таблица 4

Показатели цитокинового статуса в сыворотке крови и назальных смывах у больных АРС в зависимости от иммунопатологической основы запуска аллергической реакции Me (C_{25} – C_{75})

Показатели	Контроль n = 87	АтРС n = 98	АТзЦТ n = 91	ИК n = 62	ГЗТ n = 59
αИФН (сыв.), пг/мл	2,00 (0,00–24,00)	12,00 (11,00–21,00)	0,50 (0,50–2,00) $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,03$	2,00 (0,50–18,50)	15,00 (0,50–28,50) $P_3 = 0,01$
αИФН (смывы), пг/мл	16,00 (0,00–70,00)	26,00 (0,00–88,00)	1,00 (0,10–4,00) $P_1 = 0,005$	8,00 (2,00–10,00)	25,00 (0,50–70,00)
γИФН (сыв.), пг/мл	0,20 (0,00–0,50)	0,10 (0,00–0,50) $P_1 = 0,26$	2,00 (0,51–10,00)	0,50 (0,20–2,00) $P_1 = 0,15$	4,00 (2,00–15,00)
γИФН (смывы), пг/мл	0,10 (0,00–0,50)	0,20 (0,00–0,20)	1,00 (0,10–6,00)	5,00 (5,00–15,00)	12,00 (0,20–12,00) $P_1 = 0,05$
IL-1β (сыв.), пг/мл	0,20 (0,00–5,00)	5,00 (3,00–5,00)	30,00 (20,50–35,00) $P_1 = 0,005$	30,00 (5,00–50,00) $P_1 < 0,001$	5,50 (4,50–24,50) $P_1 < 0,001$
IL-1β (смывы), пг/мл	0,50 (0,00–2,00)	5,00 (4,00–9,00)	7,500 (7,00–15,00) $P_2 = 0,05$	5,00 (5,00–8,00) $P_1 = 0,002$	5,00 (4,00–7,00) $P_1 < 0,001$
IL-2 (сыв.), пг/мл	0,10 (0,00–20,00)	0,00 (0,00–30,00) $P_1 = 0,052$	30,00 (30,00–30,00)	0,60 (0,10–51,89)	30,00 (20,50–70,00) $P_1 < 0,001$
IL-2 (смывы), пг/мл	0,20 (0,00–0,20)	0,50 (0,00–30,00)	4,00 (0,50–6,00)	0,90 (0,20–48,54)	15,00 (0,00–30,00) $P_1 < 0,001$
IL-4 (сыв.), пг/мл	0,50 (0,00–2,00)	11,00 (0,00–23,50) $P_1 < 0,001$	12,00 (7,20–15,00) $P_1 = 0,02$	12,00 (5,50–17,00) $P_1 = 0,043$	5,00 (0,20–10,00) $P_1 < 0,001$ $P_4 = 0,09$
IL-4 (смывы), пг/мл	0,10 (0,00–0,30)	8,00 (1,00–26,00) $P_1 = 0,024$	7,65 (0,10–12,00) $P_1 = 0,024$	7,50 (0,20–12,00) $P_1 = 0,04$	0,50 (0,20–1,00)
IL-6 (сыв.), пг/мл	2,00 (0,00–3,00)	31,00 (14,00–38,00) $P_1 < 0,001$	22,50 (20,20–25,00) $P_1 < 0,001$	46,00 (24,00–75,0) $P_1 = 0,004$	9,50 (3,50–16,50) $P_2 = 0,003$
IL-6 (смывы), пг/мл	0,20 (0,00–3,50)	25,00 (13,75–35,50) $P_1 < 0,001$	17,00 (7,20–30,00) $P_1 = 0,006$	22,75 (11,00–36,75) $P_1 < 0,001$	5,30 (3,00–17,00)
IL-8 (сыв.), пг/мл	12,00 (5,00–75,00)	15,00 (4,50–19,00)	27,00 (25,00–270,00) $P_1 = 0,011$	30,00 (12,00–120,00) $P_1 = 0,014$	45,00 (27,00–110,00) $P_1 = 0,019$
IL-8 (смывы), пг/мл	67,00 (15,00–235,00)	70,00 (19,00–75,00)	213,50 (187,50–253,50) $P_1 = 0,009$ $P_2 = 0,03$	205,50 (86,00–242,50) $P_1 = 0,009$ $P_3 = 0,05$	255,00 (55,00–275,00) $P_1 < 0,001$

гностика заболеваний иммунной системы). — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 345 с.

9. Dardalhon V., Awasthi A., Kwon H. et al. IL-4 inhibits TGFβ1-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGFβ, generates IL-9⁺, IL-10⁺ Foxp3(-) effector-cells // Nat. Immunol. — 2008. — Vol. 9 (12). — P. 1347–1355.

10. Ramanatham M.J., Lee W.K., Spannhake E.W. Th2 cytokines associated with chronic rhinosinusitis

with down-regulate the antimicrobial immune function of human sinonasal epithelial cells // Am. J. Rhinol. — 2008. — Vol. 22, N 2. — P. 115–121.

11. Staikniene J., Vaitkus S., Japertiene L.M. Association of chronic rhinosinusitis with nasal polyps and radiological features, allergy and inflammation markers // Medicina. — 2008. — Vol. 44, N 4. — P. 257–265.

Сведения об авторах

Коленчукова Оксана Александровна – ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФБУНИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, кандидат биологических наук, доцент (660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк 3г, ФБУНИИ МПС СО РАМН; тел. раб.: (3912) 220-209; факс: (3912) 231-963; e-mail: Kalina-chyikova@mail.ru)

Смирнова Светлана Витальевна – заместитель директора по науке ФБУНИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Савченко Андрей Анатольевич – заведующий лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФБУНИИ МПС СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Е.М. Костина

**ПРИМЕНЕНИЕ МНОГОФАКТОРНОГО АНАЛИЗА В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ИММУНОТЕРАПИИ ВП-4 У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ,
ОСЛОЖНЕННОЙ ОЧАГАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ***Пензенский институт усовершенствования врачей (Пенза)*

65 больным с инфекционно-зависимой и смешанной формами бронхиальной астмы проведена иммунотерапия ВП-4. С помощью многофакторного анализа определены основные критерии эффективности и построена математическая модель прогнозирования положительного эффекта проводимого метода терапии.

Ключевые слова: бронхиальная астма, иммунотерапия, математическое моделирование, ВП-4

**MULTIVARIATE ANALYSIS USE IN THE EFFICACY EVALUATION OF IMMUNOTHERAPY
WITH VP-4 IN THE PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA COMPLICATED
BY CHRONIC INFLAMMATION NIDI**

Е.М. Kostina

Penza's Institute of Physicians' Training, Penza

65 patients with infection-dependent and mixed forms of bronchial asthma have been provided with immunotherapy with VP-4. With the help of multivariate analysis there have been defined the main efficacy criteria and the mathematical prediction model of the positive effect of this therapeutic method have been made.

Key words: infection-dependent bronchial asthma, immunotherapy, mathematical model, VP-4

Бронхиальная астма (БА) является одним из самых распространенных заболеваний аллергопатологии, снижающих качество жизни больных и представляющую значительную социально-экономическую проблему современной медицины. До настоящего времени ведется дискуссия по определению различных клинко-патогенетических форм заболевания. Несмотря на то, что аллергическая форма БА встречается менее чем у 30 % больных, инфекционно-зависимая БА (ИЗБА) признается далеко не всеми. Вместе с тем инфекционный фактор выступает как индуктор и триггер заболевания у большей части больных [4, 7, 9, 10, 13, 14, 15]. Имеющиеся очаги хронической инфекции у данной категории пациентов усугубляют течение основного заболевания, приводят к угнетению иммунных параметров и развитию ВИДС, что требует изменения подхода при проведении реабилитационных мероприятий и выбору метода иммунотерапии [2, 6, 7, 13, 14]. Препаратами выбора в данном случае могут быть бактериальные иммуномодуляторы, широко применяющиеся в клинической практике и неоднократно доказавшие свою клиническую эффективность [1, 5, 8].

Наиболее перспективным отечественным препаратом является иммуновак ВП-4, разработанный НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (регистрационный номер публикации патента 94019810, код МПК А61К039/116, разрешен к применению приказом МЗ РФ № 270 от 17.11.1993 г.). ВП-4 является поликомпонентной вакциной, содержащей лизаты *Klebsiella pneumonia Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Proteus vulgaris*. Для получения препарата использовали оригинальные

штаммы возбудителей, обладающие высокой иммуногенностью, слабыми сенсibiliзирующими свойствами и широкой перекрестной активностью антигенов в отношении возбудителей заболеваний респираторного тракта. Препарат хорошо себя зарекомендовал у больных различными obstructивными заболеваниями у детей и взрослых. Клиническая эффективность по данным многих авторов составила от 71,1 – 88,6 % до 95,8 % [1, 2, 5, 6, 11]. Эти исследования показали целесообразность проведения вакцинотерапии больным БА на фоне комплексной противовоспалительной терапии независимо от тяжести течения заболевания.

Цель работы: определение ведущих критериев эффективности иммунотерапии ВП-4 у больных БА, осложненной очагами вторичной инфекции с помощью многофакторного анализа и построение расчетной модели эффективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением и обследованием находились 65 пациентов с диагнозом инфекционно-зависимая (неаллергическая) и смешанная БА в возрасте от 18 до 65 лет. Больные были разделены на 2 группы: 1-ю группу составили пациенты с инфекционно-зависимой формой БА – 30 человек, 2-ю группу – 15 со смешанной формой БА (в сочетании с сенсibiliзацией к инфекционным и бытовым аллергенам). Группу сравнения составили 20 человек, получавших только базисную, противовоспалительную терапию.

Всем пациентам проведено комплексное клинко-лабораторное обследование в соответствии со стандартами обследования при БА (сбор аллер-

гоанамнеза, исследование ФВД, инструментальное обследование, консультации специалистов с целью выявления очагов сопутствующей патологии и определения методов санации их). Иммунологическое исследование включало: определение показателей гуморального и Т-клеточного звеньев иммунитета (уровней сывороточных IgA, IgM, IgG методом Манчини, общего IgE и специфических IgE-антител к инфекционным и неинфекционным аллергенам методом ИФА, определение абсолютного и относительного количества популяций Т-лимфоцитов: CD4, CD8, CD3, CD16, про- и противовоспалительных цитокинов. Микробиологическое исследование включало посев мокроты на флору, мазок-посев со слизистой носовой полости.

ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ

Средний возраст пациентов составил $32,1 \pm 1,2$ года. Средняя длительность заболевания: $7,5 \pm 0,9$ года. Все больные получали базисную, противовоспалительную терапию ИГКС в соответствии с принципами ступенчатой терапии в соответствии с Международным консенсусом по диагностике и терапии БА (2008 г.). ИГКС все пациенты получали не менее года до включения в исследование. У всех больных отмечена четкая связь обострений основного заболевания с присоединением вирусной инфекции, что усугубляет состояние больного и приводит к хроническому течению бактериального воспаления. Наиболее значимую роль играют сопутствующие заболевания респираторного и желудочно-кишечного тракта. В 1/3 случаев у больных бронхиальной астмой развитию клинически выраженных приступов удушья предшествовала хроническая патология верхних дыхательных путей, а у 52 пациентов выявлялся смешанный и инфекционно-аллергический риносинусит совместно с бронхиальной астмой, значительно утяжеляя ее течение. Длительный, вялотекущий воспалительный процесс характеризовался торпидностью к противовоспалительной и антибактериальной терапии, что свидетельствовало о клиническом проявлении у больных вторичной иммунной недостаточности.

Иммунотерапию ВП-4 проводили назально-подкожным методом (назально: 1-е введение — 1 капля, 2-е введение — 2 капли, 3-е введение — 3 капли, 4-е введение — 4 капли, далее подкожно в область плеча по схеме 0,05 мл — 0,1 мл — 0,2 мл — 0,2 мл — 0,2 мл, введение проводилось через 5 дней, всего 5 инъекций). Начинали терапию после купирования обострения, в межприступный период в условиях стационара, далее продолжали в режиме амбулаторного наблюдения. Наблюдение за больным осуществлялось в течение года, проводился мониторинг клинических симптомов и течения БА, функции внешнего дыхания (ФВД). Каждый пациент получал иммунотерапию препаратом по одной схеме. На протяжении периода лечения препаратом ВП-4 проводилось физикальное обследование пациентов, оценка самочувствия для выявления возможных побочных реакций на

исследуемый препарат и анализ динамики течения и клинических проявлений астмы. Эффективность терапии оценивалась на основании анализа клинического течения заболевания, оценки показателей ФВД, оценки частоты рецидивов, объема применяемых противовоспалительных препаратов, оценки иммунных параметров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования параметров гуморального и Т-клеточного звеньев иммунитета до иммунотерапии не выявил значимой разницы у больных изучаемых групп. Вместе с тем у 1/3 пациентов были отмечены те или иные нарушения функционирования иммунной системы.

В соответствии с целью работы нами проведен факторный анализ динамики иммунных параметров до и после вакцинотерапии для определения значимых факторов эффективности данного метода терапии.

Анализ данных корреляционной матрицы независимых факторов с эффективностью у больных 1-й группы показал, что:

1. Прямая связь параметра, отражающего эффективность, установлена с факторами CD3, CD4, CD8, g-ИНФ и РБТЛ; обратная — с фактором IgE.
2. Параметр эффективности имеет сильную корреляционную связь с факторами CD8, g-ИНФ и РБТЛ. Связь с остальными факторами — слабая.
3. Связь между параметром CD3 и РБТЛ, равно как и между CD4 и РБТЛ, больше, чем связь между данными факторами и эффективностью, поэтому параметры CD3 и CD4 можно не включать в модель как малоинформативные.
4. Аналогично, связь между g-ИНФ и CD8, также как и между IgE и CD8, больше, чем между данными факторами и эффективностью. Поэтому эти параметры (g-ИНФ и IgE) также не будут входить в модель.

Таким образом, для построения модели были отобраны факторы CD8 и РБТЛ.

Модель для параметра, отражающего эффективность, получена методом пошагового регрессионного анализа. Коэффициенты оценки качества модели:

- коэффициент детерминации ($RI = 0,800068537$), определяющий ее информационную значимость;
- значение F-критерия ($F(2,27) = 54,232$) и уровень значимости модели ($p < 0,00000$), определяющие статистическую значимость модели;
- Regression Summary for Dependent Variable: Эффективность;
- $R = 0,89481024$; $RI = 0,80068537$; Adjusted $RI = 0,78592132$;
- $F(2,27) = 54,232$; $p < 0,00000$ Std. Error of estimate: 0,45356.

Коэффициенты модели B: Intercept: B- — 4,70095, для CD₈- — 0,14169, для РБТЛ — 0,06072.

Обозначим эффективность как Y, CD₈ = x₁, РБТЛ = x₂, тогда модель для эффективности будет иметь вид:

$$y = 0,142 \times x_1 + 0,061 \times x_2 - 4,701.$$

Знаки коэффициентов модели отражают прямую связь эффективности с факторами x_1 и x_2 . Проведен дисперсионный анализ модели и оценки ее информативности. Вклад факторов, включенных в модель (Regress = 22,31243), составляет 80 % от общей суммы квадратичных отклонений параметра Y (эффективности), а часть вклада вносят неучтенные (случайные) факторы (Residual = 5,55423), что свидетельствует об информационной способности модели. По величине F-критерия $F = 54,23211$ с уровнем значимости $p = 0,000000$ модель можно считать значимой, достоверной.

Степень влияния факторов на эффективность рассчитывается по величине стандартизованных коэффициентов регрессии BETA по результатам полученных данных с помощью формулы:

$$K_j = \frac{100 \times BETA_j}{\sum_j |BETA_j|} \times R^2, \text{ в } \%.$$

Таким образом, наибольшее влияние на эффективность ИТ у пациентов 1-й группы оказывает фактор CD_8 , в меньшей степени — РБТЛ.

Аналогичным образом проведены математические расчеты данных пациентов 2 группы. Анализ данных корреляционной матрицы независимых факторов с эффективностью у больных смешанной формой БА показал, что:

1. Прямая связь параметра, отражающего эффективность, установлена с факторами CD_3 , CD_4 , CD_8 , γ -ИНФ и РБТЛ; обратная — с фактором IgE.

2. Параметр эффективности имеет сильную корреляционную связь с факторами CD_8 , γ -ИНФ, IgE и РБТЛ. Связь с остальными факторами — слабая.

3. Связь между параметрами CD_3 и CD_8 , также как и связь между CD_4 и CD_8 , превышает связь между этими факторами и эффективностью. Поэтому CD_3 и CD_4 не включаем в модель в виду их малой информативности.

4. Связь между параметрами γ -ИНФ и CD_8 больше, чем связь между γ -ИНФ и эффективностью, в виду чего также исключаем фактор γ -ИНФ из модели.

Таким образом, для составления модели были отобраны факторы CD_8 , IgE и РБТЛ.

Модель для параметра, отражающего эффективность, получена методом пошагового регрессионного анализа. Коэффициенты оценки качества модели следующие:

- коэффициент детерминации ($RI = 0,86644744$), определяющий ее информационную значимость;
- значение F-критерия ($F(3,16) = 34,601$) и уровень значимости модели ($p < 0,000000$), определяющие статистическую значимость модели;
- Regression Summary for Dependent Variable: Эффективность;
- $R = 0,93083158$; $RI = 0,86644744$, Adjusted $RI = 0,84140633$;
- $F(3,16) = 34,601$, $p < 0,000000$, Std. error of estimate: 0,39824.

Коэффициенты модели B: Intercept: B- — 1,85819, для CD_8 — 0,07266, для РБТЛ — 0,04984, для IgE- — 0,00548.

Обозначим эффективность как Y , $CD_8 = x_1$, IgE = x_2 , РБТЛ = x_3 , тогда модель для эффективности будет иметь вид:

$$y = 0,073 \times x_1 + 0,005 \times x_2 + 0,005 \times x_3 - 1,858.$$

Знаки коэффициентов модели отражают прямую связь эффективности с факторами x_1 и x_3 и обратную — с x_2 .

Дисперсионный анализ модели показал, что вклад факторов, включенных в модель (Regress = 16,46250), составляет 86,7 % от общей суммы квадратичных отклонений параметра Y (эффективности), а часть вклада вносят неучтенные (случайные) факторы (Residual = 2,53750), что свидетельствует об информационной способности модели. По величине F-критерия $F = 34,60101$ с уровнем значимости $p = 0,000000$ модель можно считать значимой, достоверной.

Степень влияния факторов на эффективность рассчитывается по величине стандартизованных коэффициентов регрессии BETA из полученных данных с помощью формулы:

$$K_j = \frac{100 \times BETA_j}{\sum_j |BETA_j|} \times R^2, \text{ в } \%.$$

Таким образом, наибольшее влияние на эффективность оказывает фактор РБТЛ и в меньшей степени факторы IgE и CD_8 . Обратная взаимосвязь эффективности ИТ ВП-4 и динамики уровня общего IgE показывает необходимость включения дополнительного метода в лечение данной группы больных, в частности АСИТ бытовыми или инфекционными аллергенами.

Клинический эффект ИТ характеризовался в снижении рецидивов обострения, нормализации показателей ФВД, достижении стойкой клинической ремиссии и что немаловажно в снижении объема проводимой противовоспалительной терапии ИГКС у большей части больных. Подтверждая предыдущие клинические исследования нами отмечен эффект снижения частоты ОРЗ/ОРВИ в группе пациентов, получавших ВП-4 в 2,3 раза в сравнении с пациентами не получающими вакцинолечение.

У больных 3-й группы (не получавших ИТ) не отмечено положительных изменений показателей гуморального и Т-клеточного звеньев иммунитета и динамики клинических показателей в течение года наблюдения. У 1/3 пациентов наблюдалось утяжеление течения БА, ухудшение показателей ФВД и повышение доз базисных противовоспалительных глюкокортикостероидных препаратов (ИГКС).

ВЫВОДЫ

Клиническая эффективность иммунотерапии с учетом отличных, хороших и удовлетворительных результатов у больных инфекционно-зависимой БА составила 90 %, смешанной формой БА — 80 %.

Вакцина оказывала иммуномодулирующее действие на показатели Т-клеточного звена иммунитета, нормализуя исходно сниженные показатели и выравнивая иммунорегуляторное соотношение клеток и их функциональную способность.

При инфекционно-зависимой форме БА наибольшее влияние на эффективность ИТ оказывают факторы: CD₈ и РБТЛ.

При смешанной форме БА критериями эффективности проводимой иммунотерапии являются РБТЛ, динамика уровня общего IgE и CD₈. Учитывая сочетанную сенсибилизацию к бытовым и инфекционным аллергенам, для достижения лучших результатов эффективности лечения пациентов со смешанной формой БА следует проводить комбинированную терапию: лечение этиотропными аллергенами в сочетании с ВП-4. Иммунотерапия ВП-4 патогенетически обоснована и целесообразна у пациентов с БА, осложненной очагами инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин И.И., Степушина М.А., Егорова Н.Б. Использование поликомпонентной бактериальной вакцины (ВП-4) в лечении бронхиальной астмы у детей // Int. J. Immunorehabilitation. — 1997. — № 10. — С. 158–164.
2. Баранова Н.И. Изучение клинической и иммунологической эффективности при проведении различных видов иммунотерапии у больных инфекционно-аллергическими заболеваниями дыхательных путей // Аллергология и иммунология. — 2008. — Т. 9, № 3. — С. 287.
3. Баранова Н.И., Костина Е.М. Характеристика иммунного статуса больных аллергическими заболеваниями дыхательных путей с бактериальной сенсибилизацией // Клин. лаб. диагностика. — 2010. — № 1. — С. 43–46.
4. Вишнякова Л.А. Роль различных микроорганизмов и инфекционных процессов в возникновении и течении бронхиальной астмы // Терапевт. архив. — 1990. — № 11. — С. 18–20.
5. Егорова Н.Б., Ефремова В.Н., Крейлин Л.С. Иммуностимулирующий препарат из антигенов ус-

ловно-патогенных микроорганизмов при лечении воспалительных заболеваний легких // ЖМЭИ. — 1987. — № 3. — С. 49–52.

6. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Семенов Б.Ф. Иммунотерапия бронхиальной астмы бактериальной вакциной ВП-4 // Астма. — 2000. — Т. 1, № 1. — С. 60–67.
7. Керопян Г.А. Роль нейссерияльной флоры в этиопатогенезе инфекционно-аллергической бронхиальной астме: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1998. — 20 с.
8. Осипова Г.А. Поликомпонентная вакцина ВП-4 в терапии аллергических заболеваний // ЖМЭИ. — 2003. — № 2. — С. 36–42.
9. Пыцкий В.И. Механизмы возникновения и развития бронхиальных астм и основные принципы их лечения. — М.: Фармарус принт медиа. — 2008. — 54 с.
10. Busse W.W., Lemanske R.F. Jr., Gern J.E. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations // Lancet. — 2010. — Vol. 4. — P. 826–834.
11. Egorova N.B., Kurbatova E.A., Gruber I.M., Semenova I.B. et al. Novel type of vaccine with a combination of Toll like receptor agonists-TLR 1/2, 4, 5/6, 9 // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. — 2011. — N 4. — P. 40–46.
12. Johanson S.G.O. A revised nomenclature for allergy — a condensed version of the EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force // Allergy and Clin. Immunol. Intern. — 2002. — Vol. 14, N 6. — P. 279–287.
13. Oehling A. Bacterial infection as an important triggering factor in bronchial asthma // J. Invest. Allergol. And Clin. Immunol. — 1999. — Vol. 9, N 1. — P. 6–13.
14. Oehling A. Бактериальная инфекция в этиологии бронхиальной астмы // Патолог. физиология и эксперимент. терапия. — 1999. — № 1. — С. 6–9.
15. Sevin C.M., Peebles R.S. Jr. Infections and asthma: new insights into old ideas // Clin Exp Allergy. — 2010. — Vol. 40, N 8. — P. 1142–1154.

Сведения об авторах

Костина Елена Михайловна — доцент кафедры аллергологии и иммунологии кандидат медицинских наук (440068, г. Пенза, ул. Терновского, д. 172, кв. 231; тел. сот.: 8905-36-75-814; e-mail: elena-kostina-br@rambler.ru)

Баранова Надежда Ивановна — доцент кафедры аллергологии и иммунологии, доктор биологических наук

А.А. Кошкина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, И.Е. Есимова, Р.Р. Хасанова

ОСОБЕННОСТИ CD3/CD28-ИНДУЦИРОВАННОЙ СЕКРЕЦИИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Сибирский государственный медицинский университет (Томск)

В статье представлены результаты исследования CD3/CD28-индуцированной продукции интерлейкина-2 лимфоцитами крови *in vitro* и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких. Установлено снижение общего числа CD3-позитивных клеток и угнетение секреции IL-2 при CD3/CD28-индукции лимфоцитов, наиболее выраженное при диссеминированной форме лекарственно-устойчивого туберкулеза легких. Продемонстрировано снижение процентного содержания CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ и CD3⁺CD28⁺IL-2⁻ клеток у больных туберкулезом легких на фоне увеличения количества CD3⁺CD28⁻IL-2⁻ лимфоцитов в крови. Показано, что выявленные изменения носят односторонний характер, не зависят от клинической формы туберкулеза легких и максимально проявляются у пациентов с лекарственно-резистентным вариантом туберкулезной инфекции.

Ключевые слова: туберкулез легких, Т-лимфоциты, интерлейкин-2, межклеточная кооперация

PECULIARITIES OF CD3/CD28-INDUCED SECRETION OF INTERLEUKIN-2 AND SUBPOPULATION COMPOSITION OF T-LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

A.A. Koshkina, V.V. Novitskij, O.I. Urazova, I.E. Esimova, R.R. Hasanova

Siberian State Medical University, Tomsk

The article presents the results of the research of CD3/CD28-induced production of interleukin-2 by blood lymphocytes *in vitro* as well as subpopulation composition of peripheral blood T-lymphocytes in patients with drug-sensitive and drug-resistant pulmonary tuberculosis. We detected the decrease in the total amount of CD3-positive cells and suppression of IL-2 secretion during CD3/CD28-induction of lymphocytes, which was most expressed in a disseminated form of drug-resistant TB. We also demonstrated the reduction in the percentage value of CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ and CD3⁺CD28⁺IL-2⁻ cells in patients with pulmonary TB against the background of the increase in the percentage value of CD3⁺CD28⁻IL-2⁻. Besides, it was also shown that the detected changes are unidirectional, don't depend on a clinical form of TB and are maximally manifested in patients with a drug resistant variant of the TB process.

Key words: pulmonary tuberculosis, T-lymphocytes, interleukin-2, intercellular cooperation

Туберкулез легких (ТЛ) занимает одну из ведущих позиций среди социально-значимых заболеваний. Патогенез туберкулезной инфекции в современных условиях обусловлен, с одной стороны, изменением биологических свойств возбудителя инфекции и увеличением доли штаммов *M. tuberculosis*, обладающих множественной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, с другой стороны — дисфункцией иммунной системы.

В настоящее время среди причин, лежащих в основе развития ТЛ, особое значение отводится комплексу этиологических и патогенетических факторов, обуславливающих нарушение иммунного ответа на *M. tuberculosis* и формирование вторичной иммунологической недостаточности (ВИН), сопровождающей данное заболевание. Наличие ВИН существенно влияет как на течение туберкулезного процесса, так и на качество этиотропной терапии; ее характерной особенностью является дисбаланс в цитокиновой сети, проявляющийся, как правило, гипопродукцией профилирующих цитокинов, ответственных за «поляризацию» дифференцировки наивных Т-лимфоцитов хелперов (Th) в Th1-клетки и развитие иммунного Th1-ответа [2]. Наиболее отчетливо с характером течения туберкулезной

инфекции связаны изменения секреции интерлейкина-2 (IL-2), являющегося основным аутокринным ростовым фактором и активатором Т-лимфоцитов, обладающим способностью направлять дифференцировку наивных Т-клеток по Th1-пути. Гипопродукция IL-2, регистрируемая при ТЛ, в настоящее время считается основным критерием ВИН и рассматривается среди основных факторов неэффективности иммунного ответа на *M. tuberculosis* [9].

Среди причин, приводящих к гипосекреции IL-2, рассматриваются нарушения процессов межклеточной кооперации, реализуемые как путем непосредственного контактного взаимодействия клеток, в котором участвуют их поверхностные молекулы, так и посредством цитокинов. Известно, что передача импульсов, опосредованная Т-клеточным рецептором (CD3/TCR), осуществляется путем соединения CD3/TCR лимфоцита с МНС-пептидным комплексом антигенпрезентирующей клетки (АПК) при участии корцептора CD4 и костимуляции со стороны молекул CD80/CD86 на АПК, связывающихся с CD28-молекулой на Т-клетках [1, 2]. В комплексе происходит передача импульса, который через сложную серию каскадных реакций приводит к активации ядерных факторов NFκB, NFAT и AP-1,

следствием которой является секреция IL-2, клональная пролиферация и дифференцировка Th0-клеток в клетки-эффекторы [1, 5]. В отсутствие костимуляторного сигнала Т-лимфоциты теряют способность эффективно «отвечать» на антигенные стимулы и подвергаются апоптозу [11]. Вместе с тем сведения, касающиеся механизмов нарушений передачи сигнала комплексом CD3/TCR – CD28, при туберкулезе носят фрагментарный, несистематизированный характер, что не позволяет однозначно оценить наличие и направленность патологических изменений, приводящих к снижению активности Th1-лимфоцитов.

В свете изложенного, целью настоящего исследования явилось оценить особенности CD3/CD28-индуцированной продукции IL-2 и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов крови при различных клинико-патогенетических вариантах туберкулеза легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В программу исследования вошли 65 пациентов (51 мужчина и 14 женщин) с впервые выявленными распространенными формами туберкулеза легких в возрасте 20 – 55 лет. Все пациенты в зависимости от устойчивости *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам были разделены на две группы – больные с лекарственно-чувствительным (ЛЧТЛ) и лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ), каждая группа в свою очередь была разбита на подгруппы в зависимости от формы заболевания (инфильтративный, диссеминированный ТЛ).

Диагноз ТЛ и его форма устанавливались на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. У всех обследованных пациентов отмечался распространенный (более 4 сегментов) деструктивный характер поражения легочной ткани с вовлечением в патологический процесс преимущественно обоих легких. В исследование не включались: больные, получавшие терапию глюкокортикостероидами и нестероидными противовоспалительными препаратами на момент исследования; больные с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (онкопатология, сахарный диабет, бронхиальная астма); больные с иммунозависимыми заболеваниями (гломерулонефрит, ревматоидный артрит, псориаз, гепатит, ВИЧ-инфекция); больные, которым была назначена иммунотерапия.

Контрольную группу составили практически здоровые мужчины (11) и женщины (10) (всего 21 человек) с сопоставимыми характеристиками по возрасту, не имеющие в анамнезе легочной патологии, тяжелых аллергических реакций, хронических инфекционных заболеваний, а также патологических изменений в легких (по данным флюорографического исследования). Частота заболевания острыми респираторными вирусными и бактериальными инфекциями у лиц контрольной группы не превышала 3 раз в год.

Материалом для исследования служила гепаринизированная (25 Ед/мл) кровь больных ТЛ, взятая

утром натощак из локтевой вены. Исследование проводили однократно, до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии.

Выделение мононуклеарных клеток осуществляли стандартно на двойном градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 и 1,083 г/см³). Разделение мононуклеаров на моноциты и лимфоциты проводили методом адгезии к пластику. Идентификацию клеток осуществляли путем витальной окраски азур II-озином. Жизнеспособность выделенных лимфоцитов (по данным трипанового теста) составляла 97 %. Культивирование полученных клеточных суспензий осуществляли в полной питательной среде по методу Е.Д. Гольдберга и соавт. (1992) с поэтапным добавлением в культуру клеток моноклональных антител к CD3-, CD28-молекулам («R&D Systems», США) и блокатора внутриклеточного транспорта мөненизин («Sigma», США). Образцы инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Общее время инкубации составило 12 ч. Для изучения CD3/CD28-индуцированной секреции IL-2 образцы инкубировали в присутствии моноклональных антител к CD3-, CD28-молекулам («R&D Systems», США) в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в течение 48 ч.

Процедуру окрашивания поверхностных молекул (CD3, CD28) и внутриклеточного IL-2 осуществляли согласно протоколам фирмы производителя («R&D Systems», США), она включала в себя фиксацию, пермеабиллизацию и окрашивание специфическими моноклональными антителами. Определение уровня экспрессии рецепторных молекул и внутриклеточного анализита в лимфоцитах крови проводили методом трехцветной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием изотипических контролей («R&D Systems», США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD Cell CellQuest for Mac OS® X.

Уровень базальной и CD3/CD28-индуцированной секреции интерлейкина IL-2 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с методическими рекомендациями фирмы-производителя («eBioscience Company», США). Регистрацию оптической плотности содержимого ячеек планшета проводили на фотометре «Multiscan EX» («Thermo», Финляндия) при длине волны 450 нм. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного пакета «Multiskan Magic». Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой и выражали в пг/мл.

Обработку полученных результатов проводили на основе общепринятых статистических методов с помощью пакета программ Statistica for Windows (2000, версия 6.0) фирмы «Statsoft Inc.» и пакета программ «Microsoft Excel» корпорации «Microsoft». Для проверки гипотезы о нормальном законе распределения использовали тест Шапиро-Вилка. При сравнении анализируемых выборок проверяли гипотезу о равенстве их генеральных дисперсий с помощью критерия Фишера. В случае нормального

распределения признака в исследуемых выборках и равенстве их генеральных дисперсий проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента, при различных дисперсиях — с помощью критерия Аспина — Уэлча. Для оценки статистической значимости отличий между независимыми выборками с ненормальным распределением и равными дисперсиями использовали непараметрический критерий Манна — Уитни, при различных дисперсиях — критерий Уолда — Вольфовита. С целью установления взаимосвязей между изучаемыми количественными показателями вычисляли коэффициент корреляции Пирсона (нормальное распределение) и Спирмена (ненормальное распределение). При уровне значимости $p < 0,05$ различие двух сравниваемых величин считали достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ отмечались односторонние изменения цитокинпродуцирующей активности лимфоцитов, выражающиеся в снижении базальной секреции IL-2 по сравнению с соответствующими параметрами у здоровых доноров ($12,9 \pm 3,76$ пг/мл), наиболее выраженном при диссеминированном ЛУТЛ ($3,76 \pm 1,04$ пг/мл, $p < 0,001$). CD3/CD28-индукция клеток вызывала увеличение (по сравнению с базальным уровнем) продукции исследуемого цитокина во всех группах обследуемых лиц, которая, однако, была существенно ниже данного показателя в группе контроля. При этом наиболее выраженное угнетение стимулированной IL-2-секреции (относительно контрольных значений) было зафиксировано в группе больных инфильтративным ЛУТЛ.

На фоне выраженной гипосекреции IL-2 у больных ТЛ регистрировалось снижение количества лимфоцитов, несущих поверхностный маркер CD3, относительно показателей у здоровых доноров, наиболее выраженное при диссеминированной форме ЛУТЛ, где данный показатель снижался в 1,9 раза ($p < 0,001$). Наряду с этим во всех группах обследованных лиц с туберкулезной инфекцией устанавливалось резкое снижение процентного числа CD3⁺CD28⁺ клеток, содержащих внутриклеточный IL-2, по сравнению с таковым в контрольной группе. При этом степень выраженности данных нарушений была существенно выше при лекарственно-устойчивом ТЛ, чем при его лекарственно-чувствительном варианте, и не зависела от клинической формы заболевания. Такая же картина отмечалась относительно числа CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ клеток.

Процент CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ лимфоцитов у больных ТЛ оказался выше такового в группе контроля, где данный показатель составил $49,08 \pm 10,9$ %. При этом при лекарственно-устойчивом варианте ТЛ независимо от клинической формы заболевания обнаруживалось более высокое процентное содержание CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ клеток относительно такового при лекарственно-чувствительном ТЛ. Корреляционный анализ позволил установить прямую зависимость между общим содержанием

CD3-позитивных клеток и числом CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ лимфоцитов при лекарственно-устойчивом варианте инфильтративного ($R = 0,56$, $p = 0,0156$) и диссеминированного ($R = 0,57$, $p = 0,019$) ТЛ.

Угнетение секреторной активности Т-лимфоцитов, установленное в настоящем исследовании, во многом определяется снижением количества данной субпопуляции клеток. Уменьшение общего числа CD3-позитивных лимфоцитов может быть связано как с непосредственной гибелью клеток в очаге воспаления в легких, что приводит к ускоренной миграции Т-клеток из периферической крови [4, 6, 7], так и с запуском программы апоптоза лимфоцитов [8].

В качестве ключевых факторов активации апоптоза при действии на макроорганизм инфекционных агентов в настоящее время рассматриваются нерепарируемые повреждения и рецепторзависимая селекция клеток. Так, было показано, что патогенез иммунной анергии при туберкулезе может быть обусловлен индуцированной возбудителем дезорганизацией хромосомного аппарата иммунокомпетентных клеток и систем, обеспечивающих генетический гомеостаз макроорганизма. При этом угнетение индекса стимуляции ДНК-репарации в лимфоцитах крови при туберкулезе связывают с инфекционно-токсическим повреждением Т-лимфоцитов, которое может быть одной из причин запуска Fas-индуцированного апоптоза и снижения численности данной популяции клеток [8, 11].

Немалая роль в регуляции клеточной гибели принадлежит также фактору некроза опухолей (TNF) α , являющемуся ключевым регулятором иммунного ответа. В условиях туберкулезной инфекции TNF- α -опосредованная гибель иммунокомпетентных клеток может иметь доминирующие значение в развитии ВИН в виду индуцированной *M. tuberculosis* гиперсекреции данного цитокина. Так, известно, что CD4⁺ Т-лимфоциты являются более чувствительными к активации апоптоза за счет высокой экспрессии ими рецепторов FasR и TNFR1 и подавлением активности антиапоптотических генов семейства bcl-2 [11, 12].

Кроме того, установлено, что в индуктивной фазе иммунного ответа путем апоптоза удаляются Т-лимфоциты, не получившие одновременно адекватного костимулирующего сигнала при взаимодействии антигенспецифического рецептора с презентруемым антигеном. Показано, что вирулентные микобактериальные штаммы обладают способностью ингибировать экспрессию костимуляторных молекул CD80/CD86 и таким образом отменять сигнал, «разрешающий» активацию Т-хелперных клеток, участвующих в реакциях клеточно-опосредованного иммунитета, что также вносит вклад в уменьшение численности Т-лимфоцитов. Механизм реализации апоптоза в данном случае зависит от NF-AT-индуцированной экспрессии апоптотического фактора FasL в ответ на «неправильный» антигенный стимул, определяющей дальнейшую судьбу наивного Т-лимфоцита — гибель [8, 12]. В пользу данного предположения

может свидетельствовать регистрируемое нами снижение процентного числа Т-лимфоцитов, несущих поверхностный маркер CD28, у больных ТЛ, максимально выраженное при ЛУТЛ.

Однако следует отметить, что гипопродукция IL-2, а также снижение числа CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ лимфоцитов у больных ТЛ могут быть обусловлены энергией Т-клеток. Выявленное нами увеличение процентного содержания CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ лимфоцитов на фоне выраженной Т-лимфоцитопении и гипосекреции IL-2, вероятно, связано с увеличением числа регуляторных клеток (Treg), оказывающих супрессорное влияние на процессы лимфопролиферации и способствующие развитию Т-клеточной анергии [7]. При этом большое значение придается присутствию на поверхности Treg-лимфоцитов ингибитора костимуляции — молекулы CTLA-4 (cytotoxic T — lymphocyte — associated antigen 4), поскольку именно с этой молекулой связывают реализацию их супрессорной функции. CTLA4, в силу своей высокой авидности к молекулам CD80/CD86 на APC, способен предотвращать костимулирующее действие CD28-молекулы на Т-лимфоциты, блокируя костимуляторный сигнал и таким образом подавлять активацию наивных Т-клеток [3, 12]. Кроме того, важным механизмом в развитии анергии и гипосекреции IL-2 является захват последнего при помощи CD25-рецептора к IL-2 и секвестрация рецептора у эффекторных Т-клеток, что приводит к нарушению дифференцировки и клональной экспансии Th1-клеток [1]. Кроме прямого (контактного) механизма супрессии Th1-клонов лимфоцитов, активация Treg-клеток приводит к секреции супрессорных цитокинов. При дистантном механизме цитокины, выделяемые Treg, например, трансформирующий фактор роста (TGF) β, связываются со своими рецепторами на поверхности Т-эффекторных клеток и ингибируют их активацию, тем самым супрессируя иммунный ответ [6, 11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у больных ТЛ отмечается существенное снижение числа Т-лимфоцитов, гипосекреция IL-2 при CD3/CD28-индукции и изменение процентного соотношения субпопуляций CD3-позитивных клеток, проявляющееся увеличением числа CD28- и IL-2-негативных лимфоцитов. Выявленные изменения носят однонаправленный характер, не зависят от клинической формы ТЛ и максимально выражены у пациентов с лекарственно-резистентным вариантом туберкулезной инфекции. Учитывая, что передача активационного сигнала в процессе межклеточной кооперации, опосредованная Т-клеточным рецептором и костимуляцией через CD28, является одним из ключевых моментов

формирования противотуберкулезного иммунитета, выявленные нами изменения экспрессии основных Th1-направляющих молекул в лимфоцитах при ТЛ свидетельствуют о неспособности Т-клеток эффективно отвечать на антигенный стимул.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК №16.512.11.2046 от 14.02.2011 г.) и РФФИ (Проект №11-04-98057-р).

ЛИТЕРАТУРА

1. Зенин В.В. Динамика экспрессии CD25 в лимфоцитах периферической крови человека, стимулированных фитогемагглютинином или интерлейкином-2 // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 6. — С. 506 — 510.
2. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии // РЖГГК. — 2008. — № 4. — С. 4 — 13.
3. Казимирский А.Н. Активационные маркеры лимфоцитов как показатели дисрегуляции иммунной системы при воспалении // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 2006. — № 1. — С. 2 — 7.
4. Новицкий В.В. Особенности поверхностного фенотипа лимфоцитов у больных туберкулезом легких // Мед. иммунология. — 2005. — Т. 7, № 5 — 6. — С. 587 — 592.
5. Новицкий В.В. Особенности функциональной активности лимфоцитов крови у больных туберкулезом // Иммунология. — 2006. — № 2. — С. 76 — 79.
6. Новицкий В.В. Патология иммунитета: причина или следствие туберкулезной инфекции? // Бюл. сибир. мед. — 2006. — Т. 5, № 2. — С. 70 — 74.
7. Сахно Л.В. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2004. — № 5. — С. 23 — 28.
8. Уразова О.И. Молекулярно-генетические факторы туберкулеза легких // Бюл. сибир. мед. — 2010. — № 5. — С. 5 — 13.
9. Хасанова Р.Р. Роль цитокинов в модуляции субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2008. — № 3. — С. 31 — 35.
10. Чурина Е.Г. Роль gdT- и NK-клеток в иммунном ответе // Бюл. сибир. мед. — 2010. — № 5. — С. 138 — 142.
11. Чурина Е.Г. Факторы иммуносупрессии при различных патологиях // Бюл. сибир. мед. — 2011. — № 4. — С. 103 — 111.
12. Шилько Т.А. Апоптоз лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких // Вопр. патогенеза типовых патологических процессов: тр. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. — Новосибирск, 2009. — С. 392 — 396.

Сведения об авторах

Кошкина Анна Алексеевна — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 6/2, кв. 638; тел.: 8-961-887-27-14; e-mail: koshkina1986@yandex.ru)

Уразова Ольга Ивановна — профессор кафедры патофизиологии СибГМУ, доктор медицинских наук, профессор

Новицкий Вячеслав Викторович — заведующий кафедрой патофизиологии СибГМУ, заслуженный деятель науки РФ, академик РАМН

Есимова Ирина Евгеньевна — докторант кафедры патофизиологии СибГМУ, кандидат медицинских наук

Хасанова Резеда Рахматулловна — докторант кафедры патофизиологии СибГМУ, кандидат медицинских наук

К.С. Красильникова¹, Е.Г. Поленок¹, Т.П. Аносова¹, М.П. Аносов¹, Л.А. Гордеева¹,
О.А. Глушкова¹, О.С. Попова¹, И.В. Шаталина¹, М.В. Костянко¹, Л.С. Равинг², А.Н. Глушков¹

АССОЦИАЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА НА КСЕНО- И ЭНДОБИОТИКИ И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ ИХ БИОТРАНСФОРМАЦИИ С ВОЗНИКНОВЕНИЕМ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ ПЛОДА

¹ Институт экологии человека Сибирского отделения РАН (Кемерово)

² ГКБ № 1 им. М.Н. Горбуновой, женская консультация № 1 (Кемерово)

Выявлена взаимосвязь иммунного ответа на бензо[а]пирен и прогестерон в сочетании с полиморфизмом генов ферментов детоксикации (CYP1A2*1F и GSTT1) и возникновения врожденных пороков развития плода. Показано, что при высоких значениях соотношения IgA-антител к бензо[а]пирену и прогестерону в сочетании с мутантным аллелем гена CYP1A2*1F и делеционным генотипом гена GSTT1 шанс развития репродуктивной патологии увеличивается в 41 раз.

Ключевые слова: антитела к бензо[а]пирену, генетический полиморфизм, врожденные пороки развития плода

THE ASSOCIATION OF IMMUNE RESPONSE TO XENO- AND ENDOBIOTIKS AND THEIRS BIOTRANSFORMATION ENZYME GENE POLYMORPHISM WITH CONGENITAL MALFORMATIONS OF THE FETUS

K.S. Krasilnikova¹, E.G. Polenok¹, T.P. Anosova¹, M.P. Anosov¹, L.A. Gordeyeva¹,
O.A. Glushkova¹, O.S. Popova¹, I.V. Shatalina¹, M.V. Kostyanko¹, L.S. Raving²,
A.N. Glushkov¹

¹ Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo

² Clinical Hospital No. 1 named after M.N. Gorbunova, maternity consulting centre No. 1, Kemerovo

The correlation between immune response to benzo(a)pyrene and progesterone in combination with detoxification enzyme gene polymorphism (CYP1A2*1F and GSTT1) and the occurrence of congenital malformations of the fetus was revealed. It is shown that at high ratio of IgA-antibodies to benzo(a)pyrene and to progesterone in conjunction with the mutant allele of the gene CYP1A2*1F and the deletion genotype of the gene GSTT1 chance of the reproductive pathology developing increases to 41 times.

Key words: antibodies to benzo(a)pyrene, a genetic polymorphism, congenital fetal malformations

За последние десятилетия в дородовой профилактике и диагностике врожденных пороков развития плода (ВПРП) достигнуты большие успехи. Однако, генетическая гетерогенность и мультифакторная этиология затрудняет детекцию данной патологии. В России ВПРП занимают второе место в структуре младенческой смертности, составляя в среднем 20,3 % смертей [8]. Высокая частота пороков развития, высокий удельный вес данной патологии в структуре причин младенческой смертности, детской заболеваемости и инвалидности делает актуальным разностороннее изучение ВПРП.

Факторы, влияющие на атипичное внутриутробное развитие плода, делят на две группы в соответствии с путем их воздействия: экзогенные и эндогенные. Многие авторы отмечают, что под воздействием химических веществ развивается нарушение фетоплацентарного комплекса на органном, клеточно-тканевом и субклеточном уровнях, что способствует возникновению спонтанных аборт, мертворожденных и ВПРП [11]. Доказана тератогенная активность полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), в частности, бензо[а]пирена (Вр) [12] и его аддуктов с макромолекулами организма [16].

Состояние эндокринной системы матери во многом определяет развитие плода. Недостаток или избыток различных стероидных гормонов, необходимых для возникновения и развития физиологической беременности, играют в данном случае одну из главных ролей. Прогестерон (Pg) является основным гормоном беременности, необходим для трансформации эндометрия в децидуальную ткань и подготовки к имплантации эмбриона, способствует росту и васкуляризации миометрия, снижает его тонус и возбудимость. Pg-индуцированный блокирующий фактор обеспечивает иммунологическую толерантность организма матери к развивающемуся эмбриону и локальный гемостаз в эндометрии [15]. Существуют публикации, в которых показана связь между увеличением анти-Pg антител (АТ) и возникновением привычного невынашивания беременности [1, 10]. В работах Т.А. Заманской отмечается уменьшение уровня прогестерона при ВПРП [6].

Также к эндогенным факторам, влияющим на формирование ВПРП, стоит отнести полиморфизм генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков [4]. В связи со схожестью химической структуры ПАУ и стероидные гормоны вовлечены в схожие метаболические циклы, где из химически инертных веществ в первой фазе биотрансформации при

помощи суперсемейства цитохромов P450 (*CYP*) образуются реакционноспособные метаболиты. Активация большинства ПАУ осуществляется ферментом *CYP1A2*1F*. У людей индивидуальная вариабельность в активности фермента обусловлена наличием значительного числа полиморфизмов в структуре гена. Установлены полиморфизмы в гене *CYP1A2*, детерминирующие высокую и низкую активность фермента. Окисленные активированные соединения обладают генотоксическими свойствами за счет образования аддуктов с ДНК. Аддукты с макромолекулами инициируют выработку специфических АТ [7], роль которых до сих пор до конца не ясна. Глутатион-S-трансфераза (*GST*) — фермент II фазы биотрансформации, функция которого заключается в присоединении активных метаболитов к глутатиону, тем самым нейтрализуются продукты, наработанные в первой фазе и облегчается выведение образовавшихся комплексов из организма. *GSTT1* наряду с детоксификацией ПАУ участвует в биосинтезе биологически активных веществ, в том числе и стероидных гормонов [14]. Отсутствие его функциональной активности связано с обширными делециями в гене *GSTT1*.

Предполагается, что в раннем онтогенезе формируется баланс в системе иммунохимической адаптации организма к низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам, обеспечивающий физиологическое течение беременности и развитие плода и новорожденного. Дисбаланс может приводить к возникновению ВПРП или другим нарушениям репродуктивной функции [13].

Цель работы: выявить взаимосвязь между уровнями антител к Вр и Рг (АТ-Вр и АТ-Рг) и полиморфизмом генов *CYP1A2*1F* и *GSTT1* у женщин с врожденными пороками развития плода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 260 беременных женщин. 95 женщинам по результатам ультразвукового обследования был поставлен диагноз ВПРП. В соответствии с Международной классификацией болезней (МКБ-10: Q00 — Q99) выявлена следующая структура врожденной аномалии: пороки сердечно-сосудистой системы — 23,25 %, моче-выделительной системы — 20,7 %, патология ЦНС — 18,3 %, пороки костно-мышечной системы — 15,8 %, множественные ВПРП — 12,2 %, а также присутствовали другие пороки развития — 9,75 %, среди которых пороки желудочно-кишечного тракта, пороки моче-половой системы, порок пуповинной трубки. 165 беременных женщин с физиологическим течением беременности (ФБ) вошли в группу сравнения. Средний возраст в обеих группах составил $26,1 \pm 0,7$ года. Все женщины находились на 12 — 26 неделях беременности (II триместр). Состояние здоровья оценивалось на основе медицинских карт.

АТ к Вр и Рг определяли методом неконкурентного ИФА в собственной модификации [2]. Уровень АТ, специфичных к ксено- и эндобиотикам, определяли по формулам:

$$AT-Bp = (OD_{(Bp-BSA)} - OD_{(BSA)}) / OD_{(BSA)};$$

$$AT-Pg = (OD_{(Pg-BSA)} - OD_{(BSA)}) / OD_{(BSA)};$$

где OD — значение оптической плотности в соответствующих лунках,

Таким образом, уровень АТ к Вр и Рг показывает, во сколько раз специфическое связывание АТ с ксенобиотиком и эндобиотиком превышает неспецифическое связывание с белком-носителем.

Соотношение уровней АТ ксенобиотик/эндобиотик рассчитывали по формуле:

$$AT-Bp/Pg = (OD_{(Bp-BSA)} - OD_{(BSA)}) / (OD_{(Pg-BSA)} - OD_{(BSA)}).$$

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Используемые тест-системы для молекулярно-генетического анализа SNP-полиморфизма гена *CYP1A2* (-163 А -> С) и полиморфизма *GSTT1* были разработаны в ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск). Исследование полиморфизма *CYP1A2*1F* проводили с помощью ПЦР/ПДРФ анализа. Типирование гена *GSTT1* проводилось методом мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени [3]. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. С использованием критерия Шапиро — Уилка был выявлен ненормальный характер распределения выборки и в дальнейшем оценку статистической значимости различий между группами проводили при помощи непараметрического U-критерия Манн-Уитни и критерия χ^2 с поправкой Йетса для непрерывной вариации. Отношение шансов (OR) рассчитывали по методу [5] с доверительным интервалом (CI) при 95 % уровне значимости. Нами была применена поправка Бонферрони для исключения статистических ошибок при множественных сравнениях. Отличия между группами считали статистически значимыми, если экспериментально установленный уровень значимости был меньше уровня значимости по Бонферрони: $p < 0,05/m$, где m — количество независимых статистических тестов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании показано, что сочетание генотипов *C/A + C/C CYP1A2* и *GSTT1 «+»* имеет статистически значимое отличие по критерию χ^2 между группами ВПРП и ФБ, что также отражено в работе Гордеевой Л.А. с соавторами [3]. Такое сочетание более чем в 1,5 раза чаще наблюдалось у женщин с физиологическим течением беременности (табл. 1). Шанс возникновения патологии в данном случае 0,48, в то время как шанс иметь физиологическую беременность при таких генотипах увеличивается в 2 раза. При других сочетаниях полиморфизмов генов *CYP1A2*1F* и *GSTT1* статистически значимые отличия между группами по критерию χ^2 не выявлены.

В результате проведенного исследования у женщин с ВПРП и женщин с ФБ выявлены АТ классов А, G и М к Вр и Рг. Ранее показано, что повышенные показатели соотношения уровней АТ

Таблица 1

Частота встречаемости полиморфизмов генов биотрансформации, соотношений уровней антител к ксено- и эндобиотикам и их сочетаний при физиологической беременности (ФБ) и при врожденных пороках развития плода (ВПП)

Полиморфизмы генов биотрансформации, соотношения АТ Вр/Рг, их сочетание	ФБ (%)	ВПП (%)	χ^2 ; p (p_{cor})	OR (95 % CI) для ВПП/ OR (95 % CI) для ФБ
C/A+C/C CYP1A2, GSTT1 «+»	37,5	22,3	5,7; 0,001 (0,008)	0,48 (0,18–1,2)/ 2,06 (0,8–5,3)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT «0»,	10,9	19	2,7; 0,09 (0,36)	
A/A CYP1A2, GSTT1 «+»	40,6	36,3	0,001; 0,94 (3,76)	
A/A CYP1A2, GSTT1 «0»	10,9	19	2,7; 0,09 (0,36)	
IgA Вр/Рг ≥ 2	29,3	75,6	40,5; 0,00002 (0,00016)	7,3 (2,7–19,1)/ 0,14 (0,05–0,36)
IgG Вр/Рг ≥ 3	15,4	42,6	17,4; 0,00007 (0,00056)	4,01 (1,5–10,5)/ 0,25 (0,1–0,6)
IgM Вр/Рг ≥ 2	45,5	82,9	27,2; 0,00001 (0,00008)	6,2 (2,4–16)/ 0,24 (0,09–0,6)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT1 «+», IgA Вр/Рг ≥ 2	5,4	19,1	16,6; 0,00011 (0,00088)	3,98 (1,5–10,2)/ 0,25 (0,09–0,6)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT1 «+», IgA Вр/Рг < 2	32,1	3,2	27,8; 0,000001 (0,000008)	0,08 (0,03–0,2) / 12,43 (4,8–31,9)
A/A CYP1A2, GSTT1 «+», IgA Вр/Рг ≥ 2	12,7	27,6	8,01; 0,0014 (0,0112)	2,6 (1,1–6,3)/ 0,38 (0,15–0,98)
A/A CYP1A2, GSTT «+», IgA Вр/Рг < 2	27,8	11,7	8,2; 0,0004 (0,0032)	0,35 (0,13–0,9)/ 2,8 (1,1–7,3)
A/A CYP1A2, GSTT1 «0», IgA Вр/Рг ≥ 2	0	10,6	15,5; 0,0001 (0,0008)	41,13 (15,9–105,7)/ 0,02 (0,009–0,06)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT «+», IgG Вр/Рг < 3	26,7	13,8	7,43; 0,0016 (0,012)	0,39 (0,15–0,9)/ 2,57 (1,1–6,6)
A/A CYP1A2, GSTT «0», IgM Вр/Рг ≥ 2	1,8	12,7	11,22; 0,0008 (0,0064)	7,2 (2,77–18,28)/ 0,14 (0,06–0,36)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT «+», IgM Вр/Рг < 2	29	4,3	21,5; 0,000001 (0,000008)	0,12 (0,05–0,3)/ 8,3 (3,2–21,3)

(IgA Вр/Рг ≥ 2; IgG Вр/Рг ≥ 3; IgM Вр/Рг ≥ 2) значительно чаще наблюдались у женщин с ВПП. При их наличии шанс возникновения патологии беременности значительно возрастает (OR = 7,3; CI 2,7–19,1; OR = 4,0; CI 1,5–10,5 и OR = 5,6; CI 2,1–14,7 соответственно) [9].

В настоящем исследовании нами выявлено возрастание шансов возникновения ВПП при сочетании различных полиморфизмов генов I и II фазы детоксикации и повышенных значений АТ Вр/Рг.

При относительно благополучном сочетании генотипов C/A + C/C CYP1A2, GSTT1 «+» и наличии повышенного значения IgA Вр/Рг ≥ 2 шанс развития репродуктивной патологии возрастает почти в 4 раза (табл. 1). В то же время сочетание данных генотипов с пониженным показателем IgA Вр/Рг < 2 чаще наблюдалось у женщин с физиологическим течением беременности и увеличивает шанс на беременность без патологии более чем в 12 раз.

Другое относительно благополучное сочетание генотипов A/A CYP1A2, GSTT1 «+» с повышенным значением IgA Вр/Рг ≥ 2 значительно чаще наблюдалось в группе с ВПП и способствует возрастанию шанса на возникновение патологии. В то время как сочетание данных генотипов с пониженным значением IgA – АТ увеличивает шанс на благоприятное течение беременности почти в 3 раза.

Максимальный риск возникновения ВПП наблюдается при наличии относительно неблагоприятного сочетания генотипов A/A CYP1A2, GSTT1 «0» и повышенного показателя IgA Вр/Рг ≥ 2.

Данное сочетание было выявлено у 10,6 % женщин группы с ВПП и отсутствовало у женщин с ФБ. Шанс возникновения ВПП увеличивался более чем в 41 раз. Другие сочетания полиморфизмов генов и уровней IgA-АТ не дали достоверных различий по частоте обнаружения в группах контроля и с ВПП.

При сочетании IgG-АТ и полиморфизмов генов CYP1A2 и GSTT1 достоверная разница по критерию χ^2 имела место лишь в одном случае – при наличии у женщин C/A + C/C CYP1A2, GSTT1 «+» и IgG Вр/Рг < 3. Данное сочетание выявлялось в 26,7 % случаев физиологической беременности и в 13,8 % случаев с ВПП. Шанс вынашивания ФБ при этом увеличивается в 2,5 раза. Остальные сочетания полиморфизмов генов с показателями IgG-АТ были статистически не достоверными.

IgM-АТ в совокупности с полиморфизмом генов CYP1A2 и GSTT1 давали статистически значимые результаты по критерию χ^2 в двух случаях: явно неблагоприятное сочетание генотипов A/A CYP1A2, GSTT1 «0» и повышенного показателя IgM Вр/Рг ≥ 2, как и ожидалось, чаще выявлялось в группе с ВПП и увеличивает шанс на развитие ВПП более чем в 7 раз. В то время как пониженный показатель IgM Вр/Рг < 2 совместно с явно благополучным сочетанием генотипов C/A + C/C CYP1A2, GSTT1 «+» обнаружен чаще в группе сравнения и увеличивает шанс на вынашивание ФБ более чем в 8 раз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые выявлены взаимосвязи генетических полиморфизмов ферментов биотрансформации низкомолекулярных ксено- и эндобиотиков и уровней соответствующих специфических АТ при ВПРП. Это подтверждает ранее высказанное предположение о дисбалансе в системе иммунохимического гомеостаза, как одной из причин тератогенеза. Раскрытие механизмов такого дисбаланса требует дальнейших более детальных исследований. В то же время очевидно, что молекулярно-генетический анализ в сочетании с определением уровней АТ к химическим канцерогенам и стероидным гормонам расширяет возможности ранней диагностики ВПРП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гладкова К.А., Менжинская И.В., Сухих Г.Т., Сидельникова В.М. Роль сенсibilизации к прогестерону в клинике первичного невынашивания беременности // Проблемы репродукции. — 2007. — № 6. — С. 95–98.
2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А. и др. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Рос. иммунол. журн. — 2011. — Т. 5, № 1. — С. 39–44.
3. Гордеева Л.А., Глушкова О.А., Ермоленко Н.А., Попова О.С. и др. Сочетание материнских полиморфизмов *CYP1A2*F* и *GST* при врожденных пороках развития у плода и новорожденного // Мед. генетика. — 2011. — № 11. — С. 9–15.
4. Гуляева Л.Ф., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе. — Новосибирск, 2000. — Вып. 57. — 83 с. (серия «Экология»)
5. Двойрин В.В. Методы эпидемиологических исследований при злокачественных опухолях. — М.: Медицина, 1975. — 100 с.
6. Заманская Т.А. Неинвазивный пренатальный мониторинг в снижении перинатальных потерь: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — 2009. — 46 с.

7. Ковалев И.Е., Шипулина Н.В. Иммунохимические механизмы адаптации организма к окружающей среде // Известия РАН. — 1992. — № 1. — С. 31–41. (серия биологическая)

8. Корсунский А.А. Младенческая смертность в Российской Федерации. Пути снижения (изложение доклада на коллегии МЗ РФ 09.01.2001) // Педиатрия. — 2001. — № 2. — С. 5.

9. Красильникова К.С., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Аносов М.П. и др. Образование антител к ксено- и эндобиотикам при врожденных пороках развития плода // Мед. иммунология. — 2011. — Т. 13, № 4–5. — С. 425–426.

10. Менжинская И.В., Гладкова К.А., Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Антипрогестероновые антитела в клинике первичных потерь беременности // Иммунология. — 2008. — № 1. — С. 34–37.

11. Новикова И.И., Оглезнев Г.А., Ляпин В.А. Социально-гигиенические и экологические аспекты сохранения популяционного здоровья детей и подростков // Здоровье населения и среда обитания. — 2005. — № 6. — С. 4–12.

12. Фетцер Д.К. Химия и анализ полициклических ароматических углеводородов. — Нью-Йорк: Виллей, 2000. — 215 с.

13. Glushkov A.N. Immunological mechanisms of adaptation to the low-weight chemical compounds in ontogenesis // Medical Hypotheses. — 2003. — Vol. 61, N 3. — P. 405–411.

14. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione Transferases // Annual Review Pharmacology and Toxicology. — 2005. — Vol. 45. — P. 51–88.

15. Szekeres-Bartho J., Par G., Szereday L., Smart C.Y. et al. Progesterone and non-specific immunological mechanisms in pregnancy // American Journal Reproduction of Immunology. — 1997. — Vol. 38. — P. 176–182.

16. Weinstein J.B., Jeffrey A.M., Jennette K.W. Benzo[a]pyrene diolepoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo // Science. — 1976. — Vol. 12. — P. 193.

Сведения об авторах

Аносов Михаил Петрович – научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН

Аносова Татьяна Петровна – научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН

Глушков Андрей Николаевич – директор ИЭЧ СО РАН, доктор медицинских наук, профессор

Глушкова Ольга Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН

Гордеева Людмила Александровна – заведующая лабораторией иммуногенетики ИЭЧ СО РАН, кандидат биологических наук

Костянюк Михаил Владимирович – инженер технологи лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН

Красильникова Ксения Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН; (650071, г. Кемерово, ул. Молодежная, 13–10; тел.: 8-905-905-8411)

Поленок Елена Геннадьевна – заведующая лабораторией иммунохимии ИЭЧ СО РАН, кандидат фармацевтической науки

Попова Ольга Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН

Равинг Людмила Сергеевна – заведующая женской консультацией №1 МБУ ГКБ №1 г. Кемерово, врач акушер-гинеколог

Шаталина Ирина Викторовна – инженер-технолог I категории лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН.

А.С. Красницкая, А.С. Шитихина

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНСЕРВАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛЛИТОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ВИРУС ЭПШТЕЙН – БАРР ИНФЕКЦИЕЙ*Владивостокский государственный медицинский университет (Владивосток)*

Для оценки клиничко-иммунологической эффективности иммуномодулятора реаферон-ЕС-липинта были обследованы в динамике 70 человек (41 женщина и 29 мужчин) с диагнозом хронический тонзиллит. Из них у 30 человек диагностирована вирус Эпштейн-Барра (ВЭБ) инфекция (1-я группа), у 40 человек — *Streptococcus pyogenes* (2-я группа). Выявлены особенности локального иммунитета при хроническом тонзиллите, ассоциированном с ВЭБ-инфекцией. Они характеризуются увеличением IL-10 в разгаре болезни и IL-1β, IL-6 и IL-4 на 7 сутки исследования в слюне у пациентов с ВЭБ-инфекцией. Консервативное лечение пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с ВЭБ-инфекцией реаферон-ЕС-липинтом обеспечивало ускорение нормализации локального цитокинового профиля и клинически эффективно в 63,3 % случаев.

Ключевые слова: цитокины, вирус Эпштейн – Барра инфекция, хронический тонзиллит

CLINICAL-IMMUNOLOGY EFFICIENCY OF CONSERVATIVE TREATMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC TONSILLITIS ASSOCIATED WITH EPSTEIN – BARR VIRUS INFECTION

A.S. Krasnitskaja, A.S. Shitihina

Vladivostok State Medical University, Vladivostok

To assess clinical-immunological efficiency of an immunomodulator reaferon-ES-lipinta 70 people with chronic tonsillitis (41 women and 29 men) were surveyed in dynamics. Among them 30 people had Epstein – Barr virus infection (1st group), and in 40 people (the 2nd group) *Streptococcus pyogenes* was diagnosed. The features of local immunity at chronic tonsillitis associated with the EBV infection were revealed. They are characterized by increase of IL-10 in the high point of an illness and of IL-1β, IL-6 and IL-4 on the 7th day of research in saliva of patients with the EBV infection. Conservative treatment of patients with chronic tonsillitis associated with the EBV infection of the reaferon-EC-lipint provided acceleration of normalization of a local profile of cytokine and was clinically effective in 63,3 % of cases.

Key words: cytokines, Epstein – Barr virus infection, chronic tonsillitis

Проблема хронического тонзиллита, несмотря на появление современных методов его диагностики и лечения, далека от своего решения.

Хронический тонзиллит встречается у 5 – 10 % взрослого населения [3, 7].

В настоящее время хронический тонзиллит трактуется как хронический воспалительный процесс в миндалинах, приводящий к патологическим изменениям, нарушающим иммунологическую функцию организма, при этом сами миндалины становятся источником инфекции [5].

Важный раздел «тонзиллярной проблемы» — установление этиопатогенетически обоснованных показаний к различным методам лечения, разработка достоверных критериев оценки эффективности лечебных мероприятий. С этой точки зрения большое внимание уделяется корреляции клинических признаков с данными бактериологических и иммунологических исследований. Изучение характера микробной флоры небных миндалин позволяет считать основным возбудителем хронического тонзиллита гемолитический стрептококк, однако нельзя не принимать во внимание возрастающую роль в этиологии золотистого стафилококка, аденовирусов, герпесвирусов [6].

Учитывая важную роль небных миндалин в формировании локального иммунитета, особенно важ-

ным представляется использование современных иммунологических методов, позволяющих оценить состояние различных звеньев системы иммунитета. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было исследование клиничко-иммунологических особенностей консервативного лечения на примере пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с вирус Эпштейн – Барр инфекцией.

МЕТОДИКА

Обследовано в динамике 70 человек (41 женщина и 29 мужчин) с диагнозом хронический тонзиллит в период разгара болезни: из них у 30 человек выявлен вирус Эпштейн – Барр (1-я группа), у 40 человек — *Streptococcus pyogenes* (2-я группа). Больные обследованы в период разгара заболевания, угасания клинических симптомов и в период реконвалесценции. В группу сравнения включены 15 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту. Все пациенты с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с вирус Эпштейн – Барр инфекцией, получали реаферон-ЕС-липинт по 1 млн. МЕ 2 раза в сутки, в течение 10 дней. Одновременно с иммунокоррекцией у всех пациентов с хроническим тонзиллитом проводилась этиотропная и местная терапия. Все пациенты наблюдались в течение года.

Исследовали материал из зева на микрофлору и чувствительность к антибиотикам, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) определяли ДНК вируса Эпштейн – Барр в слюне и соскобе слизистых с задней стенки глотки в период обострения. Для выявления ДНК использовали ПЦР и тест-системы ЗАО «Вектор-Бест» г. Новосибирск. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли антитела различных классов к вирусу Эпштейн – Барр: EBV-VCA-IgM, EBV-EA-IgG, EBV-NA-IgG в сыворотке крови. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, Biostat с применением непараметрических методов и корреляционного анализа. Результаты представляли в виде медианы (Me), достоверность средних значений по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе динамики локального цитокинового профиля у пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с ВЭБ-инфекцией (табл. 1) установлено увеличение провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-17 в разгаре заболевания. В период угасания клинических симптомов увеличивался уровень всех провоспалительных цитокинов. К 28-м суткам снижалось содержание IL-1 β , IL-6 ($p < 0,05$). IL-1 β ответственен за механизмы координации и играет важную регуляторную роль на всех стадиях воспалительного процесса. При ответе на внедрение патогенов продукция IL-1 начинается в зоне первого контакта клеток-продукторов с микроорганизмами, т.е. местно в области повреждения. В связи с этим и первые проявления биологического действия IL-1 сводятся к активации местных защитных реакций [1].

У обследованных пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с ВЭБ-инфекцией уровень IL-17 был повышен в 1-й день исследования и сохранялся высоким на всем этапе мониторинга. По данным С.А. Кетлинского (2008), IL-17 является мощным регулятором нейтрофилов. Основными продуцентами его являются CD4+ и CD8+ Т-клетки. Преимущественно провоспалительные

и гемопоэтические активности IL-17 являются следствием их способности стимулировать продукцию цитокинов и хемокинов. IL-17 является наиболее активным в индуцировании продукции бета-2-дефензина человека, колониестимулирующего фактора для гранулоцитов и воспалительного белка макрофага-3 человека, которые являются основными компонентами врожденного иммунитета [1]. Высокая локальная концентрация IL-17 свидетельствует о персистенции воспаления.

Оценка уровня противовоспалительных цитокинов у пациентов 1-й группы позволила выявить увеличение уровня IL-10 и TGF- β_1 в 1-е сутки исследования. Интерлейкин-10 вырабатывается Th2-клетками, а также моноцитами и цитотоксическими Т-клетками. Основной эффект интерлейкина-10 заключается в подавлении синтеза цитокинов Th1-клетками и в снижении активности макрофагов, в том числе продукции воспалительных цитокинов. Интерлейкин-10 подавляет экспрессию молекул МНС II класса, пролиферацию Т-клеток, вызванную митогенами, а также развитие гиперчувствительности замедленного типа. Одновременно может стимулировать синтез IgE. В результате интерлейкин-10 способствует развитию гуморальной составляющей иммунного ответа. ДНК и аминокислотные последовательности человеческого IL-10 высокоомологичны с 1 фактором, антиген-распознающего рецептора В-клеток белком, который кодируется геном вируса Эпштейна – Барр, и который имитирует многие клеточные биологические функции этого цитокина, и, следовательно, может играть роль во взаимодействии «хозяин-вирус» [2, 7].

В период угасания клинических симптомов у пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с ВЭБ-инфекцией, возрастал уровень IL-4 и TGF- β_1 . К 28 дню исследования снижался уровень всех противовоспалительных цитокинов за исключением TGF- β_1 .

При анализе цитокинового профиля слюны у пациентов 2-й группы установлено увеличение всех провоспалительных цитокинов (табл. 2) с 1 по 7 дни исследования, особенно IL-17 в 1 день и IL-1 β на 7-й

Таблица 1

Уровень цитокинов в слюне у пациентов хроническим тонзиллитом, ассоциированным с вирус Эпштейн – Барр инфекцией

Цитокины	1-й день исследования. Me (Q1; Q2) (p_1)	7-й день исследования. Me (Q1; Q2) (p_2)	28-й день исследования. Me (Q1; Q2) (p_3)	Контрольная группа (практически здоровые) Me (Q1, Q2)
IL-1 β	204,7 (120,5; 355)*#	376,3 (141; 534)*#	109,1 (42,2; 206,8)*#	2,1 (0,3; 14,8)
IL-6	2,7 (2,7; 8,5)#	14,45 (2,7; 20,2)*#	2,6 (2,5; 2,7)#	2 (2,7; 6,2)
IL-17	48,5 (12,9; 90,4)*#	45,4 (17,6; 165,2)*#	46,7 (7; 74,5)*#	37,2 (8,2; 48,1)
IL-4	2,7 (2,7; 8,5)#	14,45 (2,7; 20,2)*#	2,6 (2,5; 2,7)#	2 (2,7; 6,2)
IL-10	8,7 (6,1; 15,3)*#	6,2 (6,1; 6,4)	6,2 (6,1; 6,4)	6 (5,5; 6,7)
TGF- β_1	6,3 (3; 12,9)*#	8,5 (8; 8,9)*#	7,5 (7; 18,9)*#	3,9 (3,1; 4,6)

Примечание: Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q2 – верхний квартиль, * – наличие статистически значимых различий с контрольной группой ($p < 0,05$), критерий Манна – Уитни (U), # – наличие статистически значимых различий между сравниваемыми группами по этиологии.

день исследования. В период реконвалесценции снижался уровень IL-1 β , IL-6, IL-17, однако, на протяжении всего периода мониторинга их значения превышали показатели контрольной группы.

IL-6 синтезируется многими типами клеток, участвующими в инициации и регуляции воспаления и иммунного ответа: Т-лимфоцитами, моноцитами/макрофагами и некоторыми другими клетками. Данный цитокин в организме активирует пролиферацию активированных антигеном В-лимфоцитов, активирует пролиферацию Т-лимфоцитов, усиливает функциональную активность цитотоксических лимфоцитов, стимулирует гранулоцитарный росток кроветворения и проявления активности мульти-CSF в сочетании с IL-13. Провоспалительное действие IL-6 реализуется за счет активации экспрессии молекул адгезии на эндотелии и хемотаксиса некоторых типов лейкоцитов, усиления функциональной активности фибробластов и остеокластов, активации острофазового ответа путем индукции синтеза в печени С-реактивного белка, сывороточного амилоида А и фибриногена. Так IL-6, кроме главной функции активатора защитных реакций, выполняет также роль регулятора развития иммунитета [4].

В исследовании выявлено раннее повышение противовоспалительного цитокина TGF- β_1 у пациентов 2-й группы (табл. 2). В период угасания клинических симптомов увеличивался уровень IL-4. Зафиксировано снижение уровня IL-4 до контрольных значений и TGF- β_1 в период реконвалесценции. Содержание IL-10 было в пределах нормы на всем протяжении исследования.

Сравнительный анализ локального цитокинового профиля двух исследуемых групп выявил различия динамики содержания IL-17, IL-4 и TGF- β_1 в зависимости от этиологии хронического тонзиллита: при бактериальной инфекции они были в 1,5 раза выше, чем при вирусной. К 28-му дню нормализовались практически все показатели, за исключением IL-1 β , IL-17. Уровень IL-10 при хроническом тонзиллите вирусной природы повышен в разгаре болезни, а в период угасания клинических симптомов регистрировались высокие показатели IL-1 β , IL-6, IL-4 и TGF- β_1 . К 28-м суткам снижались показатели IL-6, IL-4 и IL-10 до уровня контрольных значений, но сохранялся высокий уровень IL-1 β , IL-17 и TGF- β_1 .

Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов у пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с вирус Эпштейн – Барр инфекцией было выше, чем у пациентов с бактериальной инфекцией с 1-го по 7-й день исследования ($p < 0,05$), к 28-му дню показатели в обеих группах не отличались друг от друга (табл. 3).

При анализе влияния реаферон-ЕС-липидта на состояние пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с вирус Эпштейн – Барр инфекцией, можно отметить его положительный эффект, проявляющийся в улучшении соответствующих субъективных и объективных клинических показателей. У большинства пациентов (19 человек – 63,3 %) оно было значительным и выразилось в улучшении общего самочувствия, исчезновении дискомфорта, сухости, першения в горле, исчезновении неприятного запаха изо рта, а также в сни-

Таблица 2
Уровень цитокинов в слюне у пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным со *Streptococcus pyogenes*

Цитокины	1-й день исследования. Me (Q1, Q2)	7-й день исследования. Me (Q1, Q2)	28-й день исследования. Me (Q1, Q2)	Контрольная группа (практически здоровые) Me (Q1, Q2)
IL-1 β	87,7 (59,5; 297,5)*#	141 (75; 376,3)*#	109,1 (75,1; 187,9)*#	2,1 (0,3; 14,8)
IL-6	4,15 (2,7; 15,9)*#	8,5 (2,7; 8,5)*#	5,6 (2,7; 5,6)*#	2 (2,7; 6,2)
IL-17	79,5 (14,2; 138,3)*#	53,9 (16,8; 135,3)*#	51,2 (18,2; 106,7)*#	37,2 (8,2; 48,1)
IL-4	4,15 (2,7; 15,9)*#	8,5 (2,7; 8,5)*#	5,6 (2,7; 5,6)*#	2 (2,7; 6,2)
IL-10	6,4 (6,1; 6,7) #	6,3 (6,2; 6,4)	6,2 (5,8; 7,12)	6 (5,5; 6,7)
TGF- β_1	10,7 (4,6; 14,3)*#	4,6 (3,1; 13,7)*#	4,6 (3,1; 13,7)*#	3,9 (3,1; 4,6)

Примечание: Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q2 – верхний квартиль, * – наличие статистически значимых различий с контрольной группой ($p < 0,05$), критерий Манна – Уитни (U), # – наличие статистически значимых различий между сравниваемыми группами по этиологии.

Таблица 3
Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов у пациентов с хроническим тонзиллитом

Дни исследования	Пациенты хроническим тонзиллитом, ассоциированным с вирус Эпштейн – Барр инфекцией	Пациенты с хроническим тонзиллитом, ассоциированным со <i>Streptococcus pyogenes</i>
1-й день	14,45#	8,06
7-й день	14,96#	10,48
28-й день	11,42	10,11

Примечание: # – наличие статистически значимых различий между сравниваемыми группами по этиологии.

жении частоты простудных заболеваний. Наряду с перечисленными субъективными показателями у пациентов были зарегистрированы такие объективные изменения, как уменьшение гиперемии, инфильтрации передних и задних небных дужек, исчезновение казеозных пробок в лакунах миндалин, сужение расширенных лакун, уменьшение и безболезненность шейных и подчелюстных лимфатических узлов и нормализация температуры тела. У нескольких человек (36,7 %) было отмечено улучшение, которое проявилось в аналогичных, но не столь явных изменениях перечисленных объективных и субъективных показателей.

Оценивая локальный профиль цитокинов на фоне лечения иммуностимулирующим препаратом, установлено, что снижение содержания IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10 и TGF- β_1 происходило у всех пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с ВЭБ-инфекцией. Важным является снижение IL-4 после лечения у пациентов 1-й группы, что подтверждается сопряженностью признаков ($\chi^2 = 4,033, p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены особенности локального иммунитета при хроническом тонзиллите, ассоциированном с ВЭБ-инфекцией. Они характеризуются увеличением IL-10 в разгаре болезни и увеличением IL-1 β , IL-6 и IL-4 на 7-е сутки исследования в слюне у пациентов с ВЭБ-инфекцией ($p < 0,05$).

Длительное сохранение высокого уровня IL-17 при хроническом тонзиллите в исследованных группах иллюстрирует персистенцию воспаления.

Консервативное лечение пациентов с хроническим тонзиллитом, ассоциированным с ВЭБ-

инфекцией реаферон-ЕС-липидом обеспечивало ускорение нормализации локального цитокинового профиля и клинически эффективно в 63,3 % случаев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Завгородняя Е.Г. Цитокины и их место в диагностике и лечении ряда заболеваний ЛОР-органов // Вестник оториноларингологии. — 2008. — № 3. — С. 74–76.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2008. — 552 с.
3. Машкова Т.А., Желтова А.Н., Белобородова Л.Л. уточняющая диагностика степени декомпенсации хронического тонзиллита // Вестник оториноларингологии. — 2010. — № 5. — С. 35–37.
4. Морозова С.В. Оценка эффективности местной иммунотерапии в лечении хронического тонзиллита // Российская оториноларингология. — 2010. — № 6 (49). — С. 113–115.
5. Филатова С.В., Симонова А.В., Артемьев М.Е., Голубева Н.М. иммунный статус больных хроническим тонзиллитом до и после тонзилэктомии // Вестник оториноларингологии. — 2002. — № 1. — С. 18–21.
6. Balandraud N., Roudier J., Roudier C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis // Autoimmun. Rev. — 2004. — Vol. 3. — P. 362–367.
7. Brook I. The role of beta-lactamase-producing bacteria in mixed infection // BMC Infect. Dis. — 2009. — Vol. 9. — P. 202.
8. Perry M., Whyte A. Immunology of the tonsils // Immunology Today. — 1998. — Vol. 9. — P. 414–421.

Сведения об авторах

Красницкая Александра Сергеевна – очный аспирант кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО ВГМУ Минздрава России (690012, г. Владивосток, ул. Калинина, 57–128; тел.: 89084480584; e-mail: mi-mi-85@mail.ru)
Шитихина Алена Сергеевна – студентка 305-й группы лечебного факультета ГБОУ ВПО ВГМУ Минздрава России (690066, г. Владивосток, ул. Шилкинская, 11–356; тел.: 89644538454; e-mail: shish92@mail.ru)

О.Ю. Леплина¹, Л.В. Сахно¹, А.А. Останин¹, С.С. Богачев², Е.Р. Черных¹КОРРЕКЦИЯ IN VITRO ДИСФУНКЦИЙ ИНТЕРФЕРОН- α -ИНДУЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИМИ СОСТОЯНИЯМИ¹ НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)² Институт цитологии и генетики СО РАМН (Новосибирск)

В работе проведен анализ коррекции нарушенных функций дендритных клеток (ДК) у больных злокачественными опухолями головного мозга ($n = 8$), злокачественными лимфомами ($n = 14$), и туберкулезом легких ($n = 26$), генерируемых *in vitro* в присутствии интерферона-альфа. Показана принципиальная возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК интерлейкином-2, комплексом провоспалительных цитокинов, двуцепочечной ДНК человека и полиоксидонием, добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значительно повысить аллостимуляторную активность ДК у больных со злокачественными лимфомами и туберкулезом легких, а также усилить цитотоксическую активность ДК против NK- и TRAIL-резистентной линии HEP-2 у больных онкологическими заболеваниями, что открывают новые подходы к коррекции нарушений ДК при патологии и обосновывают пути повышения эффективности лечения инфекционных и онкологических заболеваний с использованием вакцин на основе дендритных клеток.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон-альфа, коррекция, цитотоксичность, аллостимуляторная активность

CORRECTION OF INTERFERON- α -INDUCED DENDRITIC CELL DYSFUNCTIONS IN IMMUNOCOMPROMISED PATIENTSO.Yu. Leplina¹, L.V. Sakhno¹, A.A. Ostanin¹, S.S. Bogachev², E.R. Chernykh¹¹ Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk² Institute of cytology and genetics SB RAMS, Novosibirsk

The correction of impaired functions of *in vitro* generated interferon-alpha-induced dendritic cells (IFN-DCs) in patients with malignant brain tumors ($n = 8$), malignant lymphomas ($n = 14$) and pulmonary tuberculosis ($n = 26$) was analyzed in the present study. The principal possibility of restoring reduced functional activity of patient DCs was shown. The addition of recombinant human IL-2, complex of pro-inflammatory cytokines, double-stranded human DNA or polyoxidonium to IFN-DC cultures at the stage of maturation could significantly increase the allostimulatory activity of DCs in patients with malignant lymphomas and pulmonary tuberculosis, as well as enhance the cytotoxic activity of cancer patient DCs against NK- and TRAIL-resistant tumor cell line HEP-2. These findings offer new approaches to the correction of DC dysfunctions in the pathology and justify ways of improving the treatment of infectious diseases and cancer using dendritic cell vaccines.

Key words: dendritic cells, interferon-alpha, correction, cytotoxicity, allostimulatory activity

Дендритные клетки (ДК) являются наиболее эффективными антигенпрезентирующими клетками и играют важную роль в инициации и поддержании специфического иммунного ответа. Опухолевый процесс и хронические инфекционные заболевания сопровождаются существенными количественными и функциональными изменениями ДК, что рассматривается одним из основных механизмов персистенции инфекции и ускользания опухоли от иммунного надзора [6, 10, 11]. Традиционно, ДК генерируют из моноцитов периферической крови в присутствии гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина-4 (IL-4) [9]. Однако данный тип ДК характеризуется относительно низкой миграционной активностью и в условиях дефицита ростовых факторов может трансформироваться в клетки с фенотипом моноцитов [6]. Генерация ДК при замене IL-4 интерфероном- α представляется более физиологичной, поскольку IFN- α является ранним медиатором врожденного иммунитета [8]. Генерируемые в присутствии

IFN- α ДК обладают более высокой миграционной активностью, способностью стимулировать как Th1-, так и Th2-ответ и эффективно стимулировать CD8⁺T-клетки [5, 8]. Ранее нами было показано, что у онкологических больных генерируемые таким образом дендритные клетки характеризуются увеличением доли незрелых и снижением числа зрелых форм ДК, снижением аллостимуляторной активности, ослаблением Th1 и возрастанием Th2-стимуляторной активности; а также уменьшением их цитотоксического потенциала [1, 2]. А ДК больных хроническими инфекционными заболеваниями (хронические вирусные гепатиты, туберкулез легких) характеризуются признаками задержки дифференцировки/созревания, смещением баланса в сторону продукции Th2-цитокинов и усилением Th2-стимуляторной активности, что указывает на снижение способности ДК активировать реакции клеточного иммунитета при данных патологиях [3, 4]. Таким образом, обнаруженные нами изменения свойств ДК при онкопатологии и инфекционных заболеваниях ставят вопрос о

полноценности генерируемых дендритных клеток и разработке подходов к коррекции нарушений функций ДК у данной категории больных с целью возможности дальнейшего использования вакцин на основе аутологичных дендритных клеток для лечения указанных патологий. Поэтому целью данной работы явилось изучение возможности коррекции нарушенных функций ДК у больных онкологическими и инфекционными заболеваниями с помощью различных иммуноактивных факторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли центрифугированием цельной, гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина ($p = 1,078$, фикола-Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Швеция; верографин-Spofa, ЧССР). Дендритные клетки генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК. Для этого МНК в концентрации 3×10^6 /мл помещали в 6-луночные планшеты для культивирования (ТТР, Швейцария) на 2 ч в 3 мл среды RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% сыворотки АВ (IV) группы. Затем неприлипшую фракцию удаляли, а оставшиеся клетки инкубировали в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл), INF- α (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) и 5% сыворотки плодов коровы (Биолот, Санкт-Петербург) в течение 3 сут. при 37° в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂. На последующие 24 ч в качестве дозревающего стимула вносился LPS (*E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл). В отдельных экспериментах проводилась 24-часовая обработка ДК (на этапе конечного созревания в присутствии LPS) иммуноактивными препаратами: рекомбинантным интерлейкином-2 человека («Ронколейкин») — 100 ЕД/мл, сополимером N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазина бромид («Полиоксидоний») — 5 мкг/мл, комплексом провоспалительных цитокинов («Суперлимф») — 20 нг/мл и двуцепочечной ДНК человека («Панаген») — 5 мкг/мл. После чего проводилось харвестирование и подсчет ДК.

Алlostимуляторную активность ДК оценивали в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовались МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований (Медполимер, Санкт-Петербург) в среде RPMI-1640 с 10% инактивированной сыворотки доноров АВ (IV) группы при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Стимуляторами служили дендритные клетки в соотношении МНК : ДК = 10 : 1. Пролиферативный ответ оценивался на 5 сут радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Для оценки цитотоксической активности ДК проводился МТТ-тест, заключающийся в способности живых клеток превращать растворимый

желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза. Опухолевые клетки линии НЕР-2 (5×10^4 /лунку) культивировали с LPS-активированными ИФН-ДК в 96-луночных плоскодонных планшетах в течение 24 часов в соотношении эффекторов/мишеней 1:1. После окончания совместной инкубации в лунки вносили по 20 мкл 5 мг/мл раствора МТТ (Диа М, Германия), а затем через 3 часа планшеты центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 минут, удаляли супернатант и добавляли по 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксид, МР Boimedicals, LLC, Франция). Через 30 минут после полного растворения кристаллов формазана измерялась оптическая плотность содержимого лунок на мультискане при длине волны 492 нм. Расчет цитотоксической активности проводился по стандартной формуле: (%) = $[1 - (ОП_э + м - ОП_м) / ОП_м] \times 100$ %, где ОП_э + м — значение оптической плотности в опытных сериях; ОП_э — значение оптической плотности в лунках с эффекторами; ОП_м — значение оптической плотности в лунках с мишенями.

Математическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «STATISTICA 6.0». Таблицы и рисунки содержат информацию в виде средних арифметических величин (М) и стандартных ошибок средних (SE). Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из интегральных показателей функциональной активности ДК является их способность к стимуляции пролиферативного ответа аллогенных Т-лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов, поскольку алlostимуляторная активность ДК ассоциирована со степенью зрелости ДК, спектром и уровнем продуцируемых ими цитокинов, а также способностью ДК активировать Th1/Th2 ответ и индуцировать генерацию Трег. Действительно наиболее выраженное снижение алlostимуляторной активности ДК, выявляемое у больных туберкулезом легких (ТБ) и пациентов злокачественной лимфомой (ЗЛ), ассоциировалось с признаками задержки созревания/активации ДК, повышенной продукцией IL-10 в культурах ДК и смещением стимуляторной активности ДК сторону активации Th-2 ответа [4]. Соответственно, оценка алlostимуляторной активности может представлять удобный скрининговый маркер для выявления дисфункций ДК и оценки иммунокорригирующего эффекта различных факторов. Поэтому для изучения возможности коррекции функциональной активности ДК было проанализировано влияние различных иммуноактивных факторов на алlostимуляторную активность ДК, полученных от больных злокачественными лимфомами и туберкулезом

легких. В качестве потенциальных модуляторов были выбраны рекомбинантный интерлейкин-2 человека («Ронколейкин»), сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиний бромид («Полиоксидоний»), комплекс провоспалительных цитокинов («Суперлимф») и двуцепочечная ДНК человека («Панаген»).

Исследования в группе 14 пациентов со злокачественными лимфомами (8 мужчин и 6 женщин в возрасте от 14 до 67 лет) показали, что 24-часовая обработка ДК (на этапе конечного созревания в присутствии LPS) анализируемыми иммуноактивными факторами сопровождалась статистически значимым усилением их аллостимуляторной активности в СКЛ (табл. 1). При этом наиболее выраженным стимулирующим эффектом характеризовался рИЛ-2 (в дозе 100 Ед/мл). Другие факторы (полиоксидоний, комплекс провоспалительных цитокинов, ДНК человека проявляли менее выраженный, но статистически достоверный стимулирующий эффект на восстановление аллостимуляторной активности.

Исследование влияния анализируемых иммуноактивных факторов на аллостимуляторную активность ДК больных туберкулезом показало (табл. 1), что рИЛ-2 (в дозе 100 Ед/мл) и Полиоксидоний (в дозе 5 мкг/мл) достоверно усиливали аллостимуляторную активность ДК больных туберкулезом легких при добавлении их в культуру совместно с дозревающим стимулом. В то же время ДНК человека не обладала стимулирующим эффектом на аллостимуляторную активность. В отдельной серии экспериментов было также проведено сравнительное исследования аллостимуляторной активности интактных, LPS-предобработанных и ДНК-активированных ДК, полученных от 14 больных ТБ. Добавление двуцепочечной геномной ДНК человека в качестве дозревающего стимула в культуры ДК на этапе созревания вместо LPS приводило к достоверному возрастанию аллостимуляторной активности ДК с 1492 ± 281 до 5100 ± 1686 имп./мин. При этом $ИВ_{ДНК}$ был сравним с $ИВ_{LPS}$ ($41,6 \pm 15,3$ и $41,0 \pm 10,9$ соответственно).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что у больных со сниженной аллостимуляторной активностью дендритных клеток (пациенты злокачественной лимфомой, ТБ) добавление интерлейкина-2, полиоксидония, комплекса цитокинов с провоспалительной активностью или нативной ДНК человека обладает стимулирующим эффектом и усиливает аллостимуляторную активность ДК в СКЛ. При этом ДК больных злокачественными лимфомами и ТБ различались по чувствительности к стимулирующему влиянию анализируемых иммуноактивных препаратов. Так, ДК больных ТБ отличались меньшей чувствительностью к ДНК человека и рИЛ-2. Индекс влияния рИЛ-2 у больных ТБ был достоверно двукратно ниже такового показателя у больных ЗЛ ($2,8 \pm 0,5$ против $4,6 \pm 0,5$).

Наряду с аллостимуляторной активностью важным свойством ДК, особенно в аспекте их использования в качестве противоопухолевых вакцин является прямая противоопухолевая цитотоксическая активность. Выявление дефектности указанной функции у больных с глиомами головного мозга высокой степени злокачественности и пациентов злокачественными лимфомами [7] побудило исследовать возможность стимуляции цитотоксической активности ДК *in vitro* с помощью иммуноактивных факторов. Для этого был проведен анализ влияния рекомбинантного интерлейкина-2, полиоксидония и двуцепочечной ДНК человека на цитотоксическую активность ДК больных злокачественными опухолями головного мозга (ЗОГМ) и ЗЛ. Цитотоксическую активность ДК оценивали против клеток опухолевых линий Нер-2 и Jurkat в МТТ-тесте. Для этого клетки опухолевых линий Нер-2 (клетки эпителиальной карциномы гортани человека) и Jurkat (Т-клеточная лимфома), культивировали с интактными ДК или ДК, предобработанными иммуноактивными факторами на этапе их созревания. Обработка ДК больных ЗОГМ интерлейкином-2, двуцепочечной геномной ДНК человека и полиоксидонием усиливала исходно низкий уровень цитотоксической активности ДК против клеток Нер-2 практически у всех больных. Сравнение средних показателей

Таблица 1
Влияние иммуноактивных факторов на аллостимуляторную активность пациентов злокачественной лимфомой и туберкулезом легких

	Пролиферативная активность в СКЛ (имп/мин)	
	ЗЛ (n = 14)	Туберкулез легких (n = 26)
МНК + ДК(0)	3178 ± 325	5331 ± 638
МНК + ДК (+) рИЛ-2, 100 ЕД/мл	12211 ± 977*	10562 ± 2491*
МНК + ДК (+) полиоксидоний, 5 мкг/мл	5771 ± 472	6281 ± 798*
МНК + ДК (+) суперлимф., 20 нг/мл	5014 ± 361*	—
МНК + ДК (+) панаген, 5 мкг/мл	7433,3 ± 357,4*	5861,5 ± 948,4

Примечание: представлены $M \pm SE$ значения пролиферативной активности в алло-СКЛ; стимуляторы-интактные ДК(0) и предобработанные ДК(+) в соотношении 10 : 1, * – $p_0 < 0,05$ – достоверность различий показателей по отношению к культурам ДК (0), U – критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

Таблица 2

Влияние иммуноактивных факторов на цитотоксическую активность ДК больных ЗОГМ (Grade IV) и злокачественной лимфомой

	Цитотоксичность (%)			
	Линия Нер-2		Линия Jurkat	
	Больные ЗОГМ (n = 8)	Больные ЗЛ (n = 7)	Больные ЗОГМ (n = 8)	Больные ЗЛ (n = 7)
ДК (0)	8 ± 2,5	10 ± 4,4	50 ± 6,5	29 ± 8,4
ДК (+р-ИЛ-2, 100 Ед/мл)	27 ± 4,7*	36 ± 5,3*	61 ± 4,1*	30 ± 4,8
ДК (+ панаген, 5 мкг/мл)	16 ± 2,9*	34 ± 4,9*	56 ± 4,5	31 ± 3,9
ДК (+ полиоксидоний, 2 нг/мл)	20 ± 4,3*	21 ± 2,8*	50 ± 9,2	30 ± 3,3

Примечание: представлены $M \pm SE$ цитотоксической активности ДК (%) больных в присутствии иммуноактивных факторов в МТТ-тесте. * – $p_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с ДК (0), U – критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

цитотоксичности интактных и модифицированных ДК и индексы влияния анализируемых иммуноактивных факторов на цитотоксическую активность ДК больных ЗОГМ показало (табл. 2), что наиболее выраженным стимулирующим эффектом обладали интерлейкин-2 и полиоксидоний, тогда как панаген достоверно, но в меньшей степени восстанавливал цитотоксическую активность ДК ЗОГМ.

Наряду с выраженным стимулирующим эффектом интерлейкина-2, ДНК и полиоксидония на низкую цитотоксическую активность ДК больных ЗОГМ против клеток Нер-2, сохранная цитотоксическая активность ДК против линии Jurkat умеренно возрастала только после обработки ДК интерлейкином-2 и не менялась при обработке ДК двуцепочечной ДНК и полиоксидонием.

Аналогичные эффекты регистрировались при анализе влияния интерлейкина-2, двуцепочечной ДНК человека и полиоксидония на цитотоксическую активность ДК больных ЗЛ (табл. 2) Все анализируемые иммуноактивные факторы достоверно усиливали исходно низкую цитотоксическую активность ДК больных ЗЛ против клеток Нер-2 и не влияли на исходно сохранную цитотоксическую активность ДК против клеток линии Jurkat.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные демонстрируют принципиальную возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК с помощью стимуляции ДК на этапе созревания интерлейкином-2 или комплексом провоспалительных цитокинов, двуцепочечной ДНК человека или полиоксидонием, добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значительно повысить аллостимуляторную активность ДК у больных со злокачественными лимфомами и туберкулезом легких, а также усилить цитотоксическую активность ДК против NK- и TRAIL-резистентной линии Нер-2 у больных онкологическими заболеваниями (злокачественными опухолями головного мозга и злокачественными лимфомами). Проведенные исследования откры-

вают новые подходы к коррекции нарушений ДК при патологии и обосновывают пути повышения эффективности клеточных технологий лечения инфекционных и онкологических заболеваний с использованием аутологичных дендритноклеточных вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леплина О.Ю., Насонова Г.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В. и др. Характеристика IFN α -индуцированных дендритных клеток у больных злокачественными лимфомами // Гематология и трансфузиология. – 2008. – № 3. – С. 24 – 29.
2. Леплина О.Ю., Насонова Г.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В. и др. «IFN α -индуцированные дендритные клетки у больных множественной миеломой» // Сибир. онколог. журн. – 2009. – № 6. – С. 37 – 43.
3. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Борисова А.Е., Старостина Н.М. и др. Фенотип и функции дендритных клеток у больных хроническими вирусными гепатитами // Мед. иммунология. – 2009. – Т. 2/3. – С. 191 – 196.
4. Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Распай Ж.М. и др. Характеристика дендритных клеток, генерируемых в присутствии интерферона- α у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза. – 2007. – № 3. – С. 42 – 46.
5. Carbonneil C., Aouba A., Burgard M. Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF and Interferon-alpha are potent inducers of HIV-specific CD8 + T-cells // AIDS. – 2003. – Vol. 17. – P. 1731 – 1740.
6. Della Bella S., Nicola S., Brambilla L. Quantitative and functional defects of dendritic cells in classic Kaposi's sarcoma // Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 119. – P. 317 – 329.
7. Lepina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Ya. et al. Direct antitumor activity of interferon-induced dendritic cells of healthy donors and patients with primary brain tumors / In: Glioma – exploring it's biology and practical relevance; ed. by. A. Ghosh. – 2011. – P. 325 – 342.
8. Santini S., Lapenta C., Belardelli F. Type I interferons as regulators of the differentiation/activation

of human dendritic cells: methods for the evaluation of IFN-induced effects // Meth. Mol Med. — 2005. — Vol. 116. — P. 167—181.

9. Thurner B., Roder C., Dieckmann D. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical applications // J. Immunol. Meth. — 1999. — Vol. 223. — P. 1—15.

10. Van der Molen R.G., Sprengers D., Binda R.S. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B // Hepatology. — 2004. — Vol. 40. — P. 738—746.

11. Zhang Z.J., Fu Q., Zhao Y. Differential restoration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected children after treatment with highly active antiretroviral therapy // J. Immunol. — 2006. — Vol. 176. — P. 5644—5651.

Сведения об авторах

Леплина Ольга Юрьевна — старший научный сотрудник ФГБУ НИКИ СО РАМН, доктор медицинских наук (630005, г. Новосибирск, ул. Некрасова, д. 55, кв. 61: тел.: 383 228-21-01; e-mail: oleplina@mail.ru)

Сахно Людмила Васильевна — старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБУ НИКИ СО РАМН, кандидат медицинских наук

Останин Александр Анатольевич — ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБУ НИКИ СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Черных Елена Рэмовна — заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Заместитель директора НИИКИ СО РАМН, чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)

Л.П. Малежик, М.С. Малежик, Ю.И. Пинелис

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОМ ПАРОДОНТИТЕ У ПОЖИЛЫХ ЛЮДЕЙ, СТРАДАЮЩИХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Читинская государственная медицинская академия (Чита)

Хронический генерализованный пародонтит средней степени тяжести у пожилых людей, страдающих ишемической болезнью сердца, сопровождается дисбалансом в содержании отдельных компонентов комплемента, гиперпродукцией s.IgA, IgA, IgG, IgM, увеличением концентрации ИЛ-8, ИЛ-1α и уменьшением ИЛ-4, нарастанием антител к белкам теплового шока HSP-70 в крови и слюне. Проведенная противовоспалительная терапия пародонтита и ишемических проявлений в сердечнососудистой системе существенных изменений в иммунном статусе больных не вызывает. Полученные данные являются патогенетическим обоснованием включения в общепринятую терапию пародонтита иммунокорректирующих средств.

Ключевые слова: пародонтит, интерлейкины, иммуноглобулины, комплемент

THE STATE OF IMMUNE SYSTEM IN OLD-AGED PATIENTS WITH CHRONIC GENERALIZED PERIODONTITIS AND CORONARY HEART DISEASE

L.P. Malezhic, M.C. Malezhic, Y.I. Pinelis

State Medical Academy, Chita

Chronic generalized periodontitis in the old-aged patients with coronary heart disease is accompanied by an imbalance in the content of some components of complement, hyperproduction s.IgA, IgA, IgG, IgM, elevated concentration of IL-8, IL-1α and low content of IL-4, high levels of the antibodies to HSP-70 in saliva and blood. Local anti-inflammatory therapy of chronic periodontitis does not restore normal immunity status. These data are pathogenic substantiation of the including immunocorrective therapies in to conventional treatment at periodontitis.

Key words: periodontitis, interleukins, immunoglobulins, complement

Воспаление пародонта становится хроническим при низкой противомикробной защите полости рта [1, 6]. Иммунные реакции в такой ситуации не обеспечивают противостояние инфицированного пародонта и становятся патогенетической основой хронического процесса [5]. Данные литературы об иммунной реактивности при заболеваниях пародонта крайне разноречивы, что отмечают многие отечественные и зарубежные исследователи [2, 3]. Это может объясняться тем, что иммунная реактивность у больных пародонтитом вариабельна: она зависит от степени тяжести, фазы заболевания, типа воспалительной реакции, генетической предрасположенности и возраста [4, 8, 9].

Нас интересовало состояние местного и общего иммунитета у пожилых людей, страдающих хроническим генерализованным пародонтитом и ишемической болезнью сердца. При таком состоянии течение пародонтита отягощено инволютивными процессами и атеросклерозом. Как осуществляются иммунные реакции при сочетании воспаления, возрастной деструкции тканей и атеросклерозе неизвестно.

Цель исследования: изучить состояние системы комплемента, содержание иммуноглобулинов (s.IgA, IgA, IgG, IgM), цитокинов (ИЛ-1α, ИЛ-8, ИЛ-4), антител к белкам теплового шока HSP-70 в ротовой жидкости и крови у пожилых людей, страдающих хроническим генерализованным пародонтитом и ишемической болезнью сердца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Обследовано 96 больных от 60 до 74 лет (пожилые люди по классификации ВОЗ), страдающих хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести, поступивших в госпиталь ветеранов войны и труда по поводу клинических проявлений ишемической болезни сердца (ИБС) с диагнозом: стабильная стенокардия напряжения I–II функционального класса, ХСН IIa стадии, гипертоническая болезнь I–II стадии.

Все пациенты получали общую терапию, соответствующую клиническим проявлениям ИБС и местную противовоспалительную, которая включала удаление зубных отложений, кюретаж пародонтальных карманов, антисептическую обработку тканей пародонта в течение 10 дней.

Лабораторному анализу подлежали кровь и ротовая жидкость (смешанная слюна). Забор этих сред осуществляли утром натощак в первые дни поступления в стационар и после проведенного местного и общего лечения. В крови и слюне определяли общую гемолитическую активность системы комплемента — КПК, концентрацию

С-ингибитора, С3а, С5а фрагментов системы комплемента методом ИФА набором реагентов ООО «Цитокин» г. С.-Петербурга; содержание иммуноглобулинов (s. IgA, IgA, IgG, IgM), интерлейкинов (IL-8, IL-1α, IL-4) методом ИФА, используя набор реагентов ТОО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск); содержание антител к белкам теплового шока иммуноферментным анализом согласно описанию фирмы «Assay Designs» USA, Michigan.

В качестве контроля использовали кровь и ротовую жидкость 25 больных в возрасте 60–74 года, страдающих ИБС, но без признаков воспаления в полости рта.

Статистическая обработка проводилась при помощи пакета статистических программ Statistica 6,0 (Stat Soft). При нормальном распределении рядов различия между группами выявлялись при помощи критерия Стьюдента. В случае ненормального распределения вариационного ряда использовался t-критерий Манна – Уитни с поправкой Йейтса на непрерывность. Достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунная защита в полости рта представлена функциональной активностью элементов врожденного и приобретенного иммунитета. Врожденный иммунитет связан с фагоцитозом и цитолитической системы комплемента.

Мы выяснили на сколько изменяется уровень комплементарной активности при сочетании общего атеросклероза и местно протекающего хронического воспаления пародонта. В результате проведенных исследований установлена дисфункция в компонентах комплемента (табл. 1). Общая гемолитическая активность (КПК) снижена в крови и слюне. Содержание С1 ингибитора уменьшено в слюне на 57,3 %, в крови на 26 %. Однако концентрация С3а увеличивается и в слюне и в крови. Содержание С5а в крови больных не отличается от нормы, а в слюне снижено на 33 %. Отмеченный функциональный дисбаланс в содержании фрагментов комплемента формирует неполноценность врожденного иммунитета в полости рта у больных ХГП и снижает противоинфекционную защиту.

В патогенезе воспалительного процесса в полости рта большую роль играет не только неспецифическая защита, но и специфическая, связанная с функцией адаптивного иммунитета (табл. 2).

В результате проведенных исследований установлено, что в слюне увеличена концентрация s. IgA, IgA, IgG, IgM, повышен уровень IL-8, IL-1 и снижено содержание IL-4.

В крови у пожилых людей при хроническом генерализованном пародонтите (ХГП) увеличена концентрация всех исследуемых иммуноглобулинов и интерлейкинов, особенно IL-1α (табл. 3).

Анализируя собственные результаты и учитывая данные литературы, мы пришли к выводу, что

Таблица 1
Содержание компонентов системы комплемента в крови и слюне у пожилых людей при хроническом генерализованном пародонтите ($M \pm SD$)

Показатели	В сыворотке крови			В слюне		
	Контроль (n = 10)	до лечения (n = 20)	после лечения (n = 20)	Контроль n = 10	до лечения (n = 20)	после лечения (n = 20)
КПК, у.е.	88,9 ± 2,72	80,7 ± 7,67*	84,1 ± 9,02	5,86 ± 1,46	3,33 ± 0,24*	6,81 ± 2,18^
С1-ингибитор, мкг/мл	534,88 ± 30,13	394,63 ± 65,37*	460,9 ± 67,29*^	32,7 ± 2,93	14,00 ± 3,12*	46,8 ± 9,61^
С3а, нг/мл	408,2 ± 28,42	643,2 ± 35,11*	588,6 ± 60,12 *	39,4 ± 11,7	62,9 ± 10,14*	65,8 ± 10,41*
С5а, нг/мл	4,9 ± 0,67	4,7 ± 0,67	5,01 ± 0,92	5,9 ± 2,5	3,37 ± 2,61*	8,02 ± 3,42^

Примечание: * – статистическая значимость различий с контролем. ^ – статистическая значимость различий в показателях до и после лечения.

Таблица 2
Содержание иммуноглобулинов и интерлейкинов в слюне у пожилых людей при хроническом генерализованном пародонтите (Me, (25–75-й процентиля))

Показатели	Контроль	До лечения	После лечения
IgG, г/л	0,17 (0,13; 0,22)	0,36* (0,15; 0,45)	0,38* (0,27; 0,42)
IgM, г/л	0,02 (0,01; 0,03)	0,08* (0,05; 0,09)	0,03^ (0,02; 0,04)
IgA, г/л	0,04 (0,03; 0,06)	0,1* (0,05; 0,15)	0,03^ (0,02; 0,06)
sIgA, г/л	207,5 (195,3; 220)	308,5* (293,9; 323,1)	323,86* (312,8; 334,8)
IL-1α, пкг/мл	8,9 (6,65; 9,58)	19,08* (18,9; 19,2)	6,3^ (4,4; 8,2)
IL-8, пкг/мл	20,45 (20,25; 21,4)	234,5* (113,4; 284)	116,8*^ (90,35; 143,03)
IL-4, пкг/мл	15,32 (12,12; 18,52)	8,44* (6,03; 8,53)	8,05* (5,43; 10,67)

Примечания: * – статистическая значимость отличий от контрольной группы, ^ – статистическая значимость различий в группах больных до и после лечения.

Таблица 3

Содержание иммуноглобулинов и интерлейкинов в крови у пожилых людей при хроническом генерализованном пародонтите (Ме, (25–75-й процентиля))

Показатели	Контроль	До лечения	После лечения
IgG, г/л	12,3 (12,20; 12,60)	15,20* (13,00; 20,30)	13,50 (12,0; 16,65)
IgM, г/л	1,49 (1,05; 2,12)	1,65* (1,13; 2,78)	1,2^ (0,83; 1,6)
IgA, г/л	1,87 (1,6; 2,13)	2,80* (2,29; 3,2)	3,07 (2,4; 3,45)
sIgA, г/л	3,14 (2,49; 3,54)	4,64* (3,5; 7,35)	9,32*^ (6,45; 11,69)
IL-1α, пкг/мл	27,5 (24,0; 29,5)	140* (108,5; 152,0)	58,5*^ (51,5; 67,0)
IL-8, пкг/мл	17 (15,25; 18,00)	34,06* (16,54; 42,8)	24,00*^ (13,75; 29,98)
IL-4, пкг/мл	15 (12,75; 17,25)	29,6* (27,8; 31,0)	49,0*^ (36,0; 73,0)

Примечания: * – статистическая значимость различий от контрольной группы, ^ – статистическая значимость различий в группах больных до и после лечения.

при ХГП средней степени тяжести у людей пожилого возраста на фоне ИБС наблюдается системная поликлональная активация В-лимфоцитов. Причиной тому может быть бактериальная эндотоксемия и наличие аутоиммунных процессов.

Аутоиммунные реакции играют немаловажную роль в любом воспалении и деструктивных процессах при атеросклерозе. Не анализируя возможные источники антигенного материала при хроническом пародонтите и ишемической болезни сердца, мы остановимся лишь на одном — белках теплового шока.

Эти белки являются патогенетическим звеном любого заболевания. Они синтезируются клетками как элементы стресс-лимитирующей системы и являются цитопротекторами. Их биологическая роль связана с коррекцией вновь синтезированных белков и деструкцией аномальных полипептидов.

При увеличении функциональной нагрузки, воспалении, стрессе белки теплового шока (БТШ) выделяются в окружающую среду и запускают иммунные реакции, направленные на выработку антител к ним. Анти-Нсп узнаются эпитопами соответствующих белков, которые служат аутоиммунными мишенями на поверхности клеток. Образуются иммунные комплексы, вызывающие комплементзависимую и антителозависимую цитотоксичность по отношению к клеткам, продуцирующим БТШ. Такими клетками являются микроорганизмы, выделяющие шапероны при нарушении биоценоза полости рта и клетки сомы, участвующие в воспалении [5].

Наши исследования показали, что антител к Нсп-70 в слюне здоровых людей очень мало ($66,6 \pm 6,86$ нг/мл). В крови концентрация антител динамична и в среднем составляет $164,14 \pm 11,4$ нг/мл. Среди обследуемых в группе здоровых встречаются люди с высоким титром антител, возможно из-за скрытой органной патологии.

При обострении ХГП концентрация антител к исследуемому стресс-белку увеличивается и в слюне ($204,08 \pm 16,3$ нг/мл) и в крови ($290,86 \pm 12,2$ нг/мл), что свидетельствует об усиленном его выделении клетками, принимающими

участие в воспалении. В полости рта это могут быть микроорганизмы, лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы и клетки пародонта, поврежденные длительным воспалительным процессом. Выработанные антитела к БТШ садятся не только на патоген, вызвавший воспаление в пародонте, но и на любые соматические клетки, экспрессирующие на поверхность мембраны белки, похожие по структуре на БТШ патогена (молекулярная мимикрия). За счет перекрестной реакции развивается аутоиммунный процесс с органной недостаточностью. Возможно поэтому, хронический пародонтит не является локальной патологией. Он всегда имеет сопутствующие заболевания и чаще со стороны сердечнососудистой системы [7].

После проведенной местной противовоспалительной терапии и сопутствующих проявлений сердечнососудистой патологии ишемического характера полной нормализации иммунологического статуса не происходит. В слюне увеличивается комплементарная активность, концентрация С1 ингибитора и С5а фрагмента комплемента. В крови нарастает содержание С1 ингибитора (табл.1), s. IgA и уменьшается уровень IgM (табл. 3). Одновременно в слюне снижается содержание IgM и IgA, тогда как концентрация IgA и IgG не меняется. Уровень антител к HSP-70 после терапии несколько уменьшается в слюне и крови, но не достигает референтных значений, что свидетельствует о сохранившейся причине их синтеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования системы иммунитета при хроническом генерализованном пародонтите свидетельствуют о том, что патогенетической особенностью течения хронического воспаления пародонта у пожилых людей является несостоятельность врожденного иммунитета, связанная с дисфункцией компонентов системы комплемента, поликлональная активация адаптивного иммунитета с высоким уровнем иммуноглобулинов, провоспалительных цитокинов и увеличением содержания антител к белкам теплового шока (Hsp-70).

Установленная несостоятельность традиционной терапии хронического генерализованного пародонтита у пожилых людей в восстановлении иммунологической защиты обосновывает введение в комплекс поддерживающей терапии иммуномодуляторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешина Г.М., Кокряков В.Н. Лактоферрин и миелопероксидаза в клетках и биологических жидкостях организма при различных патологиях // Рос. иммунол. журн. — 2008. — Т. 2, № 2—3. — С. 147.
2. Гавжа С.И., Воронина А.И., Шкаредная О.В. Анализ клинко-иммунологического статуса полости рта у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степени тяжести при использовании антибактериальных средств // Стоматология. — 2010. — № 3. — С. 30—33.
3. Данилевский Н.Ф., Борисенко А.В. Заболевания пародонта. — Киев, 2000. — 464 с.
4. Кузник Б.И., Сизоненко В.А., Пинелис И.С. Пептидные биорегуляторы: применение в травма-

тологии, хирургии, стоматологии и онкологии. — М.: Вузов. книга, 2004. — 400 с.

5. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунология образаспознающих рецепторов (интегральная иммунология). — М., 2008. — 253 с.

6. Московский А.В., Шумский А.В. Клинико-иммунологические особенности осложненного кариеса в сочетании с пародонтитом // Рос. стоматол. журн. — 2007. — № 3. — С. 23—26.

7. Полтораки Н.В. Взаимосвязь степени воспаления в пародонте и некоторых клинко-функциональных и лабораторных показателей тяжести ишемической болезни сердца // Маэстро стоматологии. — 2009. — № 35. — С. 73—75.

8. Полфириади М.П., Сашкина Т.И., Маркина М.А. Роль вторичной иммунной недостаточности в возникновении гипергического воспаления в челюстно-лицевой области // Рос. стоматол. журн. — 2007. — № 3. — С. 35—37.

9. Соболева Л.А. Иммуноотропная терапия пародонтита у больных с хроническими вирусными и бактериальными инфекциями // Стоматология. — 2010. — Т. 89, № 3. — С. 20—22.

Сведения об авторах

Малежик Лидия Павловна — заведующая кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВБО Читинская государственная медицинская академия, доктор медицинских наук, профессор (672090, г. Чита, ул. Горького, 39а; тел.: 89245065027; e-mail: physiology@rambler.ru)

Малежик Маргарита Сергеевна — ассистент кафедры безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф ГБОУ ВБО Читинская государственная медицинская академия, кандидат медицинских наук (672012, г. Чита, ул. Курнатовского, 76, кв. 47; тел.: 89242714145; e-mail: rita.malezhik@mail.ru)

Пинелис Юрий Иосифович — доцент кафедры хирургической стоматологии ГБОУ ВБО Читинская государственная медицинская академия, кандидат медицинских наук, (672012, г. Чита, ул. Бутина, 93, кв. 29; тел.: 89144615908; e-mail: pinelism@mail.ru)

Л.Б. Маснавиева, И.В. Кудяева

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ АУТОАНТИТЕЛ И ЦИТОКИНОВ У ПОДРОСТКОВ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЦЕНТРОВ ПРИ СКРИНИНГОВОМ ОБСЛЕДОВАНИИ**Ангарский филиал ФБГУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (Ангарск)**

Обследованы 270 подростков, проживающих в промышленных центрах Восточной Сибири, не имеющих на момент обследования признаков острого воспаления. Отклонения от референтных уровней относительного содержания аутоантител к нативной ДНК встречались в 23,5 %, к β 2-гликопротеину I – в 47,0 %, к Fc-фрагменту IgG – в 31,3 % случаев. Выявлено, что гипериммунореактивность аутоантител к β 2-гликопротеину I сопровождается увеличением концентрации γ -интерферона. Флуктуации содержания интерлейкинов 2 и 10 и α -интерферона в зависимости от иммунореактивности находились в пределах референтных значений.

Ключевые слова: подростки, цитокины, аутоантитела

ASSESSMENTS OF AUTOANTIBODY AND CYTOKINE CONTENTS IN TEENAGERS OF INDUSTRIAL CENTERS SCREENING EXAMINATION

L.B. Masnaviyeva, I.V. Kudayeva

Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology – Angarsk Branch of «ESSC HE» SB RAMS (Angarsk)

270 teenagers without acute inflammation signs at the moment of the examination living in the industrial centers of Eastern Siberia have been examined. The declinations from the reference levels of the relative autoantibody content to native DNA were found to observe in 23.5 %, to β 2-glycoprotein I – in 47.0 %, to Ig G Fc-fragment – in 31.3 % of the cases. It was revealed that gyperimmunoresponsiveness of the autoantibodies to β 2- glycoprotein I may be followed by the increase in the concentration of γ -interferon. The fluctuations of the of interleukin 2 and 10 contents and α -interferon in the dependence on the immunoresponsiveness were found to be in the range of the reference values.

Key words: teenagers, cytokines, autoantibodies

По данным литературы, более чем в 45 регионах России высокие уровни загрязнения воздуха (5 ПДК и более). Наиболее неблагоприятная экологическая ситуация сложилась на территории Сибири. Многочисленными исследованиями установлена однозначная связь между ростом воздействия вредных факторов окружающей среды и частотой хронических заболеваний органов дыхания, печени, почек, аллергических процессов и др. [2, 6, 8]. Дети, проживающие в экологически неблагоприятных районах имеют склонность к частому рецидивированию заболеваний, вследствие повышенной восприимчивости к бактериальным и вирусным инфекциям из-за вторичного иммуносупрессивного состояния [8].

Известно, что цитокины вырабатываются клетками различных тканей и органов и являются и могут выступать в роли модуляторов процессов пролиферации, дифференцировки, апоптоза [1]. В организме здорового человека интенсивность апоптоза клеток невелика. Однако даже их незначительные количества должны быть удалены из организма человека. Роль своеобразных «мусорщиков», элиминирующих данные клетки, выступают ауто-антитела (ауто-АТ), распознавая их как «вредное» для организма. Уровень ауто-АТ каждой специфичности в сыворотке здоровых лиц относительно постоянен и поэтому его индивидуальная вариабельность незначительна. В то же время количественные изменения молекулярного

состава органов и структур тела, лежащие в основе развития заболеваний, отражаются в изменениях продукции определенных ауто-АТ задолго до его клинической манифестации [5]. Учитывая это, изучение изменений содержания ауто-АТ, отражающих состояние иммунной системы, является актуальной задачей современной медицины, решение которой направлено на сохранение здоровья населения, в том числе наиболее уязвимой категории – детей и подростков.

Целью работы явилось изучение содержания ауто-АТ, отражающих состояние иммунной системы, и цитокинов в крови подростков, проживающих в промышленных центрах Иркутской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проведено скрининговое обследование 270 подростков (14 – 16 лет) из общеобразовательных учебных заведений, проживающих в промышленных центрах Восточной Сибири. Обследование проводилось весной (до наступления периода цветения и сезонных вспышек острых респираторных вирусных инфекций) после подписания их родителями информированных соглашений.

Общее состояние иммунной системы оценивали по относительному содержанию ауто-АТ класса IgG (нДНК, Fc-фрагмент иммуноглобулинов IgG (ревмофактор) и бета2-гликопротеин I (β 2-ГП1) в сыворотке крови, которое изучали полуколичественным методом ИФА при помощи набора

«ЭЛИ-Висцеро-Тест-16» (детская панель) (МИЦ «Иммункулус», Москва). Для расчета относительного содержания ауто-АТ были использованы данные по сывороточной иммунореактивности (ИР) анализируемых проб и средней индивидуальной иммунореактивности (СИР) [4]. ИР вычисляли по формуле:

$$\text{ОП}_{(\text{ар})} \times 100 / \text{ОП}_{(\text{к})} - 100,$$

где $\text{ОП}_{(\text{ар})}$ — оптическая плотность реакции образца сыворотки крови с соответствующим антигеном; $\text{ОП}_{(\text{к})}$ — оптическая плотность реакции контрольной сыворотки с тем же антигеном. СИР рассчитана с использованием данных по 16 антигенам ЭЛИ-Висцеро-Теста и выражалась в %. Относительное содержание ауто-АТ является отклонением ИР от СИР и выражается в %.

Содержание цитокинов: интерлейкинов-2 и -10 (ИЛ-2, ИЛ-10) альфа- и гамма-интерферонов (α -ИНФ, γ -ИНФ) в сыворотке крови определяли методом ИФА соответствующими тест-наборами («Вектор-Бест», Новосибирск).

Основанием для деления подростков на группы послужила оценка сывороточной иммунореактивности ауто-АТ относительно референтных уровней (группа II — в пределах, группа III — выше и группа I — ниже референтных значений). Деление на группы осуществляли для каждого вида исследуемых ауто-АТ (нДНК, ревмофактор, β 2-ГП1). Сравнительный анализ содержания цитокинов проводили между группами I — III для ауто-АТ каждой специфичности.

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0». После анализа соответствия изучаемых показателей закону о нормальном распределении (тест Шапиро — Уилка) был использован непараметрический метод Краскелла-Уоллиса ANOVA; для попарного сравнения — U-критерий Манна — Уитни с применением поправки Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,017$. Корреляционную связь количественных признаков выявляли с помощью ранговой корреляции Спирмена. Результаты исследований представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что среди обследованных подростков значения относительного содержания ауто-АТ к нДНК ниже референтных уровней $[(-20) - (+10)]$ % отмечались в 18,9 ДИ $[6,2 - 31,6]$ %, а выше данного диапазона — в 17,8 ДИ $[4,9 - 30,6]$ % случаев. При анализе частоты встречаемости отклонений содержания ауто-АТ к β 2-ГП1 от референтных уровней установлено, что превышение данного показателя было в 60,0 ДИ $[51,9 - 68,1]$ %, а снижение — в 7,8 ДИ $[0,0 - 23,9]$ % случаев. Процент отклонений от референтных уровней содержания ауто-АТ к ревмофактору составил 10,0 ДИ $[0,0 - 24,9]$ % и 27,4 ДИ $[15,9 - 38,9]$ % данные лица

вошли в группы I и III соответственно (табл. 1). Следует отметить, что в выделенных нами группах I и III преобладали значения содержания ауто-АТ, входящие в пограничные диапазоны $[(-40) - (-20)]$ % и $[10 - 20]$ %. Процент лиц с иммунореактивностью ниже пограничной встречался в 1,1 — 4,4 % случаев. Обращает на себя внимание тот факт, что у 24,1 ДИ $[12,2 - 36,0]$ % подростков уровень ауто-АТ к β 2-ГП1 превышал пограничные значения.

Далее было проведено межгрупповое сравнение содержания цитокинов в сыворотке крови подростков в зависимости от иммунореактивности их организма.

Сравнение групп, различающихся по уровню ауто-АТ к нДНК, позволило выявить изменения в содержании α -ИНФ (табл. 2). Так в группе I значения данного показателя были статистически значимо ниже по сравнению со школьниками, имеющими нормальный уровень ауто-АТ к нДНК ($p = 0,008$).

При анализе уровней цитокинов в крови подростков по группам I и III, сформированным по относительному содержанию ауто-АТ к β 2-ГП1, установлено, что у школьников с повышенной иммунореактивностью концентрация γ -ИНФ выше, чем у подростков с нормальными уровнями данных ауто-АТ ($p = 0,007$). Различия в содержании интерферона между группами I и II, I и III выявлено не было ($p = 0,371$ и $p = 0,432$ соответственно). Однако, корреляционный анализ выявил наличие связи между уровнями ауто-АТ к β 2-ГП1 и γ -ИНФ ($r = 0,161$, $p = 0,020$). Следует отметить, тот факт, что среди обследованных подростков в 97 % случаев уровень γ -ИНФ находился в пределах референтных значений (0 — 15 пг/мл). При этом у всех лиц с высоким содержанием данного интерферона (3 % от обследованных) уровень ауто-АТ к β 2-ГП1 был выше референтных значений. Выявлена тенденция к снижению содержания ИЛ-10 у подростков с гипериммунореактивностью данных ауто-АТ как по сравнению с группой I, так и с группой II ($p = 0,034$ и $p = 0,043$ соответственно).

Выявлены статистически значимые различия в содержании α -ИНФ между группами с различным уровнем ауто-АТ к Fc-фрагменту. Так в группе подростков с повышенной иммунореактивностью ауто-АТ отмечено более низкое содержание α -ИНФ ($p = 0,005$). Несмотря на отсутствие статистически значимых различий между уровнем α -ИНФ группа I и II ($p = 0,764$), выявлена корреляционная связь между показателями ауто-АТ к Fc-фрагменту и α -ИНФ ($r = -0,149$, $p = 0,015$).

Известно, что локальные изменения интенсивности процессов апоптоза и регенерации специализированных клеток происходят при развитии практически любого патологического процесса в каком-либо органе. Это ведет к изменениям поступления и презентации соответствующих аутоантигенов, что сопровождается реакцией иммунной системы в виде изменений продукции ауто-АТ нужной специфичности [4]. Следует отметить, что у обследованных нами подростков снижение

или повышение иммунореактивности ауто-АТ, выходящих за пределы пограничного отклонения, в котором изменения являются обратимыми, наблюдались лишь в небольшом числе случаев. Исключение составляет повышенное относительное содержание ауто-АТ к $\beta 2$ -ГП I. Более того, в большинстве случаев наблюдалось повышение или снижение только одного из трех исследуемых видов ауто-АТ. Поэтому при интерпретации результатов наших исследований, некорректно говорить об аутоиммунных процессах. Возможно, что выявленные изменения относительного содержания ауто-АТ, характеризующих состояние иммунной системы подростков, отражают особенности протекания адаптивных процессов, а не патологический процесс.

Отмеченное нами снижение содержание α -ИНФ, на фоне пониженной иммунореактивности ауто-АТ к нДНК, может быть транзиторным и являться результатом недавно перенесенного вирусного заболевания. Данные литературы свидетельствуют, что повышение относительного содержания ауто-АТ к $\beta 2$ -ГП I может быть вызвано инфекцией [3]. В пользу данного предположения свидетельствует и повышенный уровень γ -ИНФ в крови подростков с высоким содержанием ауто-АТ [7]. Поскольку среди обследованных подростков не было лиц с признаками острого воспаления, можно предположить, что изменения содержания γ -ИНФ и ауто-АТ к $\beta 2$ -ГП I являются признаком скрытого протекания инфекционного процесса.

В целом в работе установлено, что при скрининговом обследовании подростков снижение содержания ауто-АТ каждой специфичности встречалось в 8–19 % случаев, из них 94–97 % — в пределах пограничных значений. Случаи гипериммунореактивности ауто-АТ, отражающих состояние иммунной системы, встречались значительно чаще от 18 до 63 %. Причем содержание ауто-АТ к $\beta 2$ -ГП I выше пограничных отклонений выявлено у каждого пятого обследованного. У некоторых из этих подростков выявлены повышенные уровни γ -ИНФ, что может свидетельствовать о наличии

инфекционного процесса в организме. Флуктуации содержания интерлейкинов 2 и 10 и α -ИНФ в зависимости от иммунореактивности находились в пределах референтных значений. Полученные результаты позволяют выделить группу лиц с гипер- и гипоиммунореактивностью. Однако для адекватной оценки состояния иммунной системы необходимы дальнейшие наблюдения данных групп школьников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Ю.Н. О системе цитокинов // Педиатрия. — 2007. — Т. 86, № 3. — С. 124–128.
2. Журавлева Т.А., Казанцева М.Е. Выявление факторов риска болезней органов дыхания у подростков крупного промышленного города // Гигиена и санитария. — 2006. — № 3. — С. 67–69.
3. Мальцев С.В., Полетаев А.Б., Мансурова Г.Ш. Диагностическое и прогностическое значение определения естественных аутоантител к почечным антигенам в развитии пиелонефрита у детей // Педиатрия. — 2007. — Т. 86, № 6. — С. 60–64.
4. Полетаев А.Б. О возможных механизмах нарушения развития нервной системы ребенка при диабетической фетопатии // Вестн. Рос. ассоц. акушеров и гинекологов. — 1998. — Т. 18, № 3. — С. 31–36.
5. Полетаев А.Б. Физиологическая иммунология (естественные ауто-антитела и проблемы наномедицины). — М.: Миклош, 2011. — 218 с.
6. Савилов Е.Д., Ильина С.В. Инфекционная патология в условиях техногенного загрязнения окружающей среды: клинко-эпидемиологические исследования. — Новосибирск: Наука, 2010. — 248 с.
7. Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж. Роль цитокинов в воспалительном процессе // Сибир. мед. журн. — 2008. — № 8. — С. 5–8.
8. Стамова Л.Г., Чеснокова Е.А. Загрязнение атмосферного воздуха и его влияние на заболеваемость органов дыхания у детей // Гигиена и санитария. — 2005. — № 5. — С. 28–30.

Сведения об авторах

Маснавиева Людмила Борисовна — старший научный сотрудник лаборатории биохимии, Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ экологии человека» СО РАМН — Научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека, кандидат биологических наук (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: (3955) 55-40-86; e-mail: masnavieva_luda@mail.ru)

Кудаева Ирина Валерьевна — заведующая клинко-диагностической лабораторией, Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ экологии человека» СО РАМН — Научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека, кандидат медицинских наук (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: (3955) 55-96-63; e-mail: kudaeva_irina@mail.ru)

В.Г. Матвеева, А.С. Головкин, М.Н. Чернова, Д.Л. Шукевич, Е.В. Григорьев

ДИНАМИКА ПОВЕРХНОСТНОЙ ЭКСПРЕССИИ ТРИГГЕРНОГО РЕЦЕПТОРА, ЭКСПРЕССИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ-1 (TREM-1) НА РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ МОНОЦИТОВ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ ПРЯМОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (Кемерово)

Исследована поверхностная экспрессия триггерного рецептора, экспрессируемого миелоидными клетками-1 (TREM-1) на различных популяциях моноцитов до проведения операции прямой реваскуляризации миокарда в условиях искусственного кровообращения (ИК) и в раннем послеоперационном периоде. Нами зарегистрировано, что субпопуляциям моноцитов соответствует различная экспрессия TREM-1 на поверхности, при этом наибольший уровень обнаружен на моноцитах CD14^{hi}CD16⁺. К 1-м суткам послеоперационного периода происходит повышение поверхностной экспрессии TREM-1 на всех субпопуляциях моноцитов, свидетельствуя об увеличении их провоспалительного потенциала.

Ключевые слова: TREM-1, субпопуляции моноцитов, СВО

DYNAMICS OF SURFACE EXPRESSION OF TRIGGER RECEPTOR, EXPRESSED BY MYELOID CELLS-1 (TREM-1) ON VARIOUS SUBPOPULATIONS OF MONOCYTES IN EARLY POSTOPERATIVE PERIOD OF DIRECT REVASCULARIZATION OF MYOCARDIUM

V.G. Matveyeva, A.S. Golovkin, M.N. Chernova, D.L. Shukevich, E.V. Grigoryev

Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases SB RAMS, Kemerovo

We studied surface expression of trigger receptor, expressed by myeloid cells-1 (TREM-1) on various subpopulations of monocytes before direct revascularization of myocardium with artificial blood flow and in early postoperative period. We registered that various expression of TREM-1 on the surface corresponds to subpopulations of monocytes, and the highest level is observed on CD14^{hi}CD16⁺ monocytes. By the 1st day of postoperative period elevation of surface expression of TREM-1 occurs on all subpopulations of monocytes, testifying to enlargement of their proinflammatory potential.

Key words: TREM-1, subpopulations of monocytes, systemic inflammatory response

Моноциты составляют 5–10 % от общего количества лейкоцитов крови человека и выполняют ряд важных функций в запуске, поддержании и контроле иммунного ответа.

Популяция моноцитов не однородна. По уровню экспрессии на поверхности низкоаффинного рецептора Fcγ CD16 и корецептора липополисахарида CD14 принято выделять три субпопуляции CD14^{hi}CD16⁻, CD14^{hi}CD16⁺, CD14^{dim}CD16⁺ [11, 16]. Субпопуляции моноцитов выполняют различные функции в организме и соответственно отличаются по функциональной активности, спектру и выраженности экспрессии поверхностных рецепторов и секретируемых при активации цитокинов.

В норме приблизительно 90–95 % моноцитов крови являются CD14^{hi}CD16⁻. Они характеризуются выраженной фагоцитарной и микробицидной активностью, способностью к продукции хемокинов IL-8, CCL2, CCL3 [11]. В литературе клетки с данным фенотипом получили название «классических» моноцитов.

Минорная субпопуляция CD14^{hi}CD16⁺ моноцитов обладает сниженной фагоцитарной активностью и ограниченной способностью к респираторному «взрыву», синтезу хемокинов по сравнению CD14⁺CD16⁻, но активно продуцирует

провоспалительные цитокины (TNF, IL-1, IL-6) [11]. Моноциты CD14^{hi}CD16⁺ вовлечены в процессы, связанные с системной воспалительной реакцией, что позволяет рассматривать данную популяцию клеток как «провоспалительную» [17]. Показано ее значительное увеличение у пациентов с сепсисом, ревматоидным артритом, СПИДом, атеросклерозом [17].

Благодаря особенностям экспрессии на поверхности хемокиновых рецепторов и рецепторов адгезии, моноциты CD14^{dim}CD16⁺ обладают повышенной тропностью к эндотелию и высокой миграционной активностью, [11]. В циркулирующей крови содержится всего лишь до 25 % от общего количества моноцитов с фенотипом CD14^{dim}CD16⁺ [15]. Предполагается, что, в случае ишемического повреждения миокарда эти клетки принимают участие в репарации тканей, привлекая в очаг фибробласты, стимулируя ангиогенез и отложение коллагена [13]. Активированные моноциты CD14^{dim}CD16⁺ проявляют проатеросклеротическую активность, поддерживая хроническое воспаление и способствуя прогрессированию ИБС [6, 11].

Триггерный рецептор, экспрессируемого миелоидными клетками-1 (TREM-1) является активирующим рецептором нейтрофилов, моно-

цитов и тканевых макрофагов [4]. Он участвует в антимикробной защите, регулируя эффекторные функции врожденного иммунитета и индуцируя адаптивный иммунный ответ [2, 10]. TREM-1 способен амплифицировать воспалительный ответ гранулоцитов и моноцитов, инициированный Toll и NOD-подобными рецепторами [2, 4, 14]. Так активация TREM-1 на моноцитах анти-TREM-1 антителами в присутствии лиганда TLR или NLR, усиливает продукцию цитокинов в 10–20 раз [4, 14]. Такая совместная стимуляция может вызывать как компенсаторную, так и чрезмерную воспалительную реакцию, приводящую к повреждению. Действительно, экспериментальные данные подтверждают положительный эффект блокирования этого рецептора при патологических состояниях, связанных с избыточностью системного воспалительного ответа [8, 9].

У пациентов, перенесших операцию прямой реваскуляризации миокарда в условиях искусственного кровообращения (ИК), ранний послеоперационный период сопровождается проявлениями системного воспалительного ответа (СВО). Важным патогенетическим звеном в развитии СВО является активация ранних воспалительных реакций с сопутствующей гиперцитокинемией, появлением в кровотоке большого количества протеиназ, активных форм кислорода и т.д. Основным синтез этих факторов осуществляют моноциты, нейтрофилы, тканевые и сосудистые макрофаги [1].

Принимая во внимание участие TREM-1 в реализации СВО и функциональное различие субпопуляций моноцитов, представляется важным изучение поверхностной экспрессии TREM-1 на субпопуляциях моноцитов и ее динамика в раннем послеоперационном периоде прямой реваскуляризации миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 35 пациентов с ишемической болезнью сердца стенокардией II–III ФК, хронической сердечной недостаточностью (ХСН) I–IIA (функциональный класс по NYHA II–III) в возрасте от 47 до 70 лет. Критерии

исключения: сочетанная патология коронарных сосудов и клапанов сердца, острая инфекция и обострение хронической инфекции, наличие злокачественных новообразований, хирургические осложнения в послеоперационном периоде. Всем пациентам была выполнена операция прямой реваскуляризации миокарда при стандартизированном виде кардиopleгии и неппульсирующем режиме ИК. Использовалась внутривенная тотальная анестезия, на основе фентанила и мидазолама. ИК проводилось однотипным гипертоническим, гиперонкотическим перфузатом, одинаковым объемом первичного заполнения аппарата искусственного кровообращения. Использовали кровяную холодовую кардиopleгию, пассаж кардиopleгии проводился антеградно. Время ИК составило 88 мин (75–105 мин), время пережатия аорты 57 мин (48–61 мин). СВО у всех пациентов был оценен по четырем критериям, принятым на согласительной конференции в Чикаго [3].

Для исследования моноцитов кровь из периферической вены забиралась в пробирки с K_3EDTA до операции и на 1-е сутки после операции. После проведения Fc-блока в нее были добавлены моноклональные антитела CD16-FITC, CD45-PC5, CD14-APC (производства Beckman Coulter, США) и anti-human TREM-1-PE (R&D) в объеме указанном производителем. Контролем служило внесение равного объема антител соответствующего изотипического контроля. Клетки с антителами инкубировали при температуре 4 °C в течение 30 минут в защищенном от света месте. Лизис эритроцитов проводили лизирующим буфером BD FACS lysing solution (производства BD Bioscience, США). После 10-минутной инкубации клетки однократно отмывали избытком фосфатно-солевого буфера (PBS). Полученный осадок ресуспендировали в PBS.

Цитофлуориметрический анализ был выполнен на проточном лазерном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Использовалась программа CellQuestPro и единые настройки прибора для всех проб. В каждом из образцов анализировали не менее 3000 моноцитов. Для исключения дебриса, порог устанавливали по FS и CD45PC5. Популя-

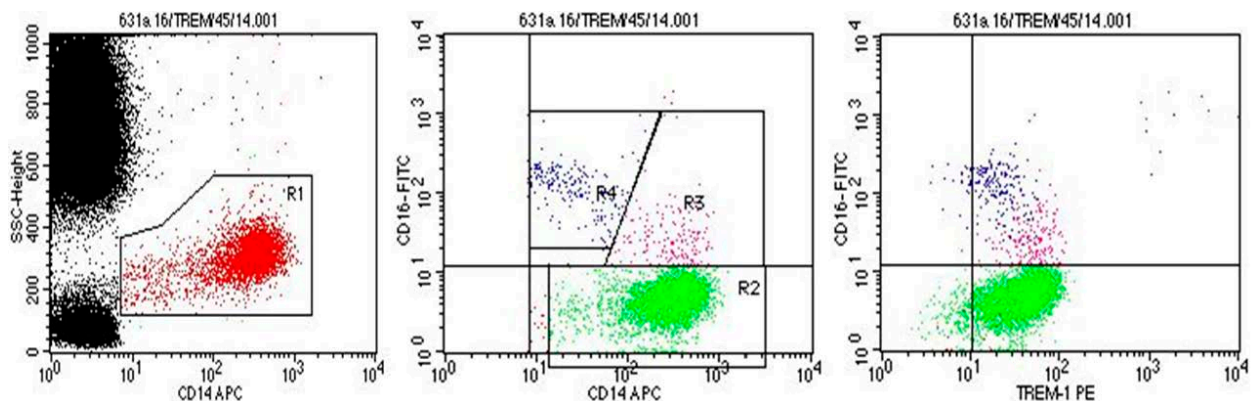


Рис. 1. Процедура разделения моноцитов на субпопуляции и определения уровня поверхностной экспрессии TREM-1.

цию моноцитов выделяли по CD14 в комбинации с боковым светорассеянием (SSC). По уровню экспрессии рецепторов CD14 и CD16, моноциты были разделены на три субпопуляции — $CD14^{hi}CD16^{-}$, $CD14^{hi}CD16^{+}$ и $CD14^{dim}CD16^{+}$ (рис. 1). Отдельно для каждой субпопуляции проводилась оценка уровня поверхностной экспрессии рецепторов TREM-1 по средней интенсивности флюорисценции — MIF (mean intensity of fluorescence) с использованием значений Geom. Mean.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы «Statistica 6.0». Оценка значимости различий проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Данные представлены как средняя и стандартная ошибка средней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выяснено, что имеются достоверные отличия ($p < 0,001$) в уровне экспрессии TREM-1 на поверхности субпопуляций моноцитов (рис. 2). На дооперационном этапе средняя интенсивность флюорисценции TREM-1 на моноцитах $CD14^{hi}CD16^{+}$ (MIF $33,64 \pm 2,07$) была выше, чем на субпопуляциях $CD14^{hi}CD16^{-}$ (MIF $23,52 \pm 1,25$) и $CD14^{dim}CD16^{+}$ (MIF $17,56 \pm 0,85$). Уровень поверхностной экспрессии TREM-1 моноцитов $CD14^{hi}CD16^{-}$ и $CD14^{dim}CD16^{+}$ так же значимо различался.

Лигирование TREM-1 на моноцитах значительно повышает продукцию провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6, M-CSF), хемокинов (IL-8, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α), снижает секрецию противовоспалительного IL-10 и умеренно усиливает фагоцитарную активность [7, 11]. Кроме того, при совместной стимуляции рецептора с TLR или NLR воспалительный ответ многократно усиливается [4, 14]. Следовательно, уровень экспрессии этого рецептора на поверхности моноцитов свидетель-

ствует о потенциальной способности к продукции провоспалительных цитокинов.

Наши результаты согласуются с литературными данными и показывают, что наибольшая плотность рецепторов TREM-1 определяется на субпопуляции $CD14^{hi}CD16^{+}$, которая обладает провоспалительными свойствами и высокой цитокин-продуцирующей активностью [6, 11, 17]

Активированные моноциты $CD14^{dim}CD16^{+}$ синтезируют самое низкое количество IL-6, IL-1 β , IL-8 по сравнению с другими субпопуляциями, в нашем исследовании им соответствует наименьшая экспрессия TREM-1 на поверхности [6].

У пациентов в 1-е сутки после операции развился СВО различной степени тяжести и включал от 1 до 3 критериев, принятых на согласительной конференции [3]. В этот период нами зарегистрировано достоверное увеличение уровня поверхностной экспрессии TREM-1 на всех субпопуляциях моноцитов по сравнению с дооперационными значениями, что указывает на повышение их провоспалительного потенциала (рис. 3). Так в 1-е сутки после операции средняя интенсивность флюоресценции TREM-1 на моноцитах $CD14^{hi}CD16^{-}$ составила $27,18 \pm 1,31$, а на субпопуляциях $CD14^{hi}CD16^{+}$ и $CD14^{dim}CD16^{+}$ $48,11 \pm 2,67$ и $31,07 \pm 2,18$ соответственно.

Результаты клинических исследований показывают, что повышение экспрессии TREM-1 на поверхности моноцитов наблюдается во время инфекций, вызванных бактериями, вирусами и грибами, а значительное увеличение происходит при сепсисе и септическом шоке [2, 5]. Механизмы повышения экспрессии TREM-1 связывают с воздействием лигандов TLRs и NLRs на моноциты. Наиболее изучены механизмы экспрессии TREM-1 под воздействием лигандов TLRs, для которых необходимым условием является присутствие TLR

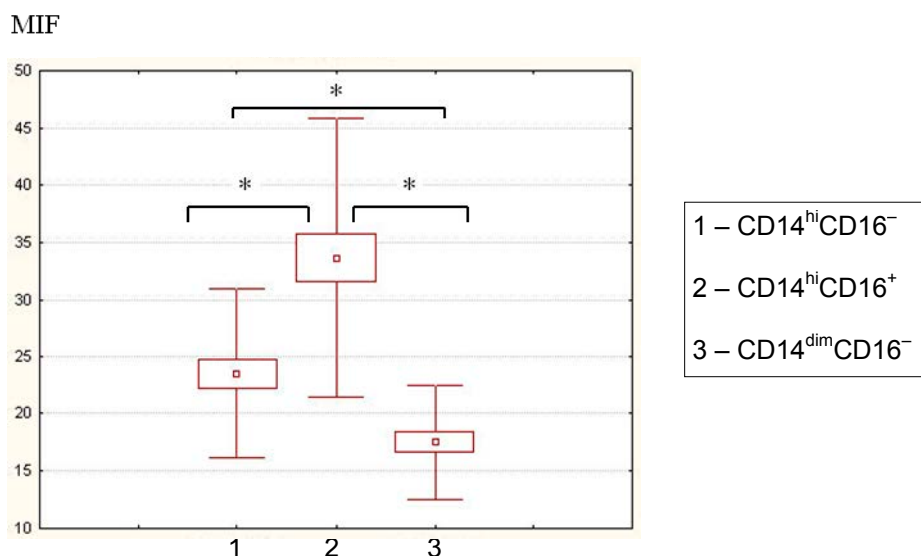


Рис. 2. Распределение экспрессии TREM-1 на субпопуляциях моноцитов. * – достоверность различий $p < 0,001$; 1 – $CD14^{hi}CD16^{-}$, 2 – $CD14^{hi}CD16^{+}$, 3 – $CD14^{dim}CD16^{-}$.

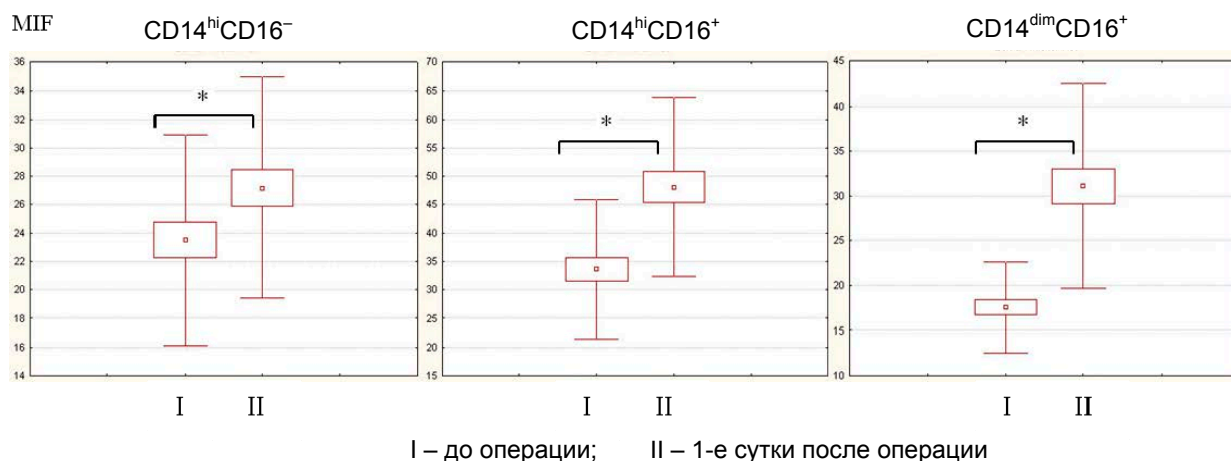


Рис. 3. Динамика уровня экспрессии TREM-1 на субпопуляциях моноцитов в 1-е сутки после операции. * – достоверность различий $p < 0,001$. I – до операции, II – 1-е сутки после операции.

[2, 14]. Однако экспрессию TREM-1 регулируют не только патогены микроорганизмов, но и алармины (эндогенные молекулы, образующиеся при повреждении) [12].

СВО в 1-е сутки послеоперационного периода у пациентов после прямой реваскуляризации миокарда чаще всего не имеет связи с инфекцией. Он развивается при воздействии на органы и ткани ишемии-реперфузии, искусственного кровообращения, кардиopleгии, механического повреждения и т.д., приводя к различным реакциям, в том числе к массивному выбросу аларминов. Дальнейшее течение процесса не исключает транслокации бактерий и эндотоксинов из желудочно-кишечного тракта вследствие гипоксического повреждения слизистой оболочки. Поскольку у таких пациентов в 1-е сутки послеоперационного периода доминирующее влияние на врожденный иммунный ответ оказывают алармины, можно предполагать их участие в зафиксированном нами повышении экспрессии TREM-1 на моноцитах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, субпопуляциям моноцитов соответствует различный уровень поверхностной экспрессии TREM-1, соответствующий потенциальной способности клеток к продукции провоспалительных цитокинов. В раннем послеоперационном периоде повышается экспрессия TREM-1 на всех субпопуляциях моноцитов, свидетельствуя об увеличении их провоспалительного потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Юрченко Л.Н. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, Вып. 4. – С. 9–21.
2. Bleharski J.R., Kiessler V., Buonsanti C. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response // J. Immunol. – 2003. – Vol. 170, N 7. – P. 3812–3818.

3. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine // Chest. – 1992. – Vol. 101, N 6. – P. 1644–1655.

4. Bouchon A., Dietrich J., Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes // J. Immunol. – 2000. – Vol. 164, N 10. – P. 4991–4995.

5. Bouchon A., Facchetti F., Weigand M.A., Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock // Nature. – 2001. – Vol. 410. – P. 1103–1107.

6. Cros J., Cagnard N., Woollard K. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors // Immunity. – 2010. – Vol. 33, N 3. – P. 375–386.

7. Dower K., Ellis D.K., Saraf K. Innate Immune Responses to TREM-1 Activation: Overlap, Divergence, and Positive and Negative Cross-Talk with Bacterial Lipopolysaccharide // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180. – P. 3520–3534.

8. Gibot S., Massin F., Alauzet C., Montemont C. et al. Effects of the TREM-1 pathway modulation during mesenteric ischemia-reperfusion in rats // Crit. Care Med. – 2008. – Vol. 36, N 2. – P. 504–510.

9. Gibot S., Massin F., Marcou M. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice // Eur. J. Immunol. – 2007. – Vol. 37. – P. 456–466.

10. Markus P., Radsak, Helmut R. Salih Hans-Georg. Rammensee, Hansjörg Schild Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 in Neutrophil Inflammatory Responses: Differential Regulation of Activation and Survival // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172. – P. 4956–4963.

11. Merino A., Buendia P., Martin-Malo A. Senescent CD14⁺ CD16⁺ Monocytes Exhibit Proinflammatory and Proatherosclerotic Activity // J. Immunol. – 2010. – Vol. 186. – P. 1809–1815.

12. Murakami Y., Akahoshi T., Hayashi I., Endo H. et al. Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in murine resident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals // *Arthritis Rheum.* — 2006. — Vol. 54. — P. 455–462.

13. Nahrendorf M., Swirski F.K., Aikawa E. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions // *J. Exp. Med.* — 2007. — Vol. 204. — P. 3037–3047.

14. Netea M.G., Azam T., Ferwerda G. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR

(NLR) pattern recognition receptors // *J. Leuk. Biol.* — 2006. — Vol. 80. — P. 1454–1461.

15. Steppich B., Dayyani F., Gruber R. Selective mobilization of CD14+CD16+ monocytes by exercise // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2000. — Vol. 279. — P. 578–586.

16. Tallone T., Turconi G., Soldati G. Heterogeneity of Human Monocytes: An Optimized Four-Color Flow Cytometry Protocol for Analysis of Monocyte Subsets // *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* — 2011. — Vol. 4. — P. 211–219.

17. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation // *J. Leukocyte Biol.* — 2007. — Vol. 81, N 3. — P. 584–592.

Сведения об авторах

Матвеева Вера Геннадьевна – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; тел.: 8-908-947-49-16; e-mail: matveeva_vg@mail.ru)

Головкин Алексей Сергеевич – заведующий отделом экспериментальной и клинической кардиологии, заведующий лабораторией клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, кандидат медицинских наук (e-mail: golovkin_a@mail.ru)

Чернова Мария Николаевна – лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (e-mail: chernova.maria.n@mail.ru)

Шукевич Дмитрий Леонидович – заведующий лабораторией критических состояний ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, доктор медицинских наук

Григорьев Евгений Валерьевич – заместитель директора по научной и лечебной работе ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (e-mail: grigoriev@mail.ru)

В.И. Минина ¹, М.Л. Баканова ¹, Я.А. Савченко ¹, А.А. Тимофеева ¹, Т.П. Аносова ¹, В.А. Титов ²,
Н.Е. Вергбизкая ³, А.Н. Глушков ¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ ДНК И ЧАСТОТОЙ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

¹ Институт экологии человека СО РАМН (Кемерово)

² Областной клинический онкологический диспансер (Кемерово)

³ Кемеровское патологоанатомическое бюро (Кемерово)

Проводили поиск ассоциаций между рядом полиморфизмов в генах репарации ДНК и уровнем хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах крови в двух группах: 215 больных раком легкого и 152 здоровых доноров. В группе больных РЛ уровень хромосомных aberrаций был статистически значимо выше у носителей генотипов TG и GG гена XPD, по сравнению с генотипом TT. В контрольной группе здоровых доноров уровень ХА был выше у носителей генотипа TC гена ADPRT, по сравнению с генотипом TT.

Ключевые слова: рак легкого, хромосомные aberrации, гены ферментов репарации ДНК

ASSOCIATION OF DNA REPAIR GENE POLYMORPHISM WITH CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN THE BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH LUNG CANCER

V.I. Minina ¹, M.L. Bakanova ¹, J.A. Savchenko ¹, A.A. Timopheeva ¹, T.P. Anosova ¹,
V.A. Titov ², N.E. Verghbizkaja ³, A.N. Glushkov ¹

¹ Institute of Human Ecology SB RAMS, Kemerovo

² Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo

³ Pathologoanatomic bureau, Kemerovo

Analysis of association between several DNA repair gene polymorphisms and the level of chromosomal aberrations (CAs) in lymphocytes was performed in two groups: a group of 215 patients with lung cancer and a control group of 152 donors. In the group patient with lung cancer the level of CAs shows a significant increase in the carrier of genotypes: XPD TG and XPD GG vs XPD TT. In the control group level of CAs shows a significant increase in the carrier of genotype ADPRT TC vs TT.

Key words: lung cancer, chromosomal aberrations, DNA repair gene

Рак легкого (РЛ) занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости и смертности среди мужского населения России. Известно, что риск РЛ существенно возрастает у курящих лиц, особенно в условиях загрязнения вдыхаемого атмосферного воздуха продуктами термической обработки угля, древесной и металлической пылью. Ввиду высокой концентрации предприятий угледобывающего и перерабатывающего комплекса на территории Кемеровской области особую актуальность представляют исследования больных РЛ, проживающих в этом регионе.

Признанным маркером мутагенного воздействия среды на организм являются хромосомные aberrации (ХА) в лимфоцитах крови, однако остается много неясного относительно специфики их формирования у больных злокачественными опухолями.

Известно, что тонкие изменения специфических белков, функционирующих в репаративных системах, потенциально способны приводить к мутагенезу [11]. Интенсивно изучаются ассоциации уровня повреждений ДНК и полиморфизмов генов ферментов репарации: XRCC1, XPD/ERCC2, hOGG1, APE1, ADPRT. Понимание роли генетических повреждений и их репарации в механизме возникновения РЛ сегодня являются основной предпосылкой для разработки новых терапевтических технологий и диагностических критериев в

оценке функционирования молекулярных звеньев этиологической цепочки процесса инициации данного онкологического заболевания.

В связи с этим целью данного исследования стало изучение связи ХА с полиморфизмом генов репарации ДНК у жителей Кемеровской области больных РЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было обследовано 367 человек. Из них 215 больных РЛ, проживающих на территории Кемеровской области, поступивших на лечение в Кемеровский областной онкологический диспансер. В группу вошло 180 мужчин и 37 женщин. Среди обследованных соотношение курящие/некурящие составило 181/37. Средний возраст — 58 лет. Группу сравнения составили 152 здоровых донора (56 мужчин и 96 женщин; средний возраст — 44 года; курящих и некурящих — 40/115), также проживающих в Кемеровской области.

Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь. Культивирование клеток крови осуществляли по стандартному полумикрометоду [7]. Питательную смесь готовили из расчета: среда RPMI — 1640 (6 мл), сыворотка крупного рогатого скота (1,5 мл) и 0,1 мл фитогемагглютина (ПанЭко). Смесь помещали в стерильные культуральные флаконы и добавляли 0,5 мл гепа-

ринизированной крови. Культуральные флаконы выдерживали при 37 °C в течение 48 часов. За 2 часа до фиксации в культуры вводили колхицин (0,5 мкг/мл). После гипотонической обработки и фиксации клеток суспензию раскапывали на охлажденные чистые предметные стекла и высушивали над пламенем спиртовки. Препараты окрашивали 1% красителем Гимза и анализировали под микроскопом Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Germany). Для учета ХА у каждого индивида проанализировано от 100 до 200 метафаз. Регистрировали aberrации хромосомного и хроматидного типов в соответствии с общепринятыми требованиями [2]. Долю aberrантных метафаз определяли путем подсчета частоты метафаз с aberrациями хромосом (в процентах от изученного числа клеток).

Для изучения полиморфизмов генов репарации ДНК: *APE1 Asp148Glu*; *hOGG1 Ser326Cys*; *XPB Lys751Gln*; *ADPRT Val762Ala* использовали коммерческую тест-систему «SNP-express» (НПФ «Литех», г. Москва). ПЦР проводили на амплификаторах ТЕРЦИК (НПФ «ДНК-Технология», Россия) по программе, рекомендованной производителем набора. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в горизонтальном 3% агарозном геле. После окончания электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для основных показателей рассчитывали средние значения и их стандартные ошибки ($M \pm m$). Распределение значений всех изученных показателей сравнивалось с нормальным методом Колмогорова-Смирнова. По результатам анализа установлено, что распределение всех изучаемых цитогенетических параметров отличалось от нормального. На основании этого, в дальнейшем, для сравнения групп использовали ранговый U-тест Манна – Уитни. Сравнение частот генотипов проводили с помощью четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность вариации (χ^2). Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования было зафиксировано, что средняя частота aberrантных метафаз у больных РЛ составила $2,88 \pm 0,13$ %, что статистически значимо выше, чем в группе здоровых — $1,79 \pm 0,13$ % ($U_{M-W} = 21253$; $p = 0,00001$). Увеличение частоты aberrаций хромосом в группе больных РЛ достигается, преимущественно, за счет одиночных фрагментов.

Сопоставление цитогенетических параметров между мужчинами и женщинами не выявило никаких различий между полами, как в опытной, так и в контрольной группе. Наблюдаемые различия частоты ХА между РЛ и контролем достигали статистической значимости как у мужчин ($p = 0,000004$), так и у женщин ($p = 0,02$).

Анализ воздействия фактора курения не показал значимых отличий ХА между группами курящих и некурящих в изученных выборках больных РЛ и здоровых доноров.

На следующем этапе проводился анализ полиморфизмов генов репарации ДНК в изучаемых группах. Учитывая тот факт, что средний возраст в группе здоровых доноров был ниже (43 года), чем в группе больных РЛ (58 лет), первоначально проводилась проверка влияния возраста на частоты генотипов. Группы были разделены на подгруппы: до 50 лет и старше 50 лет. Сопоставление частот генотипов всех изученных генов в данных подгруппах показала отсутствие статистически значимых отличий. Исходя из этого, в дальнейшем мы проводили сравнение групп больных РЛ и здоровых доноров без подразделения их на возрастные подгруппы.

Проведенный анализ позволил выявить значимую положительную ассоциацию генотипа *hOGG1 GG* с РЛ (8,9 % в исследуемой группе против 1,3 % в группе сравнения; $\chi^2 = 4,23$; $p = 0,04$; $RR = 5,99$; $CI = 2,25 - 15,97$). Для генотипа *CC* гена *hOGG1* выявлена значимая отрицательная ассоциация с РЛ (66,3 % в группе сравнения против 46,1 % в исследуемой группе; $\chi^2 = 7,07$; $p = 0,008$; $RR = 0,44$; $CI = 0,17 - 1,17$).

Ген *hOGG1* кодирует фермент ДНК-гликозилазу, которая вырезает мутантное основание 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-OHdG), возникающее в результате воздействия на ДНК свободных радикалов. Для аллеля *hOGG1 326Cys* установлена сниженная функциональная активность кодируемого им фермента [6], что приводит к снижению индивидуальной способности к репарации повреждений ДНК и повышению чувствительности к канцерогенам [12].

На следующем этапе был проведен анализ частоты ХА в зависимости от различных генотипов генов системы репарации ДНК. Результаты представлены в таблицах 1 и 2. В группе здоровых доноров (табл. 1) показатели хромосомного мутагенеза: доля aberrантных метафаз, доля aberrаций на 100 клеток, aberrаций хромосомного типа были статистически значимо выше у носителей генотипа *TC* гена *ADPRT*, по сравнению с генотипом *TT*. Повышения уровня ХА у носителей различных комбинаций генотипов изученных генов выявлено не было.

Ген *ADPRT* (adenosine diphosphate ribosyl transferase) кодирует ассоциированный с хроматином фермент поли-АДФ-рибозил-полимеразу (PARP), которая модифицирует различные ядерные белки. PARP относится к одному из ядерных факторов, первым распознающим повреждение ДНК, входит в мультипротеиновый комплекс (MP-комплекс), включающий, кроме него, еще фактор XRCC1, ДНК-лигазу III и бета-ДНК-полимеразу. PARP способен регулировать активность MP-комплекса путем модифицирования белков. Кроме того, PARP служит источником энергии для ДНК-лигаз, описано участие PARP в процессах репликации, транскрипции, модификации хроматина и апоптоза [8]. Трансверсия Т-С в сайте 2285 локализована в каталитическом домене белка и сопровождается потерей метильной

Таблица 1

Характеристика основных цитогенетических показателей у здоровых доноров из группы сравнения с различными генотипами системы репарации ДНК

Полиморфизм	Генотип	n	Доля aberrантных метафаз, %	Аберраций на 100 клеток, %	Аберраций хроматидного типа, %	Аберраций хромосомного типа, %
APE(X)1 T444G	TT	53	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1
	TG	57	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1
	GG	29	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,4	1,8 ± 0,4	0,1 ± 0,07
hOGG1 C977G	CC	91	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1
	CG	59	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,3	0,3 ± 0,1
	GG	2	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,9	0
ADPRT T2285C	TT	65	1,3 ± 0,2*	1,2 ± 0,2*	1,1 ± 0,2*	0,3 ± 0,1
	TC	44	2,8 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,3 ± 0,4	0,5 ± 0,1
	CC	8	2,5 ± 0,9	2,4 ± 0,7	2,1 ± 0,7	0,3 ± 0,2
XPD T2251G	TT	49	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1
	TG	65	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1
	GG	22	2,3 ± 0,5	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,4	0,3 ± 0,1

Примечание: * – отличается от ADPRT TC, $p = 0,002$.

группы, в результате чего может нарушаться связь одной из петель белка с активным центром фермента, что в свою очередь может являться причиной снижения функциональной активности белка [5]. Замена Val762Ala связывается с повышенной предрасположенностью к развитию некоторых форм рака [9]. В работе Zhang (2005) было обнаружено небольшое повышение риска рака для замены ADPRT Val762Ala и 5-кратное возрастание риска для сочетания ADPRT 762AlaAla XRCC1 399GlnGln [15]. Кроме того, было показано повышение частоты ХА в клетках крови детей с генотипами ADPRT AlaAla, ADPRT ValAla, по сравнению с ADPRT ValVal, проживающих в условиях воздействия повышенных доз

радоны [3]. В данном же исследовании, впервые была показана значимость генотипа ADPRT в формировании хромосомных нарушений у взрослых здоровых доноров в условиях спонтанного мутагенеза.

В группе больных РЛ (табл. 2) уровень хромосомных аберраций (показатели: доля aberrантных метафаз, доля аберраций на 100 клеток, аберраций хромосомного типа) был статистически значимо выше у носителей генотипов TG и GG гена XPD, по сравнению с генотипом TT.

Ген XpD/ERCC2 (excision repair crosscomplementing rodent repair deficiency, complementation group 2 [xeroderma pigmentosum D]) локализован на хромосоме 19q32.2 и кодирует АТФ-независимую

Таблица 2

Характеристика основных цитогенетических показателей у больных раком легкого с различными генотипами системы репарации ДНК

Полиморфизм	Генотип	n	Доля aberrантных метафаз, %	Аберраций на 100 клеток, %	Аберраций хроматидного типа, %	Аберраций хромосомного типа, %
APE(X)1 T444G	TT	52	3,4 ± 0,4	3,3 ± 0,4	2,8 ± 0,3	0,6 ± 0,1
	TG	65	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	GG	49	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,3	2,7 ± 0,3	0,6 ± 0,1
hOGG1 C977G	CC	99	2,9 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	CG	75	3,5 ± 0,3	3,4 ± 0,3	2,9 ± 0,3	0,5 ± 0,1
	GG	17	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,4	1,9 ± 0,4	0,4 ± 0,2
ADPRT T2285C	TT	127	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1
	TC	75	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3	2,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	CC	15	2,7 ± 0,6	2,6 ± 0,6	2,4 ± 0,5	0,3 ± 0,1
XPD T2251G	TT	45	2,7 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*	2,5 ± 0,3	0,3 ± 0,1*
	TG	80	3,3 ± 0,3	3,2 ± 0,3	2,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1**
	GG	44	3,5 ± 0,3	3,6 ± 0,3	2,8 ± 0,3	0,8 ± 0,1

Примечание: * – отличается от XPD TG и XPD GG, $p = 0,01$; ** – отличается от GG, $p = 0,04$.

хеликазы. Это ключевой белок эксцизионной репарации нуклеотидов, который узнает и исправляет различные мутации (сшивки оснований — тиминные димеры, аддукты ДНК, окислительные повреждения ДНК и др.), образующиеся, например, после УФ-облучения или окислительного стресса. В составе TFIIH транскрипционного комплекса хеликаза XpD раскручивает цепь ДНК, обеспечивая доступ эндонуклеаз к поврежденному участку. Полиморфизм T2251G, приводящий к замене Lys-751Gln меняет конфигурацию белка и может влиять на его взаимодействие с хеликазным активатором p44, приводя к уменьшению репаративной способности и повышению риска онкозаболеваний [4].

В ряде исследований было показано значение данной нуклеотидной замены при оценке частоты цитогенетических нарушений. Обнаружено возрастание общей частоты aberrаций в лимфоцитах крови у носителей аллеля *XpD 751Gln* после облучения [13] и при воздействии комплекса токсикантов шинного завода [10].

Таким образом, в результате проделанной работы можно сделать следующие выводы:

- частота хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови у больных РЛ выше, чем у здоровых доноров;
- установлено, что у обладателей генотипа *hOGG1 GG* в 5,9 раз выше риск РЛ, по сравнению с носителями других вариантов генотипов (CC, CG).
- в группе больных РЛ уровень ХА был статистически значимо выше у носителей генотипов TG и GG гена *XPB*, по сравнению с генотипом TT.
- в контрольной группе здоровых доноров уровень ХА был выше у носителей генотипов TC гена *ADPRT*, по сравнению с генотипом TT.

ЛИТЕРАТУРА

1. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. — М.: Наука. — 1991. — 272 с.
2. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. — М.: Медицины, 1982. — 263 с.
3. Минина В.И., Дружинин В.Г., Лунина А.А., Ларионов А.В. и др. Исследование взаимосвязи между полиморфизмом генов репарации ДНК и частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека // Эколог. генетика. — 2011. — Т. IX, № 2. — С. 74—79.
4. Benhamou S., Sarasin A. ERCC2/XPB polymorphisms and lung cancer // *Am J Epidemiol.* — 2005. — Vol. 161. — P. 1—14.
5. Cottet F., Blanche H., Verasdonck P. New polymorphisms in the human poly (ADP-ribose) polymerase-1 coding sequence: lack of association with longevity or with increased cellular poly (ADP-ribosyl)ation capacity // *J. Mol. Med.* — 2000. — Vol. 78. — P. 471—480.
6. Dherin C., Radicella J.P., Dizdaroglu M. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human *hOGG1* protein and the polymorphic *hOGG1* (Ser326Cys) protein which is frequently found in human population // *Nucleic Acids Research.* — 1999. — Vol. 27. — N 20. — P. 4001—4007.
7. Hungerford P.A. Leukocytes cultured from small inocula of wholeblood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // *Stain Techn.* — 1965. — Vol. 40. — P. 333—338.
8. Godon C., Cordelieres F.P., Biard D. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — Vol. 36. — P. 4454—4464.
9. Lockett K., Hall M.C., Xu J. The ADPRT V762A genetic variant contributes to prostate cancer susceptibility and deficient enzyme function // *Cancer Research.* — 2004. — Vol. 64. — P. 6344—6348.
10. Musak L., Soucek P., Vodickova L. Chromosomal aberrations in tire plant workers and interaction with polymorphisms of biotransformation and DNA repair genes // *Mutat Res.* — 2008. — Vol. 641, N 1—2. — P. 36—42.
11. Nemec A., Wallace S., Sweasy J. Variant base excision repair proteins: Contributors to genomic instability // *Seminars in Cancer Biology.* — 2010. — Vol. 20. — P. 320—328.
12. Park J., Chen L., Tockman M.S. The human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (*hOGG1*) DNA repair enzyme and its association with lung cancer risk // *Pharmacogenetics.* — 2004. — Vol. 14, N 2. — P. 103—112.
13. Parshad R., Tarone R.E., Price F.M. Cytogenetic evidence for differences in DNA incision activity in xeroderma pigmentosum group A, C and D cells after X-irradiation during G2 phase // *Mutat. Res.* — 1993. — Vol. 294. — P. 149—155.
14. Weiss J.M., Goode E.L., Ladiges W.C. Polymorphic variation in *hOGG1* and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature // *Mol. Carcinog.* — 2005. — Vol. 42. — P. 127—141.
15. Zhang X., Miao X., Liang G. Polymorphisms in DNA Base Excision Repair Genes ADPRT and XRCC1 and Risk of Lung Cancer // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65, N 3. — P. 722—726.

Сведения об авторах

Минина Варвара Ивановна — руководитель группы цитогенетики ИЭЧ СО РАМН, доцент, кандидат биологических наук (660002, г. Кемерово, пр. Шахтеров, 72а, кв. 2; тел.: 8-923-616-45-52; e-mail: vminina@mail.ru)

Баканова Марина Леонидовна — младший научный сотрудник ИЭЧ СО РАМН (650000, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 42-240)

Савченко Яна Александровна — младший научный сотрудник ИЭЧ СО РАМН (650056, г. Кемерово, ул. Волгоградская 29, кв. 30)

Тимофеева Анна Александровна — инженер-технолог ИЭЧ СО РАМН (650065, г. Кемерово, Ленинградский, 10)

Аносова Татьяна Петровна — научный сотрудник ИЭЧ СО РАМН (650000, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35)

Титов Виктор Александрович — заведующий торакальным отделением ФГБУЗ КО Областного клинического онкологического диспансера (650052, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35)

Вержбицкая Наталья Евгеньевна — заведующая патологоанатомическим отделением в ГБУЗ КО ОТ Кемеровском патологоанатомическом бюро (650052, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35)

Глушков Андрей Николаевич — директор ИЭЧ СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 57-50-79)

С.А. Морозов, Г.В. Томаш, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно, А.В. Смык, Н.М. Старостина, А.А. Останин, Е.Р. Черных

М2-ПОДОБНЫЕ МАКРОФАГИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КАНДИДАТЫ В ЛЕЧЕНИИ ПОСЛЕДСТВИЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Целью настоящего исследования стала оценка безопасности и эффективности *in vitro* генерированных М2-подобных макрофагов в лечении больных с ишемическим и геморрагическим инсультом в восстановительном и резидуальном периоде. Однократное эндолумбальное введение аутологичных макрофагов в средней дозе $17,9 \times 10^6$ клеток проведено 13 пациентам с ишемическим ($n = 10$) и геморрагическим ($n = 3$) инсультом. Через 6 месяцев после введения клеток у всех пациентов отмечалось клиническое улучшение. Отмечалось достоверное снижение балла NIHSS с $8,6 \pm 1,06$ до $4,4 \pm 0,55$ ($p = 0,0008$), у части пациентов регрессировали нарушения чувствительности, наблюдалось улучшение когнитивных функций и качество жизни. Таким образом, показана возможность генерации М2-подобных макрофагов у пациентов с инсультом, эндолумбальное введение клеток безопасно и не вызывает выраженных побочных реакций и осложнений и, по предварительным данным, позволяет добиться улучшения двигательных и когнитивных функций.

Ключевые слова: инсульт, М2-подобные макрофаги

M2-LIKE MACROPHAGES ARE POTENTIAL CANDIDATES FOR BRAIN STROKE OUTCOMES' TREATMENT

S.A. Morozov, G.V. Tomash, E.Ya. Shevela, L.V. Sakhno, A.V. Smyk, N.M. Starostina, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh

Research Institute of Clinical Immunology SD RAMS, Novosibirsk, Russia

The safety and effectiveness of *in vitro* generated M2-like macrophages for treatment of patients with ischemic and hemorrhagic brain stroke in reparative and residual periods has been evaluated. A single endolumbar administration of autologous M2-like macrophages in the mean dose of $17,9 \times 10^6$ cells was conducted in 13 patients with ischemic ($n = 10$) and hemorrhagic ($n = 3$) brain stroke. At 6 months after cells administration all the patients had clinical improvement. NIHSS score decreased from $8,6 \pm 1,06$ to $4,4 \pm 0,55$ ($p = 0,0008$), several patients showed the decrease of sensitiveness impairments, improvement of cognitive functions and enhanced quality of life. Thus, we demonstrated an ability of generation M2-like macrophages from patients with brain stroke. Endolumbar administration of these cells was safe and didn't cause severe adverse effects and complications and –in preliminary data – improved motional and cognitive functions.

Keywords: brain stroke, M2-like macrophages

Церебральные инсульты в настоящее время являются глобальной медицинской и социальной проблемой в связи с высокими показателями заболеваемости, смертности и инвалидизации во всем мире. Эффективность традиционного медикаментозного и хирургического лечения неврологического дефицита, обусловленного острым нарушением мозгового кровообращения, остается низкой. В связи с этим, в последние годы отмечается значительное повышение внимания к разработке стратегий, направленных на восстановление нарушенных функций в результате стимуляции репаративных процессов, в частности, с помощью клеток иммунной системы и, прежде всего, макрофагов [5, 11]. Активация клеток врожденного иммунитета и их накопление в нервной ткани при патологии долгое время ассоциировалось с исключительно повреждающим действием макрофагов. Действительно, продуцируемые макрофагами воспалительные медиаторы способны в высоких дозах вызывать гибель нервных клеток. Однако недавние исследования в моделях повреждения ЦНС продемонстрировали нейропротективные эффекты макрофагов, в частности, способность этих

клеток стимулировать рост аксонов, их спраутинг и ремиелинизацию [9, 13].

Позитивные эффекты клеток микроглии и макрофагов на репаративные процессы в ЦНС связывают со способностью макрофагов: 1) элиминировать поврежденные клетки и нейро-токсические продукты [5, 6]; 2) продуцировать цитокины и ростовые/трофические факторы с противовоспалительной, нейропротективной и регенераторной активностью [6, 7]; 3) рекрутировать и активировать нейральные СК [14]; 4) стимулировать ангиогенез абсолютно необходимый для процессов репарации.

Оппозитные эффекты макрофагов могут быть обусловлены их функциональной гетерогенностью. Так, классические провоспалительные макрофаги (M1) обладают высокой антиген-презентирующей активностью, усиливают воспаление и активируют Т-хелперные клетки 1-го типа, но при этом вызывают деструкцию тканей. Противовоспалительные (M2) макрофаги, обладая низкой антиген-презентирующей активностью, участвуют в иммунорегуляции, активируют ангиогенез и стимулируют репарацию тканей. Кроме того, M2 макрофаги активируют Th2 ответ, в наибольшей

степени благоприятствующий репарации нервной ткани [8, 10, 12].

Используя дефицитные по ростовым факторам условия культивирования, мы разработали способ генерации М2-подобных макрофагов с низкой провоспалительной активностью и значительным регенеративным потенциалом (в частности, продуцирующих высокие уровни IGF-1 и VEGF) [3]. Проведенные нами клинические исследования показали, что использование М2-подобных макрофагов у детей с детским церебральным параличом является безопасным и по предварительным данным улучшает неврологический статус пациентов [2]. **Целью** настоящей работы стало проведение пилотных исследований по оценке безопасности и эффективности М2-подобных макрофагов в лечении больных с ишемическим и геморрагическим инсультом в восстановительном и резидуальном периоде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические испытания проводились согласно разработанному протоколу, утвержденному решением ученого совета Института и одобренному локальным этическим комитетом после получения письменного информированного согласия пациента или родственников. Исследования проводились в дизайне нерандомизированного проспективного пилотного испытания с оценкой эффекта «до — после».

Критериями включения пациентов в исследование были: возраст от 18 до 75 лет включительно, наличие ишемического или геморрагического инсульта, подтвержденного данными МРТ, давностью от 3-х месяцев до 1 года, наличие письменного информированного согласия. Критериями исключения являлось наличие выраженной сердечной, дыхательной, печеночной или почечной недостаточности; неконтролируемой инфекции, наличие компрессии или дислокации головного мозга, беременность и период лактации.

В период лечения в стационаре и на амбулаторном этапе все пациенты получали антиагрегантную, вазоактивную и метаболическую терапию, при необходимости назначались гипотензивные и антиаритмические препараты, использовались методы физиотерапии, занятия с инструктором ЛФК.

На фоне проведения базисной терапии всем пациентам было выполнено эндолюмбальное введение аутологичных М2-подобных макрофагальных клеток. Профилактику возможных осложнений люмбальной пункции и цитокиновых реакций проводили введением дексаметазона в дозе 4—12 мг в/в капельно, сульфата магния, кетонала.

Первичной конечной точкой была оценка двигательных функций по шкале Национального института здоровья США (NIHSS). Вторичной конечной точкой была оценка степени функционального восстановления (по индексу Бартел), а также оценка когнитивной сферы с помощью мини-теста оценки когнитивных функций (MMSE). Обследование больных проводилось до начала и через 6 месяцев после проведения клеточной терапии.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период с 26.05.2010 по 07.03.2012 г. на базе отделения иммунологии НИИ КИ СО РАМН прошли лечение 13 пациентов (5 женщин и 8 мужчин) в восстановительном периоде ишемического ($n = 10$) или геморрагического ($n = 3$) инсульта. Возраст пациентов варьировал от 41 до 71 года (в среднем 54,1 года). Характеристика больных представлена в таблице 1. Из данных таблицы видно, что из 13 пациентов ишемический инсульт диагностировался в 10 (76,9 %), геморрагический — в 3 (23,1 %) случаях. Во всех случаях церебральный инсульт диагностировался впервые. У всех пациентов с ишемическим инсультом нарушения мозгового кровообращения локализовались в каротидной системе (в 4 (40 %) случаев — поражение левого полушария головного мозга, в 6 (60 %) — правого). У пациентов с геморрагическим инсультом во всех случаях выявлены внутримозговые гематомы с локализацией в левом полушарии головного мозга. Двое из этих пациентов получили оперативное лечение в виде трепанации черепа и дренирования внутримозговой гематомы. Время от манифестации инсульта до проведения клеточной терапии в среднем составило 225 дней.

Таблица 1
Характеристика пациентов

Параметры	
Количество	13
Средний возраст пациентов, годы	54,1
Пол (мужчины/женщины)	8 (61,5 %) / 5 (38,5 %)
Форма инсульта (ишемический/геморрагический)	10 (76,9 %) / 3 (23,1 %)
Локализация (левое/правое полушарие)	7 (53,8 %) / 6 (46,2 %)
Давность инсульта	225 дней
Клинические симптомы:	
- гемипарез	13 (100 %)
- гемигипестезия	10 (100 %)
- речевые нарушения	6 (46,1 %)
- деменция	2 (15,3 %)
Факторы риска церебральных заболеваний:	
- артериальная гипертензия	13 (100 %)
- мерцательная аритмия	2 (15,3 %)
- сахарный диабет	1 (7,6 %)
- гиперхолестеринемия	5 (38,4 %)

Тяжесть инсульта по шкале NIHSS варьировала от 18 до 3 баллов и составляла в среднем 8,7 балла. При анализе распределения пациентов по тяжести состояния по шкале NIHSS 5 пациентов имели более 10 баллов. Основные неврологические симптомы были представлены двигательными на-

рушениями. Во всех наблюдениях до лечения был выявлен гемипарез разной степени выраженности, достигающий у 4 больных степени гемиплегии (4 балла по субшкале двигательной функции верхней конечности шкалы NIHSS, 2–3 балла по субшкале двигательной функции нижней конечности). У 10 (76,9 %) пациентов отмечалась гемигипестезия различной степени выраженности. Функциональный дефицит по шкале Бартела до лечения составил в среднем 64,6 балла.

У большинства пациентов (11 из 13, или 84,6 %) наблюдалось отсутствие когнитивных нарушений (по результатам теста MMSE), в то же время у 2 пациентов (15,3 %) выявлялась деменция умеренной степени выраженности (11–19 баллов). У 6 больных имели место речевые нарушения различной степени выраженности.

Клетки вводили однократно эндолумбально в средней дозе $17,9 \times 10^6$ (от 5 до 42×10^6). Жизнеспособность полученных клеток во всех случаях превышала 90 %. Неврологическое обследование проводили до и через 6 месяцев после терапии. Как видно из данных таблицы 2, введение клеток вызывало системные реакции в виде головной боли (53,8 %), озноба (15,3 %), субфебрильной и фебрильной лихорадки (38,4 %). Других осложнений в виде каких-либо локальных или системных воспалительных или аллергических реакций, а также развития менингеальных реакций или инфекционных осложнений зарегистрировано не было (табл. 2).

Таблица 2
Переносимость эндолумбального введения аутологичных макрофагов

Симптом	Кол-во (%)
Головная боль	7 (53,8 %)
Субфебрильная и фебрильная лихорадка	5 (38,4 %)
Озноб	2 (15,3 %)
Тошнота	1 (7,6 %)
Рвота	1 (7,6 %)
Боль в ногах	1 (7,6 %)
Боль в спине	1 (7,6 %)
Диарея	1 (7,6 %)
Явления менингизма	0
Локальные и системные инфекционные осложнения	0

Через 6 месяцев после введения клеток у всех пациентов отмечалось клиническое улучшение. В целом отмечалось достоверное снижение балла NIHSS с $8,6 \pm 1,06$ до $4,4 \pm 0,55$ ($p = 0,0008$).

По субшкалам двигательной функций верхней и нижней конечностей шкалы NIHSS отмечена положительная динамика у всех пациентов, в среднем с 2,0 до 1,0 ($p = 0,00012$) и с 0,84 до 0,30 соответственно. Нарушения чувствительности полностью регрессировали у 5 пациентов. Проводимая терапия позитивно сказывалась на способности к общению и восприятию. Так, у 4 из 6 пациентов наблюдалось

улучшение речи. Больные смогли выговорить предложенные фразы в субтесте по определению речи шкалы MMSE.

Улучшение качества жизни проявлялось достоверным возрастанием балла по шкале Бартела с 64,6 до лечения до 79,9 после ($p = 0,013$).

Важно отметить, что эндолумбальное введение M2-подобных макрофагов не сопровождалось возрастанием уровня воспалительных медиаторов в сыворотке крови. Так, сравнительный анализ сывороток крови до и через 5–7 дней после введения клеток не выявил возрастания уровней СРБ ($5 \pm 1,7$ и $3,6 \pm 1,23$), ИФН-гамма (36 ± 13 и 51 ± 13) и ИЛ-17 ($13 \pm 1,2$ и $14 \pm 1,2$) (табл. 3).

Таблица 3
Эффективность эндолумбального введения аутологичных макрофагов

Показатель	До	После	p
NIHS	8,6	4,4	0,0008
Субшкала двигательной функции верхней конечности	2,0	1,0	0,004
Субшкала двигательной функции нижней конечности	0,84	0,3	0,023
Субшкала чувствительность	1,23	0,23	0,023
Barthel	64,61	79,23	0,013

Таким образом, результаты пилотного исследования свидетельствуют о возможности успешной генерации M2-подобных макрофагов у пациентов с инсультом. Эндолумбальное введение этих клеток безопасно, не вызывает выраженных побочных реакций и осложнений и по предварительным данным, позволяет добиться улучшения двигательных и когнитивных функций. Однако для более детальной характеристики M2-подобных макрофагов необходимы дальнейшие проспективные рандомизированные исследования на большей выборке и с продолжительным ретроспективным наблюдением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Asher R.A., Morgenstern D.A., Moon L.D., Fawcett J.W. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar // Prog Brain Res. — 2001. — Vol. 132. — P. 611–619.
2. Chernykh E.R., Kafanova M.Yu., Shevela E.Ya., Adonina E.I. et al. Autologous M2-like macrophage applications in children with cerebral palsy // Cell Ther. Transplant. — 2011. — Vol. 3. — P. 12–14.
3. Chernykh E.R., Shevela E.Y., Sakhno L.V., Tikhonova M.A. et al. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? // Cellular Therapy and Transplantation. — 2010. — Vol. 2. — P. 20–23.
4. Domeniconi M., Cao Z., Spencer T., Sivasankaran R. et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth // Neuron. — 2002. — Vol. 35. — P. 283–290.
5. Fitch M.T., Silver J. Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury

leads to increases in putative inhibitory molecules // Exp Neurol. — 1997. — Vol. 148. — P. 587—603.

6. Freire-de-Lima C.G., Xiao Y.Q., Gardai S.J., Bratton D.L. et al. Apoptotic cells, through transforming growth factor- β , coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages // J Biol Chem. — 2006. — Vol. 281. — P. 38376—38384.

7. Golpon H.A., Fadok V.A., Taraseviciene-Stewart L. Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth // The FASEB Journal. — 2004. — Vol. 18. — P. 1716—1718.

8. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity // Nat. Rev. Immunol. — 2005. — Vol. 5. — P. 953—964.

9. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K. et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord // J. Neurosci. — 2009. — Vol. 29. — P. 13435—13444.

10. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // Trends Immunol. — 2004. — Vol. 25. — P. 677—686.

11. McPhail L.T., Stirling D.P., Tetzlaff W., Kwiecien J.M. et al. The contribution of activated phagocytes and myelin degeneration to axonal retraction/dieback following spinal cord injury // Eur. J. Neurosci. — 2004. — Vol. 20. — P. 1984—1994.

12. Mosser D.M. The many faces of macrophage activation // J. Leukocyte Biol. — 2003. — Vol. 73. — P. 209—212.

13. Shechter R., London A., Varol C., Raposo C. et al. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice // PLoS Medicine. — 2009. — Vol. 6. — P. 1—16.

14. Ziv Y., Avidan H., Pluchino S., Martino G. et al. Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — Vol. 103. — P. 13174—13179.

Сведения об авторах

Морозов Сергей Александрович — врач аллерголог-иммунолог отделение иммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, ассистент кафедры клинической иммунологии ГБОУ ВПО НГМУ Росздрава (630000, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6; тел.: +7-913-893-69-70; e-mail: El-gorra@rambler.ru)

Томаш Галина Владимировна — врач-невролог отделения неврологии ГКБ № 1 г. Новосибирска

Шевела Екатерина Яковлевна — старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, кандидат медицинских наук (г. Новосибирск; тел. раб.: 236-03-29; e-mail: shevelak@mail.ru)

Сахно Людмила Васильевна — старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат биологических наук

Смык Анна Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383) 222-06-72; e-mail: anna-v-smyk@mail.ru)

Старостина Наталья Михайловна — заведующая отделением иммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Останин Александр Анатольевич — ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Черных Елена Рэмовна — заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)

Т.А. Мулерова ^{1,2}, С.Н. Филимонов ¹, Ф.А. Лузина ³, А.В. Дорошилова ³, Е.Г. Онищенко ¹,
Г.С. Замятина ³, А.В. Колбаско ¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У КОРЕННОГО И НЕКОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ

¹ Государственный институт усовершенствования врачей (Новокузнецк)

² НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (Кемерово)

³ НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН (Новокузнецк)

Проведено обследование 935 жителей (663 человека — коренное население (тубалары), 272 человека — некоренное население) Турочакского района Республики Алтай с целью выявления у них доли лиц с артериальной гипертензией, оценке факторов риска и генетической предрасположенности к заболеванию по системам крови ABO, Rh, MN, P и Kell. Доля лиц с артериальной гипертензией в Республике Алтай составила 38,6 % среди тубаларов и 40,8 % среди некоренного населения. Повышенные значения индекса Кетле, индекса талия/бедро и окружности талии ассоциированы с риском развития артериальной гипертензии в обеих этнических группах, курение и злоупотребление солью — только у тубаларов. Выявлены этнические различия в распределении групп крови систем резус и MN. В коренной этнической группе отмечен риск развития АГ у обладателей группы крови Rh(-), положительная ассоциативная связь с заболеванием для лиц, имеющих фенотип MN и резистентность у обладателей группы крови Rh(+) и фенотипа NN.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, факторы риска, группы крови, системы ABO, Rh, MN, P и Kell

STUDY OF IMMUNE GENETIC RISK FACTORS OF ARTERIAL HYPERTENSION IN NATIVE AND NON-NATIVE POPULATION OF ALTAI REPUBLIC

T.A. Muleroval ^{1,2}, S.N. Filimonov ¹, F.A. Luzina ³, A.V. Doroshilova ³, E.G. Onishchenko ¹,
G.A. Zamyatina ³, A.V. Kolbasko ¹

¹ State Institute of Physicians' Training, Novokuznetsk

² Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases SB RAMS, Kemerovo

³ Research Institute of Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases, Novokuznetsk

There had been 935 people examined native to Turochaksky district of the Altai Republic (663 — indigenous people (Tubalars) and 272 — non-indigenous population) so as to identify the proportion of population with hypertension, assessment of risk factors and genetic predisposition to the disease according to the blood systems such as ABO, Rh, MN, P and Kell. The proportion of people with hypertension in the Altai Republic was 38.6 % among Tubalars and 40.8 % among non-indigenous population. The high body mass index (BMI) — (Quetelet index) values and index: waist / hip and waist circumference are associated with risk of hypertension for both ethnic groups, but only Tubalars have such risk factors as smoking and salt abuse. There had been revealed some ethnic differences in the distribution for such systems as blood group, Rh factor, and MN. The indigenous ethnic group is marked with a risk of hypertension for the people with Rh(-) blood group, positive associative connection with the disease for those with the phenotype of MN and the resistance for the persons with the blood group Rh(+) and the phenotype of NN.

Key words: hypertension, risk factors, blood groups, erythrocytic (ABO, Rh-Hr, Kell, MN) antigens system

Артериальная гипертензия (АГ) является одной из наиболее важных медицинских и социальных проблем во всем мире [5]. Она является основным фактором риска (ФР) сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротической природы, включая сердечную недостаточность, мозговой инсульт, ИБС, патологию периферических артерий [4]. Эпидемиологические прогнозы в отношении АГ указывают на увеличение распространенности этой патологии. Многие исследования считают, что ключ к решению проблемы АГ необходимо искать на популяционном уровне [2].

АГ представляет собой полигенное заболевание, развитие которого определяется взаимодействием множества генов с разнообразными факторами окружающей среды [6]. Поиск и анализ ассоциаций различных генетических маркеров с заболеваниями дает возможность судить об их участии в развитии болезней [3]. В свою очередь, частота встречаемости подобных ассоциаций указывает на значимость дан-

ного признака в развитии патологического процесса. Такие исследования позволяют выявить среди населения группы лиц с фенотипами повышенного риска к отдельным заболеваниям, что дает возможность разработки системы профилактики [1].

Цель исследования: оценить долю лиц с АГ и её факторы риска среди жителей Республики Алтай с учетом пола, этнической принадлежности и провести анализ генетической предрасположенности к заболеванию по системам крови ABO, Rh, MN, P и Kell.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено клинико-эпидемиологическое обследование населения Республики Алтай (выборка 935 человек, из них 663 человека — тубалары, 272 человека — некоренное население). По полу и возрасту группы статистически значимо не различались ($p > 0,05$). Измерение артериального давления (АД) проводилось ртутным сфигмоманометром после де-

сятиминутного отдыха двукратно на обеих руках по методике ВОЗ (1980) с интервалом в пять минут. Артериальная гипертензия определялась по критериям ВОЗ/МОАГ 1999 г. Обследуемым лицам измеряли рост и массу тела, по которым рассчитывали индекс Кетле (ИК) (отношение массы тела в килограммах к квадрату роста в метрах). Согласно классификации ВОЗ, нормальную массу тела (НМТ) определяли при значениях ИК, не превышающих $24,9 \text{ кг/м}^2$; избыточную массу тела (ИМТ) — от 25 до 29 кг/м^2 ; ожирение — при ИК 30 кг/м^2 и более. Антропометрическое исследование включало также измерение окружности талии (ОТ), окружности бедер и определение индекса распределения жировой ткани — ИТБ. Критерием абдоминального ожирения считалось ОТ выше 94 см у мужчин и свыше 80 см у женщин, ИТБ более $0,9$ у мужчин и более $0,8$ у женщин.

Исследование генетических маркеров проводилось по общепринятым методикам на базе лаборатории популяционной генетики ФГБУ НИИ КПГПЗ СО РАМН г. Новокузнецка. Определены группы крови систем: ABO, «полный» резус, MN, P, Kell. Объем выборки по разным системам составил от 301 до 425 человек.

По качественным показателям рассчитывался удельный вес (процент) вариантов. При оценке статистической значимости различий качественных показателей строились таблицы сопряженности с последующим расчетом критерия χ^2 Пирсона. Статистически значимыми различия признавались при $p < 0,05$. Статистическая обработка проводилась с помощью программы «STATISTICA 6.1».

О силе ассоциации между изучаемыми маркерами и болезнью судили по критерию относительного риска (Wolf, 1955). Относительный риск — релятив риск (OR) показывает, во сколько раз чаще болезнь развивается у лиц с наличием данного генотипа по сравнению с теми, у которых он отсутствует:

$$OR = [fn(I - fk)] / [fk(I - fn)],$$

где fn — фракция носителей генотипа среди больных; fk — фракция носителей генотипа в контрольной группе.

Значение RR более единицы свидетельствует о положительной ассоциативной связи с заболеванием; при $RR \geq 2$ значение его считается статистически значимым (при условии $\chi^2 \geq 3,841$). При $\chi^2 \geq 3,841$ и $RR < 1$ это служит указателем резистентности обладателя данного генотипа к изучаемой патологии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Доля лиц с АГ в целом среди обследованного населения Республики Алтай составила $39,3 \%$. Среди мужчин АГ была выявлена у $37,9 \%$ респондентов, среди женщин у $40,0 \%$. Доля лиц с АГ у тубаларов составила $38,6 \%$, у некоренных жителей — $40,8 \%$ ($p > 0,05$). Среди женщин коренной этнической группы число лиц с АГ выявлено в $39,5 \%$ случаев, среди женщин некоренной национальности — в $41,1 \%$ ($p > 0,05$), среди мужчин: у $37,0$ и $40,2 \%$ соответственно ($p > 0,05$). Это согласуется с данными С.А. Шальной с соавторами (2001 г.), которые установили, что распространенность АГ в сельской

местности в России составляет $41,6 \%$ у мужчин и $42,4 \%$ у женщин.

НМТ чаще встречалась среди коренного населения по сравнению с некоренным — $44,5 \%$ и $34,2 \%$ соответственно ($p < 0,05$), тогда как ожирение преобладало среди последних — $33,8 \%$ против $22,0 \%$ у тубаларов ($p < 0,001$). Статистически значимых различий по ИМТ среди двух национальностей выявлено не было: она выявлена у $30,8 \%$ тубаларов и $31,3 \%$ лиц некоренного населения ($p > 0,05$). Выявлена прямая взаимосвязь между частотой АГ и величиной ИК. Так, у тубаларов число лиц с АГ при НМТ составило $26,2 \%$, при ИМТ — $38,7 \%$ ($p < 0,05$), а при наличии ожирения — $65,1 \%$ ($p < 0,001$). У некоренного населения эти показатели составили $11,6 \%$, $40,0 \%$ и $71,7 \%$, соответственно ($p < 0,001$). При оценке ИТБ было установлено, что у женщин независимо от национальности данный показатель превышал норму: у тубаларов — $0,856 \pm 0,003$, у некоренных представительниц — $0,865 \pm 0,004$ ($p > 0,05$). Среди мужчин вне зависимости от этнической группы ИТБ не превышал допустимых норм: у тубаларов — $0,880 \pm 0,004$, у некоренных представителей — $0,892 \pm 0,006$ ($p > 0,05$). Среднее значение ОТ в популяции тубаларов составило $86,3 \pm 0,5 \text{ см}$, а в популяции некоренных жителей — $89,7 \pm 0,8 \text{ см}$ ($p < 0,001$). В обеих этнических группах число лиц с АГ статистически значимо увеличивалось при повышении показателей ОТ и ИТБ. Среди тубаларов при нормальной величине ОТ доля лиц с АГ составила $30,0 \%$, при повышенной — $47,8 \%$ ($p < 0,001$); при нормальном значении ИТБ — $30,0 \%$, при повышенном — $42,6 \%$ ($p < 0,05$). Среди некоренных жителей эти показатели составили — $28,6 \%$ и $50,3 \%$ ($p < 0,001$), а также $23,1$ и $46,4 \%$ соответственно ($p < 0,001$).

Среди женщин коренной популяции доля курящих составила $35,6 \%$, среди представительниц некоренной национальности — $27,8 \%$ ($p > 0,05$), среди мужчин: $66,1 \%$ и $62,0 \%$ соответственно ($p > 0,05$). Вместе с тем, фактор курения оказался ассоциированным с частотой АГ среди мужчин коренной этнической группы. При наличии курения доля лиц с АГ составила $46,7 \%$, в то время как у некурящих она оказалась значительно ниже — $18,0 \%$ ($p < 0,001$). Среди женщин коренной национальности эти показатели составили: $39,0$ и $39,8 \%$ соответственно ($p > 0,05$). В популяции некоренных жителей фактор курения достоверно не связан с частотой АГ: среди женщин доля лиц с АГ среди курящих и некурящих составила $36,0$ и $43,1 \%$ ($p > 0,05$), среди мужчин $35,1$ и $48,6 \%$ соответственно ($p > 0,05$).

У женщин коренной популяции доля злоупотребляющих солью составила $59,4 \%$, у некоренной популяции — $58,9 \%$ ($p > 0,05$). Мужчины-тубалары по сравнению с мужчинами некоренной национальности досаливают пищу чаще — $64,4$ и $51,1 \%$ соответственно ($p < 0,05$). Фактор досаливания пищи оказался ассоциированным с частотой АГ среди женщин коренной этнической группы. У них доля лиц с данной патологией среди злоупотребля-

ющих солью составила 44,0 %, среди не злоупотребляющих — 33,0 % ($p < 0,05$). У мужчин-тубаларов значимых различий по числу больных АГ среди лиц досаливающих и не досаливающих пищу выявлено не было — 39,2 и 32,9 % соответственно ($p > 0,05$). В популяции некоренных жителей фактор досаливания пищи не связан с частотой АГ ни у женщин, ни у мужчин: 46,2 и 33,8 % ($p > 0,05$), 48,9 и 31,1 % соответственно ($p > 0,05$).

При анализе распределения групп крови системы АВО статистически значимых различий среди тубаларов и некоренных жителей Республики Алтай выявлено не было ($p > 0,05$) (табл. 1). Анализ распределения резус-антигена d между коренной и некоренной этническими группами выявил среди первых статистически значимую меньшую долю лиц с Rh(-): 5,4 и 12,6 % соответственно ($p < 0,05$). Выявлены различия в распределении фенотипов системы полного резуса между тубаларами и некоренными жителями. Фенотипы ccDee, CcDee, ccDEe, Ccddee среди некоренной этнической группы статистически значимо встречались чаще, чем среди коренной: фенотип ccDee — 5,5 и 1,7 % ($p < 0,05$), фенотип CcDee — 33,3 и 20,7 %, фенотип ccDEe — 11,5 и 5,4 %, фенотип Ccddee — 3,8 и 0,4 % соответственно ($p < 0,05$). Напротив, фенотипы CCDee и CcDEe среди тубаларов отмечались чаще, чем среди некоренного населения — 38,0 и 20,1 % ($p < 0,001$), 21,9 и 11,5 % соответственно ($p < 0,05$). Оценка распределения фенотипов системы MN выявила преобладание фенотипа MM среди тубаларов (64,5 %), по сравнению с некоренными жителями — 43,7 % ($p < 0,001$). Фенотипы MN и NN статистически значимо чаще встречались среди представителей некоренной этнической группы по сравнению с коренной: 40,4 % и 28,5 %; 15,9 % и 7,0 %, соответственно ($p < 0,05$). При анализе распределения антигенов системы P и Kell среди коренного и некоренного населения статистически значимых различий выявлено не было. Фенотип P(+) среди тубаларов составил 58,7 %, среди некоренных представителей — 59,0 % ($p > 0,05$), фенотип Kell(+) — 5,0 и 5,6 % соответственно.

Таблица 1
Распределение коренных и некоренных жителей по системе АВО

ABO	Тубалары n = 242		Некоренное население n = 183		p
	абс.	%	абс.	%	
O(I)	95	39,3	65	35,5	0,431
A(II)	71	29,3	65	35,5	0,176
B(III)	64	26,4	39	21,3	0,221
AB(IV)	12	5,0	14	7,7	0,252

Распределение генетических маркеров в обеих этнических группах среди здоровых и больных АГ по системе АВО статистически значимо не различается. Среди тубаларов O(I) группа крови встречалась у 40,2 % больных респондентов и

38,6 % здоровых, A(II) — у 30,4 и 28,6 %, B(III) — у 25,5 и 27,1 %, AB(IV) — у 3,9 и 5,7 % соответственно ($p > 0,05$). Среди некоренных представителей фенотипы этой системы распределились следующим образом: O(I) — у 33,7 и 37,4 %, A(II) — у 32,6 и 38,4 %, B(III) — у 25,0 и 17,6 %, AB(IV) — у 8,7 и 6,6 % соответственно ($p > 0,05$).

Анализ распределения резус-антигена d между здоровыми и больными лицами обеих этнических групп также не выявил статистически значимых различий: среди тубаларов доля лиц с данным антигеном составила 7,8 % у больных АГ и 3,6 % у здоровых, среди некоренного населения — 14,1 и 11,0 % соответственно ($p > 0,05$). У тубаларов выявлен достаточно высокий риск ($RR = 2,14$) развития АГ у обладателей группы крови Rh(-) и резистентность к заболеванию ($RR = 0,47$) у обладателей группы крови Rh(+), однако χ^2 оказался равен лишь 2,12. У некоренных представителей резус антиген не связан с риском развития заболевания АГ.

В коренной этнической группе выявлены различия в распределении комбинации антигенов системы резус между здоровыми и больными. Положительная ассоциативная связь с АГ отмечена среди лиц, имеющих фенотип CcDEe, т.к. он статистически значимо преобладал среди больных (28,4 %) по сравнению со здоровыми — 17,2 % ($p < 0,05$, $RR = 1,92$), резистентность к заболеванию установлена для лиц с фенотипом ccDEE, (7,9 % среди здоровых, 1,9 % среди больных АГ ($p < 0,05$, $RR = 0,23$)). Достаточно высокий риск ($RR = 2,34$) развития АГ выявлен у лиц с фенотипом ccddee и резистентность к заболеванию ($RR = 0,66$) у лиц с фенотипом CCDee, однако χ^2 оказался равен лишь 2,18 и 2,40, соответственно. Среди лиц некоренной национальности различий в распределении фенотипов системы полного резуса между здоровыми и больными АГ выявлено не было ($p > 0,05$) (табл. 2).

При оценке распределения фенотипов системы MN среди больных и здоровых тубаларов выявлены статистически значимые различия: положительная ассоциативная связь с АГ отмечена среди лиц, имеющих фенотип MN (данный фенотип выявлен у 35,3 % больных и 23,6 % здоровых ($p < 0,05$, $RR = 1,78$)), фенотип NN ассоциирован с резистентностью к развитию заболевания (данный фенотип обнаружен у 2,9 % больных и 10,0 % здоровых ($p < 0,05$, $RR = 0,27$)). Среди лиц некоренной национальности статистически значимых различий по системе MN между больными АГ и здоровыми выявлено не было.

При анализе распределения антигенов системы P и Kell среди здоровых и больных АГ лиц статистически значимых различий выявлено не было как у тубаларов, так и у некоренных представителей. Среди тубаларов доля лиц с фенотипом P(+) составила 59,4 % у больных респондентов и 58,1 % у здоровых ($p > 0,05$, $\chi^2 = 0,04$, $RR = 1,1$), среди некоренных представителей — 58,7 и 59,3 %, соответственно ($p > 0,05$, $\chi^2 = 0,01$, $RR = 0,93$), с фенотипом Kell(+) — 4,1 и 5,8 % ($p > 0,05$, $\chi^2 = 0,24$, $RR = 0,65$), 4,3 и 6,9 %, соответственно ($p > 0,05$, $\chi^2 = 0,47$, $RR = 0,54$).

Таблица 2

Распределение больных и здоровых лиц обеих этнических групп по фенотипам системы резус (%)

Фенотипы	Тубалары (n = 242)				Некоренное население (n = 183)			
	здоровые	больные АГ	χ^2	RR	здоровые	больные АГ	χ^2	RR
ccddee	2,9	6,9	2,18	2,34	8,8	8,7	0,001	0,93
ccDee	1,4	1,9	0,10	1,41	5,5	5,4	0,000	1,03
CcDee	20,0	21,6	0,09	1,12	36,2	30,4	0,70	0,77
CCDee	42,1	32,4	2,40	0,66	20,9	19,6	0,05	0,91
CcDEe	17,2*	28,4	4,40	1,92	11,0	11,9	0,04	0,97
ccDEe	6,4	3,8	0,73	0,59	12,1	10,9	0,07	0,87
ccDEE	7,9*	1,9	4,04	0,23	2,2	4,4	0,67	2,22
CCDEE	0,0	1,0	1,38	0,00	0,0	1,1	0,10	0,00
CCDEe	0,7	1,0	0,51	1,42	0,0	1,1	0,10	0,00
CcDEE	0,7	0,0	0,73	0,00	1,1	1,1	1,00	0,90
ccddEe	0,7	0,0	0,73	0,00	—	—	—	—
CcddEe	0,0	1,0	1,38	0,00	2,2	5,4	1,30	0,25

Примечание: * — $p < 0,05$ — достоверность различий между здоровыми и больными АГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доля больных АГ в Республике Алтай не отличалась от среднероссийских показателей (37,9 % среди мужчин, 40,0 % среди женщин).

Повышенные значения индекса Кетле, ИТБ и ОТ ассоциированы с риском развития АГ в обеих этнических группах, курение и злоупотребление солью — только у тубаларов.

Выявлены этнические различия в распределении групп крови систем резус и MN: доля лиц с группой крови Rh(-) меньше среди тубаларов (5,4 %) по сравнению с некоренными представителями (12,6 %), фенотипы MN и NN преобладали среди лиц некоренной национальности (40,4 % против 28,5 и 15,9 % против 7,0 % соответственно), а фенотип MM среди коренной (64,5 % против 43,7 %).

В коренной этнической группе отмечен риск развития АГ у обладателей группы крови Rh(-), положительная ассоциативная связь с заболеванием для лиц, имеющих фенотип MN и резистентность у обладателей группы крови Rh(+) и фенотипа NN.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артамонова Г.В., Шаталова В.Н. Профессиональные болезни. — М., 1996. — 431 с.
2. Бриттов А.Н. Профилактика артериальной гипертензии на популяционном уровне: возможности и актуальные задачи // Рос. мед. журн. — 1997. — Т. 5, № 9. — С. 571—576.
3. Дранник Г.Н., Дизик Г.М. Генетические системы крови человека и болезни. — Киев, 1990. — 197 с.
4. Жуковский Г.С., Константинов В.В., Варламова Т.А. Артериальная гипертензия: эпидемиологическая ситуация в России и других странах // Рус. мед. журнал. — 1997. — № 9. — С. 551—558.
5. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Смертность от сердечно-сосудистых и других хронических неинфекционных заболеваний среди трудоспособного населения России // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2002. — № 3. — С. 4—8.
6. Agarwal A., Williams G.H., Fisher N.D. Genetics of human hypertension // Trends Endocrinol Metab. — 2005. — Vol. 16. — P. 127—133.

Сведения об авторах

Мулера Татьяна Александровна — ассистент кафедры кардиологии ГБОУ ДПО НГИУВ Минздравсоцразвития России, г. Новокузнецк, младший научный сотрудник НИИ КПССЗ СО РАМН, лаборатории эпидемиологии ССЗ, г. Кемерово (654005, г. Новокузнецк, ул. Строителей, 5; тел. раб.: 8 (3843) 454-873, 8 (3843) 453-702; e-mail: Mulerova-77@mail.ru)

Филимонов Сергей Николаевич — проректор по учебной работе ГБОУ ДПО НГИУВ Минздравсоцразвития России, доктор медицинских наук, профессор (654005, г. Новокузнецк, ул. Строителей, 5; тел. раб.: 8 (3843) 454-873, 8 (3843) 453-702; e-mail: fsn42@mail.ru)

Лузина Фаина Анисимовна — ведущий научный сотрудник лаборатории популяционной генетики человека ФГБУ НИИ КПГПЗ СО РАМН, кандидат биологических наук (654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23; тел. раб.: 8 (3843) 796-605; e-mail: Luzina45@mail.ru)

Дорошилова Анастасия Владимировна — врач-кибернетик клиники ФГБУ НИИ КПГПЗ СО РАМН (654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23; тел. раб.: 8 (3843) 796-605; e-mail: Luzina45@mail.ru)

Онищенко Елена Григорьевна — заведующая кардиодиспансером, МЛПУ ГКБ № 1, г. Новокузнецк, кандидат медицинских наук (654057, г. Новокузнецк, ул. Бардина, 28; тел. раб.: 8 (3843) 796-667; e-mail: onishchenko63@mail.ru)

Замятина Галина Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории популяционной генетики человека ФГБУ НИИ КПГПЗ СО РАМН (654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23; тел. раб.: 8 (3843) 796-605; e-mail: Luzina45@mail.ru)

Колбаско Анатолий Владимирович — ректор ГБОУ ДПО НГИУВ Минздравсоцразвития России, г. Новокузнецк, доктор медицинских наук, профессор (654005, г. Новокузнецк, ул. Строителей, 5; тел. раб.: 8 (3843) 454-873, 8 (3843) 453-702; e-mail: postmastergiduv@rambler.ru)

Е.А. Орлова

**РОС-АНАЛИЗ НЕЙРОИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПСИХОГЕННОЙ КРАПИВНИЦЕЙ**

Пензенский институт усовершенствования врачей (Пенза)

Психологический стресс связан с повышенным уровнем субстанции P, посредством которой может осуществляться взаимосвязь психосоматического нейроиммунологического компонентов при хронической крапивнице. В работе применены современные методы статистической обработки полученных результатов. При проведении ROC-анализа определены нейроиммунологические критерии психогенной крапивницы. Показана роль субстанции P в патогенезе заболевания, подтверждена взаимосвязь уровня субстанции P и активности ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и проведена оценка степени тревожных расстройств.

Ключевые слова: ROC-анализ, крапивница, субстанция P

**ROC-ANALYSIS OF NEUROIMMUNOLOGIC INDICES
IN PATIENTS WITH CHRONIC PSYCHOGENIC URTICARIA**

E.A. Orlova

State Institute of Physicians Training, Penza

Psychological stress connects with increased level of substance P, wherewith there may be interconnection between psychosomatic component and neuroimmunologic one in the chronic urticaria. Modern methods of findings statistical manipulation have been used in this work. Neuroimmunologic criteria of psychogenic urticaria were defined by the use of ROC-analysis. Substance P role in the pathogenesis of the disease have been indicated, correlation between substance P level and angiotensin converting enzyme (ACE) activity have been corroborated. Assessment of anxiety disorders level have been carried out.

Key words: ROC-analysis, urticaria, substance P

Между нервной и иммунной системами существуют множественные связи, осуществляющиеся посредством нейротрансмиттеров. Нейромедиаторы, высвобождаясь из нервных окончаний, взаимодействуют с клетками иммунной системы, оказывая иммуномодулирующее влияние [1]. Стимулирующий эффект выражается в усилении продукции цитокинов, тем самым генерируя и поддерживая воспалительный процесс, называемый нейрогенным. Исследования последнего времени представляют большую информацию об участии вещества P (SP) в патологических процессах различного характера. В первую очередь, следует говорить о SP как о медиаторе процессов, связанных с центральной нервной системой. SP — медиатор сенсорной информации. Интерес представляют работы, свидетельствующие о регуляторной роли SP в патогенезе хронической крапивницы (ХК) [5—8]. Показано, что активация корковых областей вследствие стресса приводит к изменению производства SP надпочечниками и нисходящими вегетативными С-волокнами. АПФ рассматривается как один из основных ферментов катаболизма SP [3, 4]. Проведя анализ литературных данных, мы столкнулись с отсутствием нормативных показателей концентрации SP в сыворотке крови и отсутствием четких критериев диагностики психогенной формы крапивницы. Таким образом, изучение роли SP в патогенезе хронической стресс-индуцированной крапивницы в настоящее время — одно из перспективных направлений современной аллергологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование и лечение 90 больных с хронической психогенной крапивницей (ХПК) на базе аллергологического отделения ГБУЗ ПГКБ № 4 и кафедры аллергологии и иммунологии ГБОУ ДПО ПИУВ Минздравсоцразвития России г. Пензы. Диагноз крапивница и степень тяжести устанавливался на основании соответствующих критериев, изложенных в национальном согласительном документе «Крапивница и ангиоотек» 2007 г. [2]. При поступлении в аллергологическое отделение пациентам для выявления причины и патогенетического механизма заболевания проводили сбор жалоб, аллергологического анамнеза, оценку клинических симптомов, определение степени тяжести крапивницы. С целью дифференциальной диагностики с другими формами крапивницы всем больным проводилось полное аллерго-иммунологическое обследование и консультации различных специалистов. Все больные проходили тестирование с целью определения уровня тревожных расстройств по 9-бальной шкале и связи данного кожного заболевания с психогенными факторами (использована «Короткая шкала для определения тревоги» Д. Гольдберга, 1987 г.). Специальное обследование включало определение уровня SP в сыворотке крови методом ИФА коммерческими наборами Bachem. Активность АПФ определяли по образованию Gly-Arg из карбобензокси-Gly-Gly-Arg при pH = 8,2, как активность, ингибируемую каптоприлом [3]. В качестве величин сравнения

использовали данные, полученные при обследовании контрольных групп: практически здоровых доноров (19 человек) и 20 больных хронической аутоиммунной крапивницей (ХАК). Диагноз ХПК выставлен пациентам, имеющим в анамнезе связь заболевания со стрессорными факторами, по данным анкетирования наличие высокого уровня тревожных симптомов и отсутствие других возможных этиопатогенетических причин. Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате нашего исследования была установлена роль SP в патогенезе ХПК, что подтверждается статистическими достоверными различиями обследуемых групп по содержанию SP в сыворотке крови. Проведенное сравнение групп больных с диагнозами ХАК и ХПК и группы здоровых людей по уровню SP до лечения показало, что в группе с ХПК уровень SP значительно превышает значения данного показателя в других группах (рис. 1).

В группе больных с диагнозом ХАК уровень SP до лечения колебался в пределах от 0,00 до 0,10 нг/мл, в группе здоровых людей — от 0,00 до 0,30 нг/мл, в то время, как в группе с ХПК данный показатель колебался в пределах от 0,004 до 25,00 нг/мл. Среднее значение уровня SP до лечения в группе с диагнозом ХАК составило 0,006 нг/мл, в группе здоровых людей — 0,026 нг/мл, в группе с ХПК — 8,75 нг/мл; медиана 0,00 нг/мл для группы с ХАК и здоровых и 3,20 нг/мл для группы с ХПК.

Выявленные различия между группами по уровню SP до лечения являются статистически значимыми (тест Mann — Whitney, $p = 0,0000$).

У всех пациентов с ХПК возникновение или обострение последней было субъективно связано с наличием психотравмирующей ситуации. Сравнение групп по степени тревожных расстройств также выявил достоверные различия между группами с ХАК и ХПК (тест Mann — Whitney, $p = 0,0000$). Среднее значение данного показателя в группе с ХАК составило 2,55 баллов, медиана — 2,5 баллов; среднее в группе с ХПК — 6,04 баллов, медиана — 6 баллов (рис. 2).

Таким образом, анализ полученных данных выявил значительное повышение уровня субстанции Р ($p = 0,0000$) и степени тревожных расстройств ($p = 0,0000$) в группе с ХПК по сравнению с больными ХАК.

Проведенное сравнение групп с ХПК и здоровых людей по активности фермента АПФ показало, что в группе с ХПК уровень АПФ колебался от 11,4 до 62,9 нмоль/мг белка, в группе здоровых — от 18,8 до 27,1 нмоль/мг белка. Среднее значение данного показателя в группе с ХПК составило 37,2 нмоль/мг белка, в группе здоровых — 22,3 нмоль/мг белка; медиана — 36,9 и 22,3 нмоль/мг белка соответственно. Различие данных групп по уровню АПФ статистически достоверно (тест Mann — Whitney, $p = 0,0028$). Таким образом, в группе с ХПК наблюдалось повышение активности АПФ по сравнению со здоровыми людьми. Это подтверждает сведения, что данный фермент обуславливает деградацию SP.

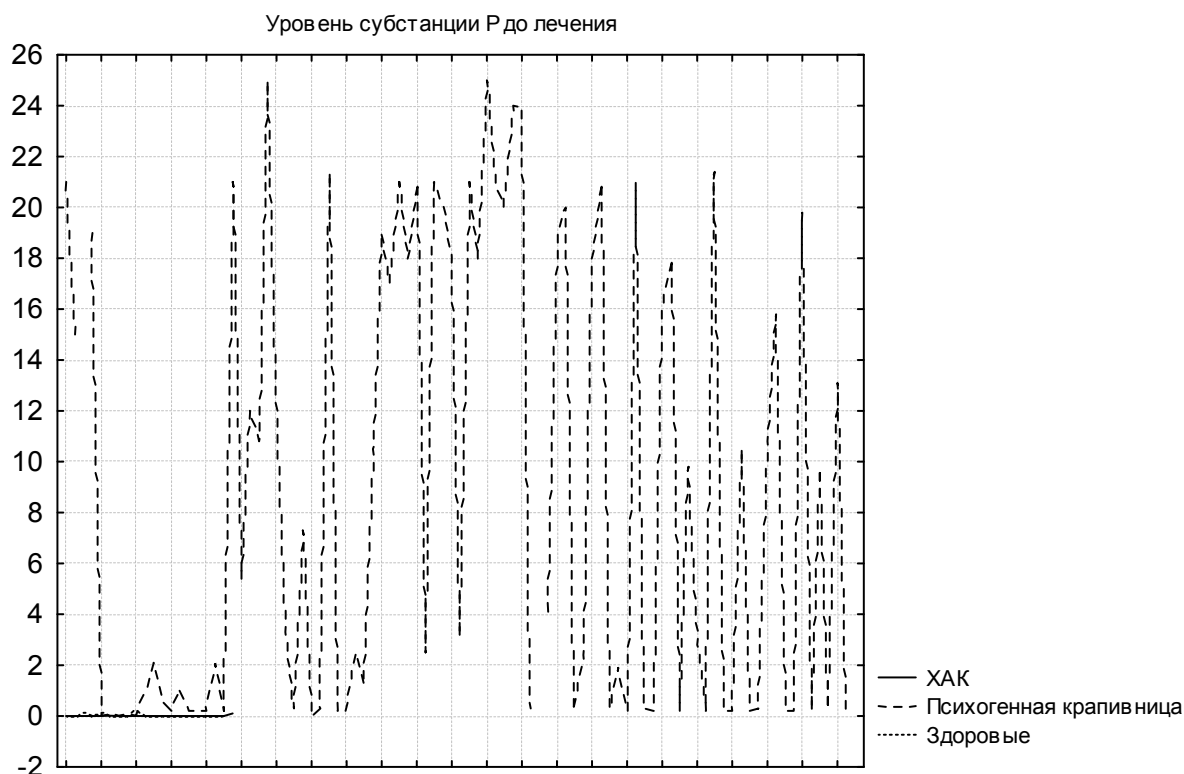


Рис. 1. Уровень субстанции Р по группам пациентов.

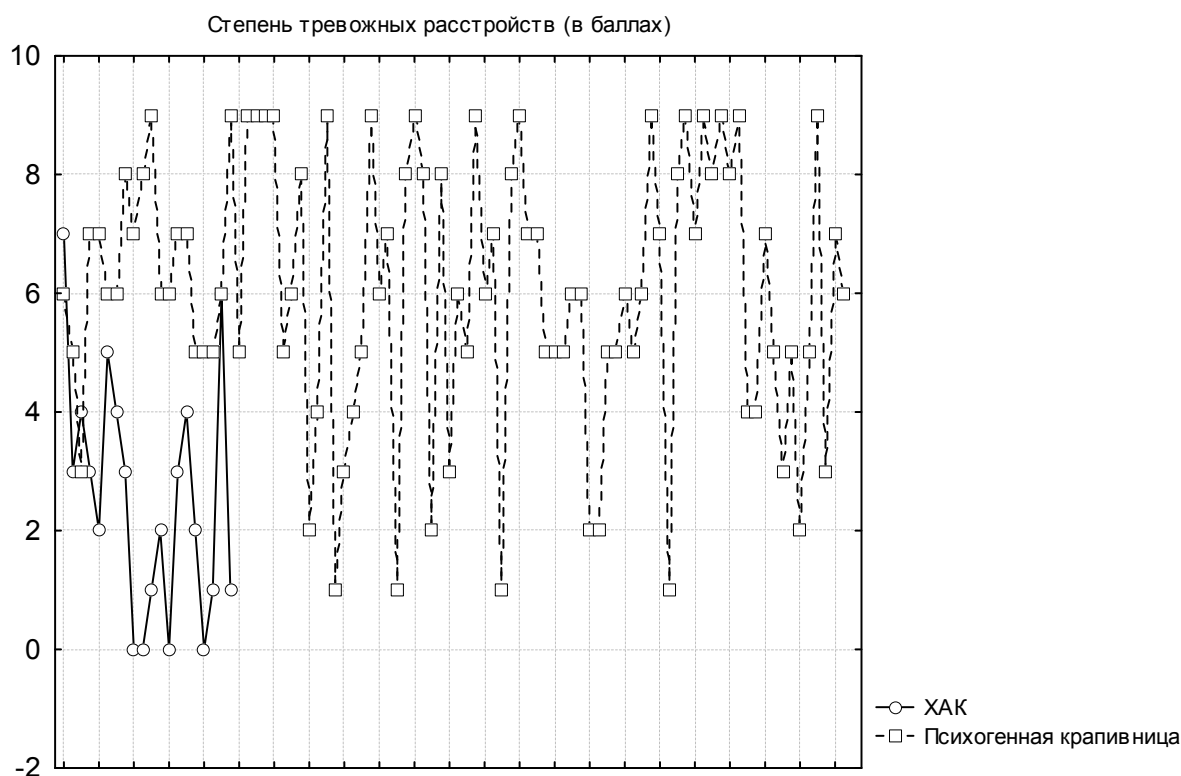


Рис. 2. Диаграмма распределения степени тревожных расстройств.

В настоящее время существует настоятельная необходимость в применении методических подходов, позволяющих количественно оценивать чувствительность и специфичность тестов для диагностики заболевания. В связи с этим был проведен ROC-анализ наиболее показательных факторов (SP, степень тревожных расстройств). Данный анализ позволяет определить пороговое значение интервальной переменной-предиктора с заданным уровнем чувствительности и специфичности теста. Как известно, чувствительность отражает долю положительных результатов, полученных с помощью теста у пациентов, которые имеют заболевание. В свою очередь, специфичность показывает процент отрицательных результатов теста у пациентов, которые не больны. Таким образом, если чувствительность и специфичность теста равны 100 %, то проблем с интерпретацией теста нет, но фактически ни один тест не является совершенным, поэтому появляется необходимость выбрать такое сочетание чувствительности и специфичности для каждого теста, чтобы в общей сумме они дали наиболее точный результат. Первоначально был проведен многофакторный анализ, который показал наиболее сильную связь диагноза ХПК с уровнем SP, в связи с чем, ROC-анализ был проведен в первую очередь для этой переменной.

Проведенный анализ данных показал, что распределение уровня SP до лечения в группе больных с ХАК полностью включается в интервал значений данного показателя в группе с ХПК, в связи с чем, целью ROC-анализа стало определение порогово-

го значения уровня SP до лечения, выше которых располагаются значения, характерные только для группы с ХПК.

На рисунке 3 изображены ROC-кривые для параметров «уровень субстанции P» и «степень тревожных расстройств».

Как видно из рисунка 3, ROC-кривая для уровня SP не проходит через верхний левый угол, но находится достаточно близко к идеальной форме, что позволяет построить достаточно качественный классификатор диагноза по уровню SP с достаточно высокой чувствительностью и специфичностью.

Координаты ROC-кривых представляют собой значение анализируемого параметра и уровень чувствительности и специфичности теста. Если исходить из требований максимальной чувствительности и специфичности теста ($\max(\text{Sensitivity} + \text{Specificity}) = 1,932$), пороговым значением уровня SP до лечения следует признать 0,15 нг/мл. При этом чувствительность теста равна 93 %, его специфичность — 100 %. Исходя из требований баланса чувствительности и специфичности ($\min(\text{Sensitivity-Specificity}) = 0,005$), пороговым значением следует признать 0,02 нг/мл. В этом случае чувствительность и специфичность теста составит около 95 %. В данном случае, следует исходить из требований минимальной специфичности теста, поскольку главным при определении SP является недопущение ситуации, когда большая доля наблюдений ХАК могут быть ложноположительными и классифицированы как ХПК (гипердиагностика). Пороговое значение уровня SP, равное 0,02 нг/мл,

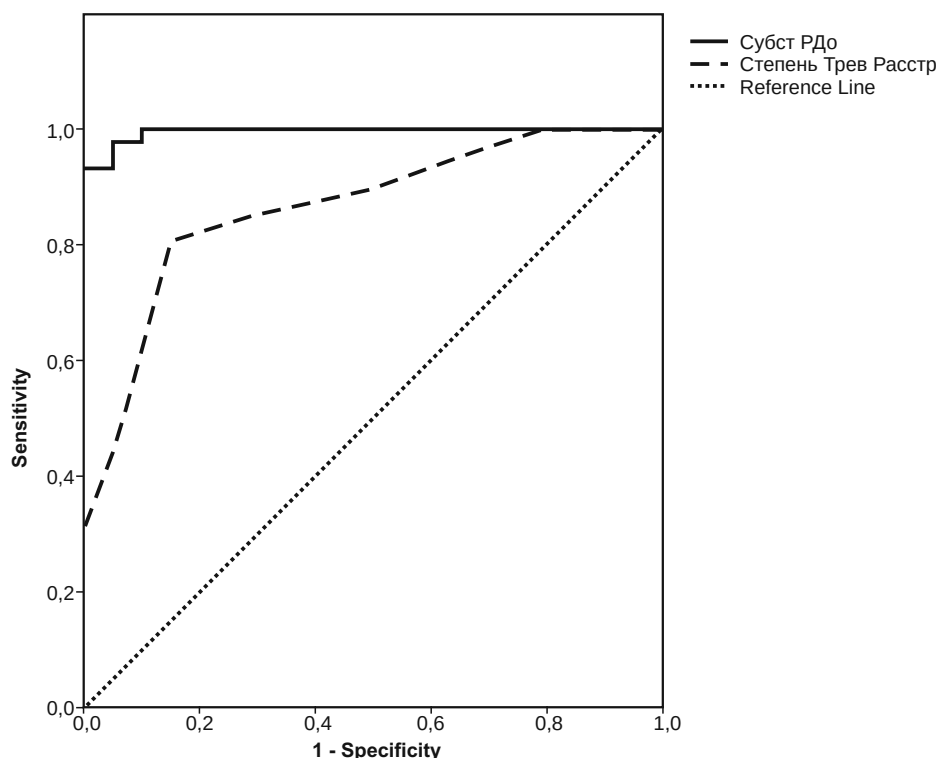


Рис. 3. ROC-кривая для параметров «уровень субстанции Р» и «степень тревожных расстройств» (Прим. Sensitivity – чувствительность, Specificity – специфичность)).

является оптимальным, поскольку специфичность теста будет составлять 95 %, то есть не более 5 % пациентов с ХАК будут классифицированы как ХПК, при этом результат будет положителен с вероятностью 95,5 %.

Таким образом, нами было принято решение, пороговым значением уровня SP до лечения принять 0,02 нг/мл.

ROC-кривая для параметра «степень тревожных расстройств» (рис. 3) также не проходит через верхний левый угол, но имеет достаточную площадь под кривой, что позволяет построить достаточно качественный классификатор диагноза по степени тревожных расстройств с достаточно высокой чувствительностью и специфичностью. Для данного параметра, если исходить из требований максимальной чувствительности и специфичности теста ($\max(\text{Sensitivity} + \text{Specificity}) = 1,65$), пороговым значением следует признать 5 баллов. При этом чувствительность теста равна 80 %, а его специфичность – 85 %. Если исходить из требований баланса чувствительности и специфичности ($\min(\text{Sensitivity} - \text{Specificity}) = 0,05$), то пороговым значением также следует признать 5 баллов. В этом случае чувствительность и специфичность теста составит 80–85 %. Если исходить из требований минимального уровня чувствительности теста (например, не менее 90 %), то пороговым значением будет 3 балла. Однако тогда специфичность теста падает до 50 %, иными словами, 50 % наблюдений ХАК могут быть ложноположительными, то есть, классифицированы как ХПК, что является явной гипердиагностикой. Исходя из минимальной

специфичности теста (например, также не менее 90 %), пороговое значение степени тревожных расстройств будет равным 6 баллов, при этом специфичность теста будет составлять 90 %, то есть не более 10 % пациентов с ХАК будут классифицированы как ХПК, чувствительность при этом составит 61 %.

Таким образом, пороговым значением степени тревожных расстройств следует принять 5 баллов, при этом чувствительность составит 80 %, специфичность 85 %. Тогда, если у пациента ХПК, результат будет положительным с вероятностью 80 %, причем не более 15 % случаев ХАК будут классифицированы, как ХПК.

Заключительным этапом ROC-анализа стало определение чувствительности и специфичности совокупности тестов, то есть случая, когда уровень SP до лечения будет больше 0,02 нг/мл и степень тревожных расстройств будет не меньше 5 баллов. Чувствительность в таком случае составит 76,4 %, специфичность – 80,75 %. Таким образом, в случае, если у пациента уровень SP будет выше 0,02 нг/мл и степень тревожных расстройств составит не менее 5 баллов, психогенная форма может быть классифицирована в 76,4 % случаев.

В результате проведенного ROC-анализа, для проведения дифференциальной диагностики психогенной крапивницы необходимо использовать следующие критерии:

- уровень SP 0,02 нг/мл и выше;
- степень тревожных расстройств 5 баллов и выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применяя современные методы статистической обработки, мы определили диагностические параметры данной формы.

Кроме того, при анализе сопутствующей патологии у больных с психогенной крапивницей выявлено преобладание заболеваний нервной системы. ХПК ассоциирована с вегетососудистой дистонией в 54,4 % случаях.

Наши результаты совпадают с гипотезой, что нейрогенное воспаление играет ключевую роль в патогенезе крапивницы. Анализируя собственные данные, и учитывая то, что SP является нейромедиатором, участвующим в передаче афферентной информации, изменение ее концентрации в сыворотке крови имеет первостепенное значение в развитии ХПК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гомазков О.А. Физиологически активные пептиды: справ. рук. — М., 1995. — 142 с.
2. Крапивница и ангиоотек: Рос. национ. со- глас. док.: рек. для практ. врачей. — М., 2007. — С. 8—9.
3. Орлова Е.А. Активность ферментов обмена нейропептидов при различных формах

крапивницы: дис. ... канд. мед. наук. — М., 2003. — 103 с.

4. Akcali C., Ozkur M., Erbagci Z. Association of insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with angio-oedema accompanying chronic urticaria but not chronic urticaria without angio-oedema or the autologous serum skin test response // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. — 2008. — Vol. 22, N 1. — P. 83—86.
5. Foreman J.C. Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide effect on mast cells and in Human skin // International Archives of Allergy and Applied Immunology. — 1997. — Vol. 82, N 3/4. — P. 366—371.
6. Guilet, Garcia C., Guilet G. Urticare et psychisme: Du constat clinique aux neuropeptides // J. Nat. Soc. Fr. Allergol. et immunol. Clin. — Toulouse, 1998. — P. 23—25.
7. Liezmann C., Klapp B., Peters E.M. Stress, atopy and allergy: A re-evaluation from a psychoneuroimmunologic perspective // Dermatoendocrinol. — 2011. — Vol. 3, N 1. — P. 37—40.
8. Panconesi E., Hautmann G. Psychophysiology of stress in dermatology. The psychobiologic pattern of psychosomatics // Dermatologic clinics. — 1996. — Vol. 14, N 3. — P. 399—421.

Сведения об авторах

Орлова Екатерина Александровна — ассистент кафедры аллергологии и клинической иммунологии ГБОУ дополнительного профессионального образования «Пензенский институт усовершенствования врачей министерства здравоохранения и социального развития», кандидат медицинских наук (440000, г. Пенза, ул. Антонова, д. 16, кв. 267; тел.: (8412) 534592, факс: (8412) 568707; e-mail: lisaorl@yandex.ru)

Л.М. Панасенко ¹, И.В. Ширинский ², Т.В. Карцева ¹, В.С. Ширинский ²

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В ПРОФИЛАКТИКЕ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ КОКЛЮШЕМ

¹ Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

² НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Коклюш представляет актуальную проблему для педиатрии вследствие широкой распространенности и тяжести у детей первого года жизни. Одним из наиболее частых осложнений являются пневмонии. В сравнительном нерандомизированном открытом исследовании обоснована и доказана лечебная эффективность и безопасность применения у детей больных коклюшем иммуномодулирующих препаратов с целью профилактики бактериальных осложнений.

Ключевые слова: дети, коклюш, осложнения, профилактика

EFFICACY AND SAFETY OF IMMUNOMODULATORS APPLICATION IN PREVENTION OF COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH PERTUSSIS

L.M. Panasenکو ¹, I.V. Shirinskiy ², T.V. Kartseva ¹, V.S. Shirinskiy ²

¹ State Medical University, Novosibirsk

² Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

Pertussis is an urgent pediatric problem due to its frequency and severity in the first year of life. One of the most threatening complications of pertussis is pneumonia. In a parallel, non-randomized open-label study we have demonstrated clinical efficacy and safety of immunomodulators for the prophylaxis of bacterial complications of pertussis.

Key words: infants, pertussis, complication, immunomodulators

Одним из главных звеньев патогенеза коклюша (К) является изменение функции иммунной системы, что определяет клинические варианты течения болезни, их тяжесть, развитие вторичных инфекций [2, 5, 11]. Самым частым осложнением при данной инфекции являются пневмонии, частота развития которых варьирует от 6 до 76 % [8, 11]. Изучение показателей иммунного статуса в динамике болезни указывают на недостаточность гуморальных механизмов защиты.

Целью работы явилась оценка клинико-иммунологической эффективности и безопасности различных схем иммуномодулирующей терапии (ИМТ) и их целесообразности для профилактики бактериальных осложнений при К.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования — сравнительное нерандомизированное открытое исследование.

В исследование было включено 154 пациента с основным диагнозом «коклюш» в возрасте до 1 года (I группа) и от года до 14 лет (II группа). Использовались следующие препараты: бактериальные лизаты основных возбудителей инфекций верхних дыхательных путей — ИРС-19 (Abbott, Франция) в виде аэрозоля для интраназального введения и бронхо-мунал (Лек, Словения) для приема внутрь; нуклеинат натрия и комбинация нуклеината натрия и ИРС-19 по следующим схемам:

1) 38 детей (18 больных I группы и 20 — II) получали стандартную терапию К + ИРС-19 по 1 ингаляции в каждый носовой ход 3 раза в день в течение 2 недель;

2) 28 детей (II группы) бронхо-мунал принимали утром по 1 капсуле (3,5 и 7 мг в зависимости от возраста) до еды в течение 10 дней;

3) 48 детей (20 больных I группы и 28 — II) получали нуклеинат натрия в возрастной дозировке 3 раза в день после еды в течение 2 недель;

4) 40 детей (20 больных I группы и 20 — II) получали нуклеинат натрия в возрастной дозировке 3 раза в день после еды и ИРС-19 по 1 ингаляции в каждый носовой ход 3 раза в день в течение 2 недель.

При решении вопроса о времени включения ИМТ в терапию К мы руководствовались следующими положениями: учитывая, что иммунная дисфункция развивается уже в начале спастического кашля, то иммуномодуляторы следует назначать с самого начала лечения.

Критерии включения и исключения

Критериями включения в исследование являлись:

1) достоверный диагноз К;
2) письменное информированное согласие родителей.

Критериями исключения были:

1) бронхиальная обструкция «некоклюшной» этиологии;
2) аллергические заболевания.

Конечные точки

Первичная конечная точка — благоприятное течение инфекции — полное отсутствие клинических признаков пневмонии или бронхита и регрессирование проявлений К после окончания ИМТ.

Вторичная конечная точка — содержание, функциональные свойства иммунокомпетентных клеток, цитокинов.

Оценка до начала лечения

Проводился сбор анамнестических данных, клиническое обследование больного. Лабораторное исследование включало анализ крови с подсчетом форменных элементов, СОЭ, иммунологическое обследование. Инструментальные методы обследования заключались в проведении рентгенографии грудной клетки по показаниям.

Оценка во время и после окончания лечения

Оценка во время лечения состояла из измерения температуры, частоты дыхательных движений; оценки выраженности кашля, отхождения мокроты на 3–4-й день после начала терапии; общий анализ крови и иммунологическое обследование назначались через 2 недели и 1 месяц от начала ИМТ. Отдельным пациентам по показаниям проводилась рентгенография грудной клетки.

Контрольная группа представлена 40 больными К (20 детей первого года жизни и 20 детей 5–14 лет), сопоставимыми по полу, возрасту и степени тяжести инфекции. Вторая группа (для пациентов, получающих бронхо-мунал) состояла из 28 больных К 5–14 лет, сопоставимых по перечисленным критериям. Пациенты контрольных групп получали традиционную терапию К.

Оценка результатов лечения проводилась в соответствии с рекомендациями [1] и включала определение относительного риска (СОР), шансы и отношение шансов (ОШ) и число больных, которых нужно пролечить для того, чтобы зарегистрировать клинический эффект (ЧБНЛ). Оценка содержания Т- и В-лимфоцитов, цитокинов периферической крови описана нами ранее

[9,10]. Достоверность различий между группами оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Базовые параметры обследуемых представлены в табл. 1.

1. Клинико-иммунологическая эффективность и безопасность препарата ИРС-19

Включение в терапию ИРС-19 влияния на клинику К не оказывало, не было побочных реакций, потребовавших отмены препарата.

Профилактический эффект ИРС-19 проявился в снижении частоты развития осложнений в исследуемой группе: у двух детей коклюш осложнился пневмонией (у одного пациента I группы и одного – II), в то время как в контрольной пневмонии развились у 8 детей (у 7 детей первого года жизни и 1 ребенка старшего возраста).

В табл. 2 представлены статистические показатели клинической эффективности профилактического применения ИРС-19 у больных К.

Как видно из таблицы, снижение относительного риска (СОР) – отношение между снижением риска в группе получивших ИРС-19 и группой сравнения составляет 75 %, что всегда соответствует клинически значимому эффекту (более 50 %). ЧБНЛ, равное 6,7, означает, что надо использовать ИРС-19 с профилактической целью у 7 больных коклюшем, чтобы предотвратить развитие бактериальных осложнений у одного пациента. Низкие значения отношения шансов (ОШ) подтверждали эффективность превентивной терапии, поскольку

Таблица 1

Базовые характеристики пациентов

Препарат (количество больных)	Возраст (мес., лет)	Пол (м/ж)	Длительность приема ИМТ
ИРС-19			
I группа (18)	5,8 ± 2,0	8/10	12,0 ± 2,0
II группа (20)	9,7 ± 0,8	9/11	13,4 ± 0,6
Нуклеинат натрия			
I группа (20)	4,1 ± 1,5	8/12	12,4 ± 1,6
II группа (28)	9,2 ± 1,3	12/16	13,5 ± 0,5
Нуклеинат натрия + ИРС-19			
I группа (20)	5,1 ± 2,0	8/12	12,6 ± 1,2
II группа (20)	9,0 ± 1,0	14/13	13,0 ± 1,0
1-я контр. группа:			
I подгруппа (20)	4,7 ± 1,4	9/11	–
II подгруппа (20)	8,2 ± 0,8	10/10	–
Бронхо-мунал			
I группа	–	–	–
II группа (28)	9,3 ± 1,0	15/13	9,4 ± 0,6
2-я контр. группа: II подгруппа (28), для пациентов, получающих бронхо-мунал	9,1 ± 0,6	12/16	–

Примечание: возраст пациентов I группы исчислялся в месяцах, II группы – в годах; в скобках обозначено количество пациентов (n).

Таблица 2

Статистические показатели клинической эффективности профилактического применения ИРС-19 у больных К

Показатель	Группа лечения	Контрольная группа
Размер группы, n	38	40
Число осложнений, n	2	8
Риск осложнений	0,05 (a)	0,2 (b)
Относительный риск: a/b	0,25 (c)	
Снижение относительного риска: (b – a)/b	0,75 (d) = 75 %	
Снижение абсолютного риска: b – a	0,15 (e)	
ЧБНЛ: 1/e	6,7	
Шанс	0,05 (f)	0,25 (g)
Отношение шансов: f/g	0,2 (0,04–1,0)	

границы 95% доверительного интервала (ДИ) не перекрывали единицу.

На фоне ингаляций ИРС-19 отмечался системный эффект, который проявлялся нарастанием содержания сывороточного IgA у всех больных К через месяц от начала лечения, его значения были в 2 раза выше, чем у здоровых детей. Наблюдалось снижение уровня IgE, по сравнению с исходным, у детей II группы в динамике болезни. Применение ИРС-19 не оказывало влияния на содержание сывороточных IgM и G и показатели Т-клеточного звена иммунитета.

2. Клинико-иммунологическая эффективность и безопасность бронхо-мунала

Учитывая форму выпуска бронхо-мунала (капсулы), оказалось невозможным его использование у детей до года, поэтому в исследовании участвовали только больные К II группы (28 человек).

Применение бронхо-мунала не оказывало влияния на течение инфекции. В группе пациентов, получающих лиофилизированный лизат 8 бактерий, бронхопневмония развивалась у одного больного К, в то время как в контрольной группе — у двух пациентов.

Использование бронхо-мунала, как превентивного средства, оказалось неэффективным, поскольку СОР составило менее 50 %, а значения ОШ не были статистически значимыми, так как границы 95 % ДИ перекрывали единицу. Помимо этого, ЧБНЛ, равное 29,4, означает, что бронхо-мунал с превентивной целью необходимо использовать у 29 больных коклюшем, чтобы предотвратить развитие бактериальных осложнений у одного пациента.

3. Клинико-иммунологическая эффективность и безопасность нуклеината натрия

Нуклеинат натрия представляет собой натриевую соль рибонуклеиновой кислоты, полученную путем гидролиза дрожжей и последующей их очистки. Попадая в организм, нуклеинат натрия расщепляется, а образовавшиеся при этом метаболиты участвуют в синтезе нуклеиновых кислот.

Основанием для назначения нуклеината натрия послужили данные, что препарат способствует

коррекции приобретенных иммунодефицитов, увеличивая содержание и функциональные свойства макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, устраняет иммуносупрессивные эффекты лекарственных средств и восстанавливает фагоцитарную активность лейкоцитов [3].

Применение нуклеината натрия не оказывало влияния на течение инфекции. Побочных реакций на применение препарата не наблюдалось.

Профилактический эффект нуклеината натрия проявился в снижении частоты развития осложнений: в группе, получающей препарат, пневмония развивалась у одного больного в возрасте до года, в то время как в контрольной — у 8 детей (у 7 детей первого года жизни и 1 ребенка старшего возраста).

Статистический анализ показал, что СОР составляет 90 % — это свидетельствует о высокой эффективности профилактического применения препарата. ЧБНЛ, равное 5,5, означает, что при назначении нуклеината натрия с превентивной целью 5 больным коклюшем можно предотвратить развитие осложнения у одного пациента. Выраженный размер профилактического эффекта данного препарата подтверждается статистически значимыми показателями ОШ.

Данные иммунологического исследования свидетельствуют, что нуклеинат натрия обладает системным воздействием на иммунокомпетентные клетки. Действие препарата на Т-систему проявляется нормализацией повышенных показателей субпопуляций Т-лимфоцитов CD3+ и CD8+, на В-систему — увеличением содержания сывороточных IgA у больных К I группы через месяц, у пациентов II группы — через 2 недели. Кроме того, снижаются показатели окислительного метаболизма ПМЛ по результатам хемилюминесцентного (ХЛ-теста) и повышается содержание моноцитов, экспрессирующих HLA-DR рецепторы на своей поверхности. Важное значение имеет увеличение содержания IL-4 у больных К до года, что может способствовать развитию гуморального иммунного ответа и тем самым профилактировать бактериальные осложнения.

4. Клинико-иммунологическая эффективность и безопасность комбинации препаратов нуклеината натрия и ИРС-19

Обоснованием комбинированного применения нуклеината натрия и ИРС-19 явились полученные данные о клиническом и превентивном эффекте монотерапии этими препаратами. Предполагалось, что системное воздействие нуклеината натрия на клетки иммунной системы и преимущественно местное ИРС-19, их разные способы введения могут способствовать повышению эффективности и предотвращать развитие пневмонии у всех больных коклюшем.

Влияния на клинику коклюша применение комбинации препаратов нуклеината натрия и ИРС-19 не оказывало. Побочных реакций при использовании данной комбинации препаратов не наблюдалось.

Профилактический эффект терапии, включающей нуклеинат натрия и ИРС-19 проявился тем, что в исследуемой группе бронхопневмония развивалась у одного ребенка (3,7 мес.), в то время как в группе сравнения осложненное течение коклюша наблюдалось у 8 пациентов (у 7 детей первого года жизни и 1 ребенка в группе 5–14 лет).

СОР составляет 87 %, что соответствует клинически значимому эффекту. ЧБНЛ, равное 5,7, означает, что при назначении нуклеината натрия и ИРС-19 с профилактической целью шести больным К, можно предотвратить развитие пневмонии у одного пациента. О высоком клиническом эффекте комбинированной терапии свидетельствуют также значения ОШ.

Включение в терапию К нуклеината натрия и ИРС-19 вызывало увеличение содержания сывороточных IgA у пациентов II группы через 2 недели от начала лечения и у всех больных через месяц, в контрольной группе динамики в содержании иммуноглобулинов не было. Значения IgM и G у всех детей не отличались от показателей группы сравнения. Повышенные значения IgE у больных коклюшем 5–14 лет уменьшались спустя 2 недели терапии и приближались к показателям у здоровых детей при обследовании через месяц, в то время как у детей контрольной группы титры IgE были достоверно выше. Наблюдалось снижение повышенных абсолютных значений субпопуляций Т-лимфоцитов: лимфоцитов с фенотипом CD8+ — у пациентов II группы через 2 недели от начала лечения и у пациентов всех возрастных групп че-

рез месяц; CD3+ -лимфоцитов — у детей 5–14 лет через месяц, в то время как в контрольной группе их содержание было в 1,3 раза выше. Абсолютные значения CD72+ -лимфоцитов у пациентов I и II групп в динамике лечения оставались на высоком уровне, у больных до года в группе сравнения количество CD72+ -лимфоцитов снижалось в 2 раза. При сопоставлении показателей исследуемых цитокинов в процессе лечения нуклеинатом натрия и ИРС-19 динамика наблюдалась только в отношении IL-4: содержание в сыворотке крови у пациентов I группы при обследовании через месяц в 3 раза превышало значения контрольной группы.

Под действием нуклеината натрия и ИРС-19 снижалась продукция активных метаболитов кислорода, что проявлялось уменьшением уровня сХЛ и иХЛ уже через 2 недели приема препаратов.

Таким образом, применение комбинации препаратов нуклеината натрия и ИРС-19 у больных коклюшем оказывало влияние на факторы гуморального и клеточного иммунитета, что проявлялось нарастанием содержания сывороточных IgA у всех больных и нормализацией повышенных значений IgE у пациентов II группы, снижением продукции активных метаболитов кислорода у всех пациентов. Действие на Т-лимфоциты заключалось в нормализации абсолютного содержания повышенных субпопуляций Т-лимфоцитов CD3+, CD8+ и сохранении высоких значений В-лимфоцитов (CD72+) у всех больных коклюшем в динамике лечения по сравнению с контрольной группой. При анализе содержания цитокинов к концу лечения выявлено увеличение содержания IL-4 у пациентов I группы.

Клинический эффект от использования данной комбинации препаратов состоял в том, что у 25 % больных отмечалось разжижение мокроты к 4–5-му дню от начала лечения.

В таблице 3 представлена сравнительная эффективность иммуномодулирующих препаратов у больных К.

Из таблицы видно, что эффективность монотерапии нуклеината натрия и ИРС-19 для предупреждения осложнений у больных К одинакова, о чем свидетельствуют сходные значения ОШ и ЧБНЛ. Комбинированное лечение нуклеинатом натрия и ИРС-19 не показало преимущества перед монотерапией.

Наибольший клинический эффект был достигнут от использования с профилактической

Сравнительная эффективность применения ИМТ у больных коклюшем

Таблица 3

Сравниваемые препараты	Отношение шансов (95% ДИ)	ЧБНЛ
ИРС-19	0,2 (0,04–1,01)	6,7
Бронхо-мунал	0,5 (0,04–5,85)	29,4
Нуклеинат натрия	0,08 (0,0095–0,67)	5,5
Нуклеинат натрия и ИРС-19	0,08 (0,0095–0,67)	5,7

целью нуклеината натрия, ИРС-19 и комбинации препаратов нуклеината натрия и ИРС-19, о чем свидетельствует значительное снижение бактериальных осложнений у больных коклюшем в исследуемых группах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют о том, что эффективность профилактического приема таких иммуномодуляторов, как ИРС-19 и нуклеинат натрия у детей, больных коклюшем, практически одинакова. Наименьший эффект зарегистрирован при приеме пациентами бронхомунала. Комбинированная терапия иммуномодуляторами не имеет преимуществ перед монотерапией. Следует отметить, что в работе использовались препараты как системного, так и местного действия с разным механизмом влияния на иммунокомпетентные клетки. Эти предварительные данные являются основой для проведения более масштабных исследований оценки эффективности иммуномодуляторов в профилактике осложнений у больных коклюшем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власов В.В. Введение в доказательную медицину. — М.: Медиа Сфера, 2001. — 387 с.
2. Епифанцева Н.В. Коклюш: полиморфизм генов противовоспалительных цитокинов / Врач-аспирант. — 2011. — Т. 47, № 4. — С. 454—458.
3. Земсков А.М., Караулов А.В., Земсков В.М. Комбинированная иммунокоррекция. — М.: Наука, 1994. — 260 с.
4. Лобзин Ю.В., Бабаченко И.В., Шамшева О.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика коклюша у детей первых месяцев жизни // Детские инфекции. — 2011. — Т. 10, № 4. — С. 5—9.
5. Маянский А.Н. Возбудитель коклюша // Вопр. диагностики в педиатрии. — 2010. — Т. 2, № 3. — С. 12—16.
6. Петрова М.С., Крюкова Г.С., Келли Е.И. Причины летальности при коклюше // Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей: материалы 2-го конгр. педиатров-инфекционистов России, 8—10 дек. 2003 г. — М., 2003. — С. 151.
7. Попова О.П. Особенности сочетанного течения коклюша и острых респираторных вирусных инфекций у детей // Детские инфекции. — 2011. — Т. 10, № 3. — С. 18—20.
8. Сипачева Н.Б., Русакова Е.В., Семенов Т.А. Эпидемиология и вакцинопрофилактика коклюша // Здоровье населения и среда обитания. — 2011. — № 12. — С. 34—36.
9. Ширинский И.В., Желтова О.И., Ширинский В.С., Козлов В.А. Эффективность и безопасность симвастина у больных ревматоидным артритом — открытое контролируемое исследование // Мед. иммунология. — 2008. — Т. 10, № 4—5. — С. 477—482.
10. Ширинский И.В., Ширинский В.С. Прогнозирование клинической эффективности лечения симвастином у больных ревматоидным артритом // Мед. иммунология. — 2009. — № 2—3. — С. 221—226.
11. Sreenan C.D., Osioviich H. Neonatal pertussis requiring extracorporeal membrane oxygenation Pediatr // Surg. Int. — 2001. — Vol. 17, N 2—3. — P. 201—203.
12. Stojanov S., Liese J., Belohradsky B.N. Hospitalization and complications in children under 2 years of age with Bordetella pertussis infection // Infection. — 2000. — Vol. 28, N 2. — P. 106—110.
13. Wang J., Yang Y., Li J. Infantile pertussis re-discovered in China // Emerg. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 8, N 8. — P. 859—861.

Сведения об авторах

Панасенко Людмила Михайловна — доктор медицинских наук, профессор кафедры пропедевтики детских болезней НГМУ
Ширинский Валерий Степанович — заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии ФГБУ ИИКИ СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: 3832282547)
Карцева Татьяна Валерьевна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой пропедевтики детских болезней НГМУ
Ширинский Иван Валерьевич — ведущий научный сотрудник, доктор медицинских наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, Ядринцевская, 14; тел.: 3832282547)

И.А. Пашнина, И.М. Криволапова, И.А. Тузанкина, В.А. Черешнев

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН (Екатеринбург)

Обследованы 1222 пациента с подозрением на аутоиммунные заболевания соединительной ткани. У больных определяли антинуклеарные антитела в реакции непрямой иммунофлюоресценции, методами иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга. Результаты всех использованных лабораторных тестов коррелировали друг с другом, что свидетельствует об удовлетворительной сопоставимости различных лабораторных методов. Наиболее чувствительным методом выявления антинуклеарных антител является реакция непрямой иммунофлюоресценции, что определяет актуальность ее использования для скрининга аутоиммунных заболеваний соединительной ткани. Сопоставление типов свечения в иммунофлюоресцентном тесте и результатов иммуноблоттинга показало, что для каждого типа свечения характерен определенный набор аутоантител, выявляемых методом иммуноблоттинга. Однако одни и те же антитела могут обнаруживаться при различных типах флюоресценции, что затрудняет однозначную интерпретацию результатов иммунофлюоресцентного теста. Наиболее часто выявляемыми аутоантителами оказались антитела к Ro-52, которые выявлялись при всех типах флюоресценции, а также при отсутствии таковой.

Ключевые слова: антинуклеарные антитела, аутоиммунные заболевания

APPLICATION OF DIFFERENT LABORATORY METHODS FOR ANTINUCLEAR AUTOANTIBODIES INVESTIGATION IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE CONNECTIVE TISSUE DISEASES

I.A. Pashnina, I.M. Krivolapova, I.A. Tuzankina, V.A. Chereshev

Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch of the Russian Acad. Sci., Yekaterinburg

1222 patients with suspicion of different autoimmune connective tissue diseases are investigated. Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence reaction, by methods of ELISA and immunoblotting were determined. Laboratory tests results correlated with each other that testifies to satisfactory comparability of different laboratory methods. The most sensitive method for detection of antinuclear antibodies is indirect immunofluorescence. This is a preferable method for screening of autoimmune connective tissue diseases. At comparison of luminescence types in immunofluorescence test and results of immunoblotting was shown that for each type of a luminescence the set of antibody, revealed by immunoblotting, was characteristic. However, the same antibodies can be found in various types of fluorescence that complicates unequivocal interpretation of immunofluorescence test results. Antibodies to Ro-52 were most often found in all types of fluorescence, and also in the absence of that.

Key words: autoantibodies, autoimmune diseases

В настоящее время по разным оценкам совокупная встречаемость аутоиммунных заболеваний соединительной ткани составляет от 10 до 20 %, а вклад в общую инвалидность — до 10 %. Аутоиммунные заболевания ухудшают качество жизни пациентов и часто приводят к тяжелой, обычно пожизненной инвалидизации. Это обуславливает актуальность разработки лабораторных тестов для ранней диагностики данной патологии. Наиболее широкой группой нозологий среди аутоиммунных заболеваний являются заболевания соединительной ткани, основными диагностическими маркерами которых являются аутоантитела, прежде всего антинуклеарные. Антинуклеарные антитела (АНА) представляют собой семейство аутоантител, связывающихся с рибонуклеиновыми кислотами, и ассоциированными с ними белками. Они встречаются более чем у 90 % больных с диффузными болезнями соединительной ткани, а также могут быть обнаружены при множестве других аутоиммунных, инфекционных, воспалительных

и онкологических заболеваний [1]. Результаты определения АНА входят в число диагностических критериев многих системных ревматических заболеваний и в ряде случаев могут иметь прогностическое значение, а также применяться для оценки активности аутоиммунного процесса и мониторинга терапии.

В настоящее время для определения антинуклеарных антител используется широкий спектр лабораторных методов, результаты которых не всегда совпадают, так как тест-системы различаются по антигенным субстратам, используемым в их конструкции, по спектру определяемых антител. Наиболее широко распространенным методом для скрининга является определение антинуклеарного фактора (АНФ) в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ). Этот метод позволяет регистрировать широкий спектр АНА, в отношении антигенной специфичности которых можно ориентироваться по типам свечения в РНИФ. Для определения специфичности обнаруженных анти-

тел требуются дополнительные методы, такие как ИФА и иммуноблоттинг.

Целью исследования явился сравнительный анализ результатов определения антинуклеарных антител различными лабораторными методами у пациентов с подозрением на аутоиммунные заболевания соединительной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 1222 пациента с подозрением на аутоиммунные заболевания соединительной ткани в возрасте от 2 до 70 лет. У больных определяли: антинуклеарный фактор (АНФ) в реакции непрямой иммунофлюоресценции на Нер-2 клетках (Euroimmun, Германия); комплекс из 20 экстрагируемых антинуклеарных антител методом ИФА (ЭНА, Orgentec, Германия); антинуклеарные антитела к отдельным антигенам (U1-RNP/Sm, Sm, SS-A, SS-B, Ro-52, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP-B, PCNA, ds-DNA, нуклеосомы, гистоны, Rib-P, AMA-M2) методом иммуноблоттинга (АНА-блоттинг, Euroimmun, Германия). Для математической обработки данных использован метод корреляционного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе данных, полученных при использовании различных методов определения АНА, была выявлена прямая корреляционная связь между результатами всех лабораторных тестов (табл. 1), что свидетельствует об удовлетворительной сопоставимости различных лабораторных методов. Однако полное их совпадение невозможно, поскольку технологические приемы при изготовлении тест-систем могут по-разному изменять структуру используемого антигена, что обуславливает их различную чувствительность и специфичность. Кроме того, спектр антител, определяемых в рамках разных методов, также может различаться. Так, использованный в работе вариант иммуноблоттинга, позволяет определить АНА к 15

различным антигенам, а при определении АНФ возможно выявление множества типов свечения, каждый из которых, в свою очередь, может быть обусловлен наличием большого количества различных антител. Это обуславливает необходимость применения комплекса лабораторных методов для определения АНА, что позволяет получить более полную и достоверную информацию.

Одновременное определение АНА тремя лабораторными методами (АНФ, ЭНА, АНА-блоттинг) было проведено 235 пациентам. Совпадение положительных результатов всех трех лабораторных тестов наблюдалось примерно у одной трети пациентов (табл. 2). Еще треть пациентов имели положительные результаты только при определении АНФ иммунофлюоресцентным методом. Парное сочетание повышенных уровней АНА, определенных различными методами, выявлялось примерно в равной доле случаев для всех комбинаций методов и не превышало 10 %. Наиболее чувствительным лабораторным тестом при выявлении АНА явилась реакция непрямой иммунофлюоресценции с использованием клеточной линии Нер-2, поскольку число положительных результатов при применении этого метода было наиболее высоким. Это обусловлено использованием целых клеток и их минимальной обработкой в процессе приготовления субстрата реакции. Чувствительность данного теста служит основанием для его использования в качестве скрининга.

Применение в качестве субстрата стандартизованных Нер-2 клеток позволяет достоверно описать различные типы свечения ядра, где характер флюоресценции отражает присутствие различных типов АНА, в определенной степени специфичных для различных аутоиммунных заболеваний. Определение антинуклеарных антител в РНИФ с описанием типа свечения является значимым для выбора и применения других лабораторных методов, уточняющих спектр АНА, присутствующих

Таблица 1

Результаты определения АНА различными методами

	Сравниваемые методы		
	АНФ – ЭНА	АНФ – АНА-блоттинг	ЭНА – АНА-блоттинг
Количество человек, <i>n</i>	1222	490	249
Коэффициент корреляции, <i>r</i>	0,54	0,39	0,49
Уровень вероятности, <i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,01

Таблица 2

Совпадение результатов определения АНА различными лабораторными методами

Методы	Результаты лабораторных методов							
АНФ	(+)	(+)	(–)	(+)	(+)	(–)	(–)	(–)
ЭНА	(+)	(+)	(+)	(–)	(–)	(+)	(–)	(–)
АНА-блоттинг	(+)	(–)	(+)	(+)	(–)	(–)	(+)	(–)
%	28	7	7	6	33	5	7	7

Примечание: (–) – отрицательные результаты теста, (+) – положительные результаты теста.

в сыворотке больных. Однако не всегда характер флюоресценции в РНИФ четко совпадает с результатами «расшифровывающих» лабораторных методов. Кроме того, существуют типы свечения, клиническое значение которых не установлено. Это обуславливает актуальность сопоставления флюоресцентных паттернов с результатами уточняющих тестов.

При одновременном определении АНА методами РНИФ и иммуноблоттинга выявлено, что из 466 исследованных сывороток позитивными по АНФ были 368 (79 %), из которых, в свою очередь, 236 образцов (64 %) имели положительные результаты при проведении иммуноблоттинга. Наиболее часто встречавшимися типами флюоресценции были гомогенный и гранулярный типы, самым редким оказался центромерный тип свечения (Таблица 3). У пациентов, имевших положительные результаты иммуноблоттинга, в 50 % случаев были обнаружены 2 и более разновидностей антител. При проведении иммунофлюоресцентного теста случаи сочетания различных типов свечения в одном образце сыворотки в целом составили 14 %.

Из 135 человек, у которых выявлялся гомогенный тип свечения, положительные результаты в блоттинге были получены у 52 % больных (табл. 3). При этом наиболее часто выявлялись антитела к двуспиральной ДНК, нуклеосомам и гистонам. Гомогенный тип флюоресценции считается характерным для присутствия в сыворотке крови антител к двуспиральной ДНК и гистонам, являющихся компонентами нуклеосом — основных структурных единиц диффузного хроматина [1]. Данный тип характерен для больных с системной красной волчанкой, однако может встречаться и при других заболеваниях, в частности, у детей с ювенильными артритом он наблюдался примерно в половине случаев [2,11]. Однако существуют данные, что при этом типе почти также часто могут встречаться антитела к SS-A и SS-B антигенам [10]. Действительно, у обследованных нами пациентов с гомогенным типом свечения, антитела к SS-A, SS-B

и Ro-52 по частоте встречаемости были сравнимы с антителами к гистонам (Таблица 3). Также с большой частотой определялись антитела к AMA-M2, которые обычно связывают с цитоплазматическим типом свечения. У 10 пациентов из данной группы действительно наблюдалось сочетание гомогенного и цитоплазматического свечения, однако лишь у 2 из них были выявлены антитела к AMA-M2, в остальных 8 случаях выявление этих антител не было подкреплено цитоплазматическим паттерном флюоресценции. Еще у трех пациентов присутствовало сочетание гомогенного и нуклеолярного типов свечения, но результаты блоттинга были отрицательные. В единственном случае сочетания гомогенного и центромерного типов свечения у пациента были выявлены антитела к центромерам в иммуноблоттинге.

При гранулярном типе флюоресценции положительные результаты иммуноблоттинга выявлены у 57 % больных. Гранулярный тип окрашивания ядра является наиболее часто встречающимся и наименее специфичным для конкретных заболеваний. Он часто встречается у пациентов с синдромом Шегрена, ревматоидным артритом, ювенильными артритом и целом ряде других аутоиммунных заболеваний [6, 8]. К основным антигенам, присутствие аутоантител к которым обуславливает гранулярный тип свечения, относят RNP, SS-A и SS-B [5], также довольно часто встречаются Sm и PCNA [1]. Все перечисленные антитела присутствовали в исследованных сыворотках при гранулярном типе флюоресценции с высокой частотой, однако лидирующую позицию занимали антитела к Ro-52 (табл. 3). Кроме того, нередко были антитела к dsDNA и к PM-Scl, обычно ассоциируемые с гомогенной флюоресценцией ядра. Более того, у 9 пациентов с гранулярным типом свечения были обнаружены антитела к Jo-1 и также у 9 — антитела к AMA-M2, характерные для цитоплазматического типа флюоресценции. И лишь у двух больных из девяти с антителами к AMA-M2 была выявлена флюоресценция цитоплазмы в РНИФ. Помимо последних

Таблица 3
Количество человек с положительными результатами определения АНА методом иммуноблоттинга среди пациентов, имевших различные результаты определения аутоантител в РНИФ

Результат/Тип свечения в РНИФ	n	Число пациентов с положительными результатами блоттинга, всего	RNP/Sm	Sm	SS-A	SS-B	Ro-52	Scl-70	PM-Scl	Jo-1	CENP-B	PCNA	dsDNA	Нуклеосомы	Гистоны	Rib-P	AMA-M2
Отрицательный результат РНИФ	98	27	2	2	4	1	9	3	3	3	2	1	3	1	1	0	3
Положительный результат РНИФ	Гомогенный	135	70	4	7	11	11	10	5	1	2	4	1	19	18	12	3
	Гранулярный	146	83	23	9	23	18	29	3	10	9	5	2	12	5	3	9
	Нуклеолярный	25	14	1	1	1	2	5	3	1	0	1	0	3	0	0	0
	Центромерный	17	13	3	0	1	0	6	0	0	0	12	0	1	2	0	0
	Цитоплазматический	45	29	2	0	0	6	8	1	2	0	2	1	5	0	0	15
Всего	466	245	35	19	42	38	67	15	17	14	26	5	43	26	16	7	31

двух еще 12 человек имели сочетание гранулярного и цитоплазматического типа свечения, результаты иммуноблоттинга у них были отрицательные.

Антигены ядрышка могут выступать в качестве мишеней АНА и обуславливать нуклеолярный (ядрышковый) тип свечения. Его выявление характерно для склеродермии и ее разновидностей, а также для полимиозита и дерматомиозита. Данный тип флюоресценции определяется у больных при наличии антител к таким компонентам ядрышка как РНК-полимераза 1, U3-RNP/фибриллярин, РМ/ScI [1]. Кроме того, следует отметить большую частоту выявления антител к антигенам SS-A и SS-B при ядрышковом типе свечения [10]. У обследованных нами пациентов с этим типом флюоресценции все перечисленные антитела встречались, но чаще всего обнаруживались антитела к Ro-52 (табл. 3). Кроме того, у трех пациентов присутствовали антитела к ScI-70 (ДНК-топоизомераза-I), которые наряду с гомогенным типом флюоресценции могут приводить к появлению нуклеолярного свечения, так как наибольшая концентрация этого фермента наблюдается именно в ядрышках. В целом одновременное выявление антител с помощью обоих использованных методов наблюдалось более чем у половины больных. У трех человек из группы с нуклеолярным типом свечения выявлено сочетание с цитоплазматическим, однако соответствующие антитела методом блоттинга обнаружены не были.

Самым редким у обследованных больных оказался центромерный тип свечения, при котором выявлено наибольшее совпадение с результатами блоттинга. Это относится как к общему совпадению положительных результатов обоих методов, так и к тому факту, что у более чем двух третей больных были выявлены антитела к центромерам методом блоттинга (табл. 3). Известно, что центромерное иммунофлюоресцентное окрашивание отмечается у больных при появлении антител к центромерам хромосом [3, 7]. Однако, в работе I. Peene et al., при обследовании пациентов с данным типом флюоресценции, показано присутствие антител к SS-A и SS-B антигенам [4]. В исследованных нами сыворотках с флюоресценцией центромер антитела к SS-A обнаружены только у одного человека, а к SS-B не выявлялись вообще. Как и во всех остальных выборках, частота встречаемости антител Ro-52 была довольно высока (у одной трети пациентов). Антицентромерные антитела характерны для CREST-варианта системной склеродермии, и могут обнаруживаться в сыворотке больных за несколько лет до появления клинических симптомов, что позволяет рассматривать их выявление в качестве предиктора заболевания. Так у обследованного нами мальчика с направляющим диагнозом «ювенильный ревматоидный артрит» и преимущественно суставной симптоматикой были выявлены высокие титры антител к центромерам методами РНИФ и блоттинга. Это позволило заподозрить у него склеродермию, что и было подтверждено позднее при дополнительном обследовании и появлении развернутой клинической картины.

Термин «антинуклеарные антитела» в отношении антител, определяемых в РНИФ, не вполне точен, поскольку традиционно в эту группу включены и антитела к антигенам цитоплазмы, выявляемые на субстрате Нер-2-клеток. Из 45 человек, у которых определялся цитоплазматический тип свечения, две трети пациентов имели положительные результаты иммуноблоттинга (табл. 3), из которых, в свою очередь, наиболее частыми были антитела к АМА-M2 (около половины всех позитивных результатов). Аутоантитела к митохондриальному пируватдегидрогеназному комплексу (АМА-M2) считаются наиболее характерными для первичного билиарного цирроза [1], однако мы обнаруживали данные антитела и при других диагнозах: при аутоиммунном гепатите, синдроме Шегрена, волчанке. В частности, у обследованной нами девочки с системной красной волчанкой, помимо гомогенного типа свечения в РНИФ, неоднократно выявлялся цитоплазматический тип свечения и антитела к АМА-M2 в блоттинге. Пациентка наблюдалась в течение 5 лет, в том числе неоднократно консультирована гастроэнтерологом, однако признаков поражения печени не обнаружено.

Цитоплазматический тип свечения также может быть обусловлен присутствием антител к тРНК-синтетазам, в частности Jo-1 (цитоплазматическая гистидил-тРНК-синтетаза), которые характерны для полимиозита, однако последние не были выявлены методом иммуноблоттинга (табл. 3). Обращает внимание, что в группе больных с цитоплазматическим типом флюоресценции нередко обнаруживались антитела к Ro-52, SS-B и дсДНК при отсутствии ядерного свечения.

Следует отметить, что титры антител, определяемые различными лабораторными методами, не всегда совпадали. Например, у пациента с первичным билиарным циррозом методом блоттинга выявлен высокий уровень антител к АМА-M2 (3+), а в РНИФ наблюдалось цитоплазматическое свечение лишь в умеренном титре (1/320). У другого больного был обнаружен гранулярный тип свечения в крайне высоком титре (1/40960), тогда как в блоттинге получен лишь сомнительный результат присутствия антител к нативной ДНК.

При отрицательных результатах иммунофлюоресцентного теста, выявление аутоантител методом блоттинга было наименьшим (табл. 3), что вполне закономерно. Однако положительные результаты в блоттинге все же присутствовали, и безусловным лидером оказались антитела к Ro-52. В целом спектр обнаруженных антител в большей степени напоминал результаты блоттинга при гранулярном типе свечения. Выявление антител методом иммуноблоттинга при отрицательных результатах РНИФ, а также при типах свечения в РНИФ, не характерных для данной разновидности антител, свидетельствует о том, что конструктивные особенности тест-систем имеют значение для связывания антител с антигенным субстратом.

Обращает на себя внимание высокая частота выявления антител к Ro-52 при всех типах флю-

оресценции, а также при отрицательных результатах РНИФ. В целом, это были наиболее часто встречавшиеся антитела (табл. 3). Белок Ro-52 связан с рибонуклеопротеином SS-A, образуя комплекс SS-A/Ro. Сыворотки, позитивные по антителам к SS-A, могут дополнительно иметь антитела к Ro-52, но иногда встречаются реакции антител, присутствующих в сыворотке крови больных, только с Ro-52 [1]. Данные антитела не являются специфичными для каких-либо аутоиммунных заболеваний, так как могут обнаруживаться при различной аутоиммунной патологии [4, 9]. Считается, что антитела к этому белку в большей степени характерны для гранулярного типа свечения. Однако их частое выявление в блоттинге в сочетании с другими типами флюоресценции в РНИФ, а также при отрицательных результатах РНИФ, может свидетельствовать об отсутствии четкой взаимосвязи между анти-Ro-52 и гранулярным паттерном. Указанное несоответствие также может быть вызвано либо низкой чувствительностью иммунофлюоресцентного теста с использованием в качестве субстрата Нер-2-клеток в отношении этих антител, либо недостаточной специфичностью метода иммуноблоттинга. Возможно, соответствующий антиген часто утрачивается или претерпевает значительные конформационные изменения при изготовлении тест-систем на основе Нер-2-клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сопоставление результатов определения антинуклеарных антител методами РНИФ, ИФА и блоттинга показало, что, несмотря на неполное совпадение, результаты использованных тестов согласуются между собой, что подтверждается выявленными корреляционными взаимосвязями. Наиболее чувствительным методом выявления АНА является реакция непрямой иммунофлюоресценции, что определяет актуальность ее использования для скрининга аутоиммунных заболеваний соединительной ткани. Сопоставление типов свечения в иммунофлюоресцентном тесте и результатов иммуноблоттинга позволяет уточнить антигенную специфичность антител, выявленных методом РНИФ. Показано, что для каждого типа флюоресценции характерен определенный набор аутоантител, выявляемых методом иммуноблоттинга. Однако одни и те же антитела могут выявляться при различных типах свечения в РНИФ, что затрудняет однозначную трактовку результатов иммунофлюоресцентного теста. Наиболее часто обнаруживаемыми аутоантителами

оказались антитела к Ro-52, которые выявлялись при всех типах флюоресценции, а также при отрицательных результатах РНИФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. — СПб.: Человек, 2010. — 272 с.
2. Пашнина И.А. Анализ результатов определения антинуклеарных антител различными лабораторными методами // Вестн. уральской мед. акад. науки. — 2011. — № 2/1. — С. 186—187.
3. Bernstein R.M., Steigerwald J.C., Tan E.M. Association of antinuclear and antinucleolar antibodies in progressive systemic sclerosis // Clin. exp. Imm. — 1982. — Vol. 48. — P. 43—51.
4. Brouwera R., Hengstman G.J.D., Vree Egberts W., Ehrfeldt H. et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis // Ann. Rheum. Dis. — 2001. — Vol. 60. — P. 116—123.
5. Dellavance A., Viana V.S.T., Leon E.P., Bonfa E.S.D.O. et al. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern // The Journal of Rheumatology. — 2005. — Vol. 32. — P. 2144—2149.
6. Meilof J.F., Smeenk R.J. Autoantibodies and their target antigens in Sjögren's syndrome // Neth. J. Med. — 1992. — Vol. 40, N 3—4. — P. 140—147.
7. Moroi Y., Peebles C., Fritzler M.J., Steigerwald J. et al. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera (antinuclear antibody/chromosome) // Medical Sciences Proc. Natl. Acad. Sci. — 1980. — Vol. 3. — P. 1627—1631.
8. Nishimura S., Nishiya K., Hisakawa N., Chikazawa H. et al. Positivity for antinuclear antibody in patients with advanced rheumatoid arthritis // Acta Med. Okayama. — 1996. — Vol. 50, N 5. — P. 261—265.
9. Parker J.C., Burlingame R.W., Bunn C.C. Prevalence of antibodies to Ro-52 in a serologically defined population of patients with systemic sclerosis // J. Autoimmune Diseases. — 2009. — Vol. 6. — P. 1740—2557.
10. Peene I., Meheus L., Veys E.M., De Keyser F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing // Ann Rheum Dis. — 2001. — Vol. 60. — P. 1131—1136.
11. Shin J.I., Kim K.H., Chun J.K., Lee T.J. et al. Prevalence and patterns of anti-nuclear antibodies in Korean children with juvenile idiopathic arthritis according to ILAR criteria // 2008. — Vol. 37, N 5. — P. 348—351.

Сведения об авторах

Пашнина Ирина Александровна — научный сотрудник института иммунологии и физиологии УрО РАН, кандидат биологических наук (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106; тел.: +79226004686; e-mail: irina_pashnina@mail.ru)

Криволапова Ирина Михайловна — младший научный сотрудник института иммунологии и физиологии УрО РАН

Тузанкина Ирина Александровна — ведущий научный сотрудник института иммунологии и физиологии УрО РАН, доктор медицинских наук, профессор

Черешнев Валерий Александрович — директор института иммунологии и физиологии УрО РАН, академик РАН и РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Н.А. Плужникова ¹, Н.Ю. Анисимова ¹, О.В. Лебединская ², Д.С. Цветков ¹, А.П. Годовалов ²,
М.В. Киселевский ¹

ДИНАМИКА СЫВОРОТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В ПЕРИОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

¹ Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина РАМН (Москва)
² Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера (Пермь)

Целью работы явилось исследование динамики сывороточных иммуноглобулинов онкологических больных в периоперационном периоде. В результате проведенных исследований было установлено, что в сыворотке пациентов уже на начальном этапе интраоперационного периода концентрация иммуноглобулина М увеличивалась и сохранялась на этом уровне вплоть до третьих суток после хирургического вмешательства, превышая значения в группе контроля на 30–80 %. Достоверных изменений уровня иммуноглобулинов А и G у обследованных больных в периоперационном периоде выявить не удалось. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности проведения мониторинга уровня иммуноглобулинов у онкологических больных в интра- и послеоперационном периодах и использования полученных данных для оценки иммунного статуса больного и выбора стратегии иммунокорректирующей терапии.

Ключевые слова: онкологические больные, иммуноглобулины, периоперационный период

DYNAMICS OF SERUM IMMUNOGLOBULINS IN ONCOLOGICAL PATIENTS DURING PERIOPERATIVE PERIOD

N.A. Pluzhnikova ¹, N.Yu. Anisimova ¹, O.V. Lebedinskaya ², D.S. Tsvetkov ¹,
A.P. Godovalov ², M.V. Kiselevsky ¹

¹ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow
² E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm

The aim of the study was to investigate the dynamics of serum immunoglobulins from oncological patients in the perioperative period. As a result of investigations, it was established that already at the initial stage of the intraoperative period the IgM concentration was elevated in patients' sera, and persisted up to 3 days after surgical intervention, while exceeding the values of the control group by 30–80 %. At the same time, no significant changes were detected in IgA and IgG levels of examined patients in the perioperative period. The obtained data confirm the expediency of carrying out the monitoring of immunoglobulin levels in oncological patients both in intra-, and postoperative periods and can be used for the assessment of patient's immune status and in the choice of immunocorrecting therapy strategy.

Key words: oncological patients, immunoglobulins, perioperative period

Одним из основных методов лечения онкологических больных является применение расширенных хирургических операций. При этом присущие опухолевому процессу нарушения различных звеньев гомеостаза усугубляются инвазивными диагностическими исследованиями, высокодозной радио-, химио- и гормональной терапией. Хирургическое вмешательство также может выступать одним из факторов, вызывающим и усиливающим иммунологический дисбаланс. По данным, приводимым М. Talmor et al., более чем у 80 % хирургических больных в послеоперационном периоде отмечается развитие симптомов гнойно-воспалительных осложнений [11].

В соответствии с господствующей в медицине бактериологической концепцией, в патогенезе ранних послеоперационных осложнений (включая синдром системной воспалительной реакции, сепсис, септический шок) ведущая роль отводится микрофлоре экзо- или эндогенного происхождения, а также их токсинам [2, 7]. Значимую роль в устранении как внутриклеточных, так и внеклеточных патогенных агентов играет гуморальный иммунный ответ, реализуемый, в частности имму-

ноглобулинами. Роль этих гликопротеинов в развитии послеоперационных осложнений, очевидно, не ограничивается связыванием, сегрегацией и деградацией антигенных субстанций. Показано, что связанные с антигеном иммуноглобулины опосредуют регуляцию продукции цитокинов комплемент-зависимого иммунного ответа и фагоцитоза [3].

Хотя имеется значительное количество публикаций, сообщающих, что при развитии послеоперационных инфекционных осложнений наблюдалось снижение общего уровня иммуноглобулинов и их отдельных подклассов [7, 10], отдельные исследователи указывают на отсутствие достоверных изменений уровня этих анализов в сравнении со здоровыми донорами даже на фоне сепсиса или септического шока [5]. Тем не менее, широко распространена практика введения хирургическим больным в этот период препаратов иммуноглобулинов в качестве заместительной терапии [4, 6, 9]. В связи с вышеизложенным, оценка динамики сывороточных иммуноглобулинов в периоперационном периоде может быть информативной не только для определения иммунного статуса больного, но

и для выбора стратегии иммунокорректирующей терапии.

Цель исследования — изучение динамики иммуноглобулинов А, М, G у онкологических больных в раннем периоперационном периоде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы сыворотки крови пациентов со злокачественными новообразованиями пищевода и желудка II — III стадии в периоперационном периоде (за сутки до операции, интраоперационно, на 1-е, 3-и и 5-е сутки после оперативного вмешательства). Во время операции у пациентов кровь забирали трехкратно (1-й раз — после вскрытия брюшной полости, 2-й — после рассечения стенок кишечника и нарушения целостности пищеварительного тракта и 3-й раз — после наложения операционных швов). Возраст обследованных онкологических больных колебался от 45 до 80 лет, среди них мужчин было 13 человек (76,92 %), женщин — 3 (23,08 %). В качестве контрольной группы было обследовано 25 соматически здоровых доноров в возрасте от 19 до 45 лет. Среди них мужчин было 17 человек (68,00 %), женщин — 8 (32,00 %). У лиц контрольной группы отсутствовали острые воспалительные заболевания и аутоиммунная патология.

Кровь забирали по общепринятой методике в утренние часы натощак из локтевой вены в стеклянные пробирки объемом 5 мл. После образования сгустка сыворотку отделяли путем центрифугирования со скоростью 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут и замораживали при -60°C . Проводили определение концентрации иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) в сыворотке крови иммуноферментным анализом с использованием соответствующих наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

Статистический анализ данных проводили, рассчитывая медианное значение и размах квартилей (25 — 75 %) с использованием модуля непараметрической статистики программы Statistica 6.0. Достоверность межгрупповых различий сравниваемых показателей пациентов и доноров оценивалась по медианному тесту и значению критерия Манна — Уитни ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что исходный дооперационный уровень иммуноглобулинов у онкологических больных был несколько выше, чем у здоровых доноров, однако находился в пределах физиологической нормы (табл. 1). Показано достоверное увеличение содержания IgM в интраоперационном периоде. Повышение концентрации этого иммуноглобулина наблюдается уже на начальном этапе операционного вмешательства — при вскрытии брюшной полости — и достигает 2,95 (2,60 — 2,99) мг/мл. Во второй интраоперационной точке при расчете по медианным значениям этот показатель увеличился в 1,36 раза. В конце операции концентрация IgM также оставалась повышенной относительно данных контрольной группы и составляла 3,72 (2,69 — 4,04) мг/мл.

При изучении динамики IgA и IgG в интраоперационном периоде достоверных изменений не отмечалось. Значения этих показателей находились в пределах физиологической нормы.

В раннем послеоперационном периоде наблюдалось постепенное снижение IgM в сыворотке крови онкологических больных (табл. 2). На 1-е сутки после операции концентрация исследуемого анализа существенно не отличалась от этого параметра на завершающем этапе интраоперационного

Таблица 1
Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови больных в интраоперационном периоде

Класс иммуноглобулинов	Концентрация иммуноглобулинов, мг/мл				
	Время исследования сыворотки крови больных				Здоровые доноры
	до операции	интраоперационно			
		1 точка	2 точка	3 точка	
IgA	1,97 (1,87–1,99)	1,89 (1,80–1,99)	1,81 (1,74–1,91)	1,75 (1,68–1,94)	1,70 (1,51–1,89)
IgM	2,91 (2,66–3,01)	2,95 (2,60–2,99)	4,02 (3,79–4,94)	3,72 (2,69–4,04)	2,24 (2,10–2,44)
IgG	11,58 (10,61-20,58)	11,27 (10,36-19,47)	11,61 (10,98-12,97)	11,28 (10,97-11,88)	11,32 (10,67-11,45)

Таблица 2
Динамика уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови больных в раннем послеоперационном периоде

Классы иммуноглобулинов	Концентрация иммуноглобулинов, мг/мл		
	Время после операции		
	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
IgA	1,83 (1,68–1,99)	1,86 (1,81–1,96)	1,79 (1,67–1,95)
IgM	3,68 (2,68–3,98)	2,96 (2,51–3,65)	2,55 (2,35–2,96)
IgG	11,52 (10,53–11,95)	11,71 (11,31–23,11)	11,39 (11,03–11,94)

периода, но уже на 3-и сутки постоперационного этапа имело место достоверное снижение сывороточного содержания IgM до 2,96 (2,51 – 3,65) мг/мл. Нормализация данного показателя наблюдалась на 5-е сутки после операции – 2,55 (2,35 – 2,96) мг/мл. Достоверных изменений IgA и IgG в раннем послеоперационном периоде не наблюдалось.

Таким образом, результаты проведенных исследований указывают на то, что в периоперационном периоде у онкологических больных наблюдается достоверное изменение содержания в крови только IgM. При этом достоверное увеличение этого показателя отмечается уже на ранних этапах операционного вмешательства и сохраняется на протяжении первых 24 часов после операции. В процессе операционного вмешательства вследствие нарушения целостности или проницаемости стенки кишечника может происходить проникновение бактерий и/или их токсинов в кровяное русло. IgM относится к классу иммуноглобулинов, обеспечивающих первичный иммунный ответ, и играет важную роль в элиминации возбудителей из кровеносного русла и активации фагоцитоза. Поэтому регистрируемое повышение в крови IgM в периоперационном периоде следует рассматривать как реакцию иммунной системы на проникновение микроорганизмов и продуктов их метаболизма в системный кровоток. Нормализация содержания IgM в крови наступает на 5-е сутки после операции, что соответствует периоду полураспада этого иммуноглобулина [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований нам не удалось выявить факт снижения концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови онкологических больных в периоперационном периоде. Напротив, были получены данные, свидетельствующие о достоверном увеличении содержания иммуноглобулина М в сыворотке крови этих пациентов. Полученные данные указывают на то, что назначение препаратов иммуноглобулинов должно проводиться с осторожностью, принимая во внимание сывороточный уровень соответствующих белков, поскольку введение этих препаратов может сопровождаться рядом осложнений, среди которых наиболее опасными являются острая почечная недостаточность и анафилактический шок [1]. Таким образом, следует рекомендовать постоперационный мониторинг уровня сывороточных антител для принятия решения о назначении пациенту в периоперационный период заместительной иммунотерапии препаратами иммуноглобулина.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-96037p_урал_a и Администрацией Пермского края.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вышковский Г.Л. Регистр Лекарственных средств России. — М.: РЛС-2009, 2008. — 672 с.
2. Гельфанд Б.Р. Антибиотики при абдоминальной хирургической инфекции // Антибиотики и химиотерапия. — 2001. — № 11. — С. 11–15.
3. Климович В.Б. Регуляторные эффекты иммуноглобулинов // Иммунология. — 1998. — № 6. — С. 16–17.
4. Berlot G., Viviani M. Immunoglobulins in sepsis // Adv. In. Sepsis. — 2007. — Vol. 6, N 2. — P. 41–46.
5. Dietz S. Low levels of immunoglobulin G in patients with sepsis or septic shock: a signum mali ominis? // Crit. Care. — 2010. — Vol. 14. — P. 26.
6. Jenson H.B., Pollock B.H. The role of intravenous immunoglobulin for the prevention and treatment of neonatal sepsis // Semin. Perinatol. — 1998. — Vol. 22. — P. 50–63.
7. Kyles B.D.M., Baltimore J. Adjunctive use of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin therapy in sepsis: a case report // Am. J. Crit. Care. — 2005. — Vol. 14, N 2. — P. 109–112.
8. Maier R.V. Pathogenesis of Multiple Organ Dysfunction Syndrome — Endotoxin, Inflammatory Cells, and Their Mediators: Cytokines and Reactive Oxygen Species // Surgical Infections. — 2000. — Vol. 1, N 3. — P. 197–205.
9. Pildal J., Gotzsche P.C. Polyclonal immunoglobulin for treatment of bacterial sepsis: a systematic review // Clin. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 39. — P. 38–46.
10. Tabata N., Azuma E., Masuda S.-I., Ido M. et al. Transient low level of IgG3 induced by sepsis // Pediatrics International. — 1995. — Vol. 37, N 2. — P. 201–202.
11. Talmor M. Relationship of systemic inflammatory response syndrome to organ dysfunction, length of stay, and mortality in critical surgical illness: effect of intensive care unit resuscitation // Arch. Surg. — 1999. — Vol. 134. — P. 81–87.

Сведения об авторах

Плужникова Наталья Андреевна – аспирант лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН

Анисимова Наталья Юрьевна – старший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, кандидат медицинских наук

Лебединская Ольга Витальевна – доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, доктор медицинских наук (614039, г. Пермь, ул. П. Осипенко, д. 61, кв. 74; e-mail: lebedinska@mail.ru)

Цветков Дмитрий Сергеевич – старший научный сотрудник отдела реанимации интенсивной терапии № 4 ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, кандидат медицинских наук

Годовалов Анатолий Петрович – ассистент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития РФ

Киселевский Михаил Валентинович – д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточного иммунитета ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН

Е.Г. Поленок, Т.П. Аносова, М.П. Аносов, К.С. Красильникова, Е.А. Гуров, В.А. Титов,
Н.Е. Вержбицкая, И.А. Вафин, С.Е. Рагожина, А.Н. Глушков

АНТИТЕЛА К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Институт экологии человека СО РАН (Кемерово)
Областной клинический онкологический диспансер (Кемерово)
Кемеровское патологоанатомическое бюро (Кемерово)
Кемеровский областной центр крови (Кемерово)

Исследованы особенности иммунного ответа на химический канцероген бензо[а]пирен (БП) у мужчин больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Выявлены изотипические различия в образовании антител (АТ) к БП у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми. У мужчин с НМРЛ чаще наблюдаются повышенные уровни IgG АТ-БП. При этом шанс возникновения НМРЛ возрастает почти в 2 раза при высоких уровнях АТ-БП класса G.

Ключевые слова: антитела, бензо[а]пирен, немелкоклеточный рак легкого

ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE IN SERUM OF PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

E.G. Polenok, T.P. Anosova, M.P. Anosov, K.S. Krasilnikova, E.A. Gurov, V.A. Titov,
N.E. Verzhbitskaja, I.A. Vafin, S.E. Ragozhina, A.N. Glushkov

Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo
Regional clinical oncology hospital, Kemerovo
Pathologoanatomic bureau, Kemerovo
Regional centre of blood, Kemerovo

The features of immune response to chemical carcinogen benzo[a]pyrene (Bp) at the patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) are investigated. The isotypical distinctions in formation of antibodies (Ab) to Bp at the men with NSCLC in comparison with healthy are revealed. There were more often observed the high levels of IgG Ab-Bp at the men with NSCLC. Thus risk of occurrence NSCLC grows almost in 2 times at high levels of Ab-Bp of a class G.

Key words: antibodies, benzo[a]pyrene, non-small cell lung cancer

Рак легкого (РЛ) занимает лидирующее место среди онкологических заболеваний. Ежегодно в России заболевают РЛ свыше 63000 человек, при этом 34,2 % выявляются уже в IV стадии заболевания [5]. В структуре онкологической заболеваемости РЛ занимает первое место среди мужского населения и составляет 25 % от всех злокачественных новообразований, доля РЛ среди женщин составляет 4,3 %. Несмотря на новые технологии лечения и возможность раннего выявления, РЛ по-прежнему остается заболеванием с высоким уровнем летальности — пятилетняя выживаемость составляет 10–15 % [1]. По гистологическому типу 80–85 % всех случаев РЛ относится к немелкоклеточному раку легкого (НМРЛ), причем у мужчин доминирует плоскоклеточный тип карциномы, а у женщин чаще диагностируется аденокарцинома [13].

По данным МАИР большинство случаев заболевания РЛ связано с воздействием химических канцерогенов, в том числе полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), представителем которых является бензо[а]пирен (БП) [1, 8, 13]. На сегодняшний день хорошо изучены механизмы его ферментативного окисления и детоксикации в организме человека. Однако роль иммунной системы в регуляции химического гомеостаза низкомолекулярных соединений, в том числе и в

адаптации к БП, изучена недостаточно [10]. Авторами ряда работ [7, 12] в экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что антитела (АТ) к химическим канцерогенам способны тормозить или стимулировать возникновение злокачественных опухолей в зависимости от изотипа и количества. Имеются данные о том, что АТ к аддуктам БП с макромолекулами организма (ДНК, белки) обнаруживаются у работников канцерогеноопасных предприятий с длительной экспозицией к БП [3, 11], у лиц, подверженных воздействию низких доз ПАУ в силу своей профессиональной деятельности [9], у курящих индивидуумов [14] и у больных раком молочной железы и органов желудочно-кишечного тракта [2, 6]. Поэтому изучение роли и функции антител к БП, которые могут иметь диагностическое и прогностическое значение при других онкологических заболеваниях, по-прежнему остается актуальной задачей.

Целью нашей работы было изучить особенности образования АТ к БП у больных НМРЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В обследовании приняли участие 311 мужчин. Из них — 241 мужчина с диагнозом НМРЛ, которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз

НМРЛ в каждом случае был подтвержден морфологически, рентгенологически и эндоскопически. У основной части больных был диагностирован плоскоклеточный рак (69 %), 15 и 12 % составили аденокарцинома и крупноклеточный рак, и 4 % — другие формы НМРЛ. Средний возраст больных НМРЛ $56,9 \pm 4,7$ года.

В группу сравнения вошли условно здоровые мужчины (70 человек), не болеющие РЛ. Средний возраст здоровых мужчин — $50,9 \pm 6,9$ года. Забор периферической крови проводился с информированного согласия участников исследования и в соответствии с этическими нормами Хельсинской декларации (2000 г.). Образцы сыворотки крови обследуемых забирались в аликвоты и хранились при -70°C .

Исследование АТ к БП проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа в собственной модификации [4]. В лунки полистирольных иммунологических планшетов вносили по 100 мкл конъюгата БП с бычьим сывороточным альбумином (БСА, Amresco, США) в натрий-фосфатном буфере (PBS, pH 7,4) в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали при температуре 25°C в течение ночи. Для оценки фонового связывания с белком в отдельные лунки вносили неконъюгированный БСА. Для удаления несвязавшегося конъюгата БП-БСА планшеты промывали 3 раза раствором PBS, содержащим 0,05 % Tween 20 (Amresco, США) (PBST). Для предотвращения неспецифического связывания во все лунки вносили по 250 мкл блокирующего раствора (0,5 % БСА в PBST) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Сыворотки крови разводили блокирующим раствором: для IgA АТ к БП сыворотку разводили 1:20, IgG — 1:100, IgM — 1:50. В лунки вносили по 100 мкл в дуплетах разведенной сыворотки крови, инкубировали в течение 1 ч при 37°C на шейкере. Затем вносили по 100 мкл конъюгата АТ кролика против Ig человека с пероксидазой хрена («Sigma», Германия), инкубировали в течение 1 ч при 37°C на шейкере. После каждого этапа инкубации планшеты промывали 4–5 раз PBST. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ, США), на фотометре (Пикон, Россия) при

длине волны 450 нм. Уровень АТ к БП выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$\text{АТ-БП} = (\text{OD}_{\text{БП-БСА}} - \text{OD}_{\text{БСА}}) / \text{OD}_{\text{БСА}}$$

где $\text{OD}_{\text{БП-БСА}}$ — оптическая плотность связывания с конъюгатом БП-БСА, $\text{OD}_{\text{БСА}}$ — оптическая плотность связывания с БСА. Величина уровня АТ-БП показывала, во сколько раз связывание с канцерогеном превышает связывание с белком-носителем. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью ППК Statistica 6.0. Ненормальный характер распределения показателей определили с помощью критерия Шапиро — Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность вариации и U-критерия Манна — Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Отношение шансов (OR) рассчитывали с доверительным интервалом (CI) при 95 % уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

АТ к БП трех классов (А, G, M) были выявлены как у больных НМРЛ, так и у здоровых мужчин. Однако между группами была обнаружена разница по средним показателям АТ-БП. Так, средний уровень IgG АТ-БП был в 1,3 раза выше у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми мужчинами (медианы: 3,6 против 2,7 соответственно, $p = 0,027$). По средним показателям IgA и IgM АТ-БП сравниваемые группы не отличались.

Далее была проанализирована частота встречаемости низких и высоких уровней АТ-БП в исследуемых группах. Данные представлены в таблице 1. Выяснилось, что у больных НМРЛ чаще встречался высокий уровень IgG АТ-БП (> 2) в отличие от группы сравнения (75 % против 60 % соответственно, $\chi^2 = 5,0$; $p = 0,03$). При этом шанс возникновения онкологического заболевания увеличивается почти в 2 раза (OR = 1,96; 95 % CI 1,1–3,6). Что касается АТ-БП классов А и М, у больных НМРЛ чаще встречались повышенные уровни АТ-БП этих классов (64 % против 36 % соответственно, $\chi^2 = 0,8$; $p = 0,37$), но различия статистически не значимы.

Анализ характера образования АТ-БП в зависимости от курения показал следующее. Между больными НМРЛ и здоровыми мужчинами ку-

Таблица 1
Частота встречаемости низких и высоких уровней АТ-БП у больных НМРЛ и у здоровых мужчин

Показатели	Группа сравнения (n = 70)	Больные НМРЛ (n = 241)	χ^2, p	OR (95 % CI)
	n / %	n / %		
IgA АТ-БП > 2	40/57	154/64	0,8	
≤ 2	30/43	87/36		
IgG АТ-БП > 2	42 /60	180/75	5,0 0,03	1,96 (1,1–3,6)
≤ 2	28/40	61/25		
IgM АТ-БП > 2	40 /57	154/64	0,8	
≤ 2	30/43	87/36		

рящими или некурящими различий выявлено не было. Однако внутри исследуемых групп между курящими и некурящими различия были обнаружены. У курящих больных НМРЛ средние уровни IgA и IgM АТ-БП были в 1,3–1,9 раза выше, чем у некурящих больных (медианы: IgA 2,7 против 1,4 соответственно, $p = 0,04$; IgM 2,7 против 2,1 соответственно, $p = 0,04$). У курящих мужчин группы сравнения средний уровень IgA АТ-БП в 2 раза превышал таковой у некурящих этой же группы (медианы: 2,9 против 1,4 соответственно, $p = 0,02$).

В группе больных НМРЛ у курящих чаще встречались повышенные уровни IgA АТ-БП по сравнению с некурящими больными мужчинами (66 % против 33 % соответственно, $\chi^2 = 3,81$; $p = 0,05$), но различия были не значимы ввиду малой выборки некурящих больных НМРЛ. Так же в группе больных НМРЛ у курящих чаще регистрировались повышенные уровни IgM АТ-БП в отличие от некурящих этой же группы (47 % против 8 % соответственно, $\chi^2 = 5,5$; $p = 0,02$). В группе сравнения тоже были обнаружены различия в частоте встречаемости высоких и низких уровней АТ-БП: у курящих чаще встречались повышенные уровни IgA АТ-БП в отличие от некурящих мужчин этой же группы (70 % против 40 % соответственно, $\chi^2 = 5,1$; $p = 0,02$).

В зависимости от гистологического типа статистически значимые различия между больными НМРЛ и здоровыми мужчинами были выявлены только при плоскоклеточной форме РЛ (рис. 1). Средний уровень IgG АТ-БП у больных плоскоклеточным раком легкого (ПРЛ) был в 1,3 раза выше, чем у здоровых мужчин (медианы: 3,4 против 2,7 соответственно, $p = 0,04$).

У больных ПРЛ чаще встречались высокие уровни IgG АТ-БП (74 % против 60 % соответственно, $\chi^2 = 4,1$; $p = 0,04$). При этом шанс возникновения ПРЛ увеличивается почти в 2 раза ($RR = 1,9$; 95 % CI 1,0–3,6). Высокий уровень IgG АТ-БП наблюдался и у больных крупноклеточным раком легкого, но ввиду малого количества наблюдений различия были статистически мало значимы (83 % против 60 % в группе сравнения, $\chi^2 = 3,81$; $p = 0,05$).

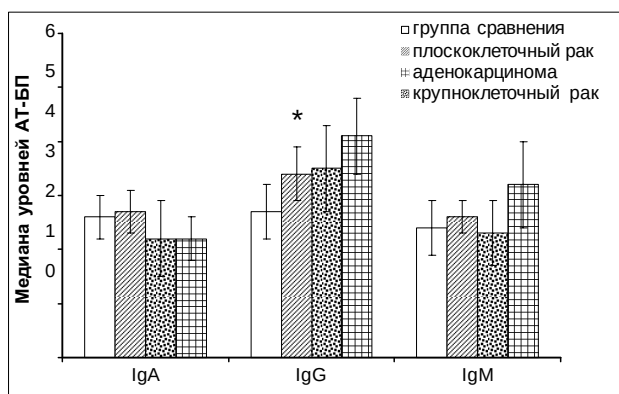


Рис. 1. Медианы уровней АТ-БП классов А, G, М при разных гистологических формах рака легкого. * – значимое отличие от группы сравнения по U-критерию Манна – Уитни ($p = 0,04$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования выявлены изотипические различия в образовании АТ к химическому канцерогену БП у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми мужчинами. У больных НМРЛ чаще наблюдался высокий уровень IgG АТ-БП. При этом шанс возникновения НМРЛ возрастает почти в 2 раза при высоком уровне IgG АТ-БП (> 2). Фактор курения оказывает влияние на средние показатели уровней АТ-БП классов А и М как у здоровых мужчин, так и у больных НМРЛ. У курящих мужчин чаще встречаются повышенные уровни IgA и IgM АТ-БП. Но между курящими больными НМРЛ и здоровыми мужчинами различий по средним показателям уровней АТ-БП трех классов выявлено не было. Определение уровня IgG АТ-БП может иметь диагностическое значение и для определения риска возникновения ПРЛ: при высоких значениях IgG АТ-БП шанс возникновения онкопатологии почти в 2 раза выше. Таким образом, анализ АТ к БП может иметь значение не только для оценки канцерогенной нагрузки, но и для определения индивидуальной чувствительности к ксенобиотикам и канцерогенного риска.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-Кузбасс № 10-04-98003-р_сибирь_a.

ЛИТЕРАТУРА

- Бахлаев И.Е., Толпинский А.П. Рак легкого: учеб. пособие. – Петрозаводск: изд-во ПГУ, 2000. – 74 с.
- Глушков А.Н., Аносова Т.П., Небесная Н.Г. Изотипические особенности антител к полициклическим ароматическим углеводородам у больных раком молочной железы, желудка, толстой и прямой кишки // Эксперимент. онкология. – 1996. – № 18. – С. 426–428.
- Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Мун С.А., Ларин С.А. и др. Антитела к бензо[а]пирену как маркер канцерогенной нагрузки у рабочих углеперерабатывающей промышленности // Гигиена и санитария. – 2010. – № 2. – С. 53–56.
- Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А. и др. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Рос. иммунол. журн. – 2011. – Т. 5. – № 1. – С. 39–44.
- Мерабишвили В.М., Дятченко О.Т. Статистика рака легкого (заболеваемость, смертность, выживаемость) // Прак. онкология. – 2000. – № 3. – С. 3–7.
- Chagnaud J.L., Faiderbe S., Geffard M. Identification and immunochemical characterization of IgA in sera of patients with mammary tumors // Int. J. Cancer. – 1992. – Vol. 50. – P. 395–401.
- Curtis G., Ryan W., Stenback F. Antibody stimulation of benzo[a]pyrene carcinogenesis // Cancer Lett. – 1978. – Vol. 4. – P. 223–228.
- Fucic A., Gamulin M., Ferencic Z., Rokotov D.S. et al. Lung cancer and environmental chemical exposure: a review of our current state of knowledge with

reference to the role of hormones and hormone receptors as an increased risk factor for developing lung cancer in man // Toxicologic Pathology. — 2010. — N 38. — P. 849—855.

9. Galati R., Zijno A., Crebelli R., Falasca G. et al. Detection of antibodies to the benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in sera from individuals exposed to low doses of polycyclic aromatic hydrocarbons // J. Exp. Clin. Cancer Res. — 2001. — Vol. 20, N 3. — P. 359—364.

10. Glushkov A.N. Immunostimulation of the chemical-induced carcinogenesis in the phase of initiation // Medical Hypotheses. — 2002. — Vol. 59, N 5. — P. 501—503.

11. Harris C.C., Vahakangas K., Newman M.J., Trivers G.E. et al. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral blood lympho-

cytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 6672—6676.

12. Moolten F., Schreiber B., Rizzone A. Protection of mice against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin tumors by immunization with a fluorinated analog of carcinogen // Cancer Res. — 1981. — Vol. 41. — P. 452—464.

13. Paggi M.G., Vona R., Abbruzzese C., Malorni W. Gender-related disparities in non-small cell lung cancer // Cancer Letters. — 2010. — Vol. 298. — P. 1—8.

14. Pulera N., Petruzzelli S., Celi A., Puntoni R. et al. Presence and persistence of serum anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct antibodies in smokers: effects of smoking reduction and cessation // Int. J. Cancer. — 1997. — Vol. 70. — P. 145—149.

Сведения об авторах

Поленок Елена Геннадьевна — заведующая лабораторией иммунохимии ИЭЧ СО РАН, кандидат фармацевтических наук (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 74-28-50; e-mail: ihe@list.ru)

Аносова Татьяна Петровна — научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН (650055, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35; тел.: (3842) 54-59-52)

Аносов Михаил Петрович — научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН (650055, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35; тел.: (3842) 54-59-52)

Красильникова Ксения Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 74-15-95)

Гуров Евгений Александрович — ведущий инженер-технолог лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 74-15-95)

Титов Виктор Александрович — заведующий торакальным отделением ФГБУЗ КО Областного клинического онкологического диспансера г. Кемерово (650055, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35; тел.: (3842) 54-18-88)

Вержицкая Наталья Евгеньевна — заведующая патологоанатомическим отделением в ГБУЗ КО ОТ Кемеровском патологоанатомическом бюро (650055, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35; тел.: (3842) 54-65-08)

Вафин Илгиз Ахметович — главный врач ГБУЗ Кемеровского областного центра крови (650050, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 22а; тел.: (3842) 72-16-22)

Рагожина Светлана Егоровна — заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ Кемеровского областного центра крови (650050, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 22а; тел.: (3842) 72-16-22)

Глушков Андрей Николаевич — директор ИЭЧ СО РАН, доктор медицинских наук, профессор (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 57-50-79; e-mail: ssheremetova@rambler.ru)

О.С. Попова ¹, Л.А. Гордеева ¹, И.В. Шаталина ¹, Е.Н. Воронина ², Р.В. Оленникова ³,
С.Л. Нерсисян ³, М.Л. Филиппенко ², А.Н. Глушков ¹

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ ИНФЕКЦИОННОГО ГЕНЕЗА

¹ Институт экологии человека СО РАН (Кемерово)

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

³ Областная клиническая больница (Кемерово)

Изучали ассоциации полиморфизмов генов цитокинов с инфекционной формой невынашиванием беременности. Установили, что у женщин генотип AA гена TNFA (rs1800629) и сочетание генотипов *1/*1 гена IL1RN и GG гена IL6 (rs1800795) вовлечены в патогенез невынашивания беременности.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, невынашивание беременности, инфекция

ASSOCIATIONS OF POLYMORPHISMS IN CYTOKINE GENES WITH THE INFECTIOUS GENESIS OF RECURRENT MISCARRIAGE

O.S. Popova ¹, L.A. Gordeyeva ¹, I.V. Shatalina ¹, E.N. Voronina ², R.V. Olennikova ³,
S.L. Nersesyan ³, M.L. Filippenko ², A.N. Glushkov ¹

¹ Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

³ Kemerovo Regional Clinical Hospital, Kemerovo

The associations of polymorphisms in cytokine genes with the infectious form recurrent miscarriage were investigated. Have established, that at the women a genotype AA of a gene TNFA (rs1800629) and combination of genotypes *1/*1 genes IL1RN and GG of a gene IL6 (rs1800795) are involved in pathogenesis recurrent miscarriage.

Key words: genetic polymorphisms, recurrent miscarriage, infection

Как показали клинические исследования, одной из наиболее частых причин невынашивания беременности (НБ) у женщин может быть урогенитальная бактериально-вирусная инфекция. Между тем, вопрос об этиологической роли инфекции при НБ до сих пор дискутируется. Предполагается, что инфекция, скорее, играет первостепенную роль при спорадическом прерывании беременности, чем при привычном НБ [6]. Имеются данные о том, что инфицированность матери может не нарушать нормального хода беременности и не влияет на развитие плода при отсутствии существенных изменений параметров иммунной системы [3].

Согласно современным представлениям, выживаемость плода зависит от сложной цитокиновой регуляции иммунного ответа матери, при этом во время беременности возникает колеблющееся равновесие между двумя типами цитокинов, которое может смещаться в любом направлении [10]. При нормально развивающейся беременности иммунная система матери более ориентирована на выработку регуляторных цитокинов Т-хелперами II типа (IL-4, IL-10 и др.). Однако исследования показали, что у женщин с НБ цитокиновый профиль направлен на выработку провоспалительных цитокинов Т-хелперами I типа (TNF-α, IL-1 и др.), способных вызывать гибель фетоплацентарной единицы вследствие чрезмерной цитотоксической активации НК-клеток и фагоцитарной активности макрофагов в эндометрии и децидуальной ткани [6].

В настоящее время выявлен полиморфизм генов многих цитокинов. Установлено, что отдельные аллельные варианты генов цитокинов оказывают

влияние на скорость транскрипции, стабильность или качество мРНК, а также активность кодируемых ими белковых продуктов [2]. Взаимосвязь генов цитокинов с НБ активно изучается. Однако, взаимосвязь генов цитокинов с НБ инфекционного генеза остается недостаточно изученной. Поэтому целью настоящего исследования стало изучение ассоциаций полиморфизмов генов цитокинов (IL1B, IL1RN, TNFA и IL6) с НБ инфекционного генеза.

Проведено обследование 153 женщин репродуктивного возраста, проживающих на территории Кемеровской области и принадлежащих к русской этнической группе. Группу сравнения (контроль) составили 116 женщин с физиологическим течением беременности в сроки беременности 15–35 недель, у которых во время настоящей и предыдущих беременностей отсутствовали спонтанные выкидыши и врожденные аномалии развития у плода (ребенка). Средний возраст женщин был 29,6 года.

В исследуемую группу (НБ) были включены 37 женщин с верифицированной урогенитальной инфекцией, обратившихся в Медико-генетическую консультацию г. Кемерово в связи с невынашиванием беременности. Из них 5 женщин были беременными (9–21 недель), настоящая беременность протекала на фоне угрозы прерывания, а 32 женщины были вне беременности и находились на реабилитации после очередного выкидыша. Основанием для включения в эту группу было отсутствие анатомических и гормональных аномалий, нарушений в спермограмме супруга, а также указаний на медицинские аборт, роды, внематочную беременность и наличие в анамнезе 2 или

3 выкидышей. По результатам ДНК-типирования и ИФА 18 женщин (48,6 %) являлись носителями бактериальных инфекций (*Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*), а 19 (51,4 %) женщин были носителями инфекции смешанного генеза (бактерии + вирусы). Средний возраст женщин этой группы был 29,9 года.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью метода фенол — хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом [15], образцы ДНК хранили при -20°C .

В работе исследовали полиморфизмы G(-308) А гена *TNFA* (rs1800629), T(+3953)С гена *IL1B* (rs1143634), G(-174)С гена *IL6* (rs1800795), содержащие однонуклеотидные замены (SNP), и минисателлитные маркеры, характеризующиеся различным числом tandemных повторов (VNTR) во 2 интроне гена *IL1RN*. Тест-системы для молекулярно-генетического анализа данных полиморфизмов были разработаны в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

Генотипирование *TNFA* (rs1800629) проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Зонды отличались по структуре на один нуклеотид, соответствующий SNP (находится в центре олигонуклеотидного зонда). Каждый образец амплифицировался с использованием пары специфических праймеров (5'-TTCCGAGGGGGGTCTTCTG-3' и 5'-GTTCTATCTTTTTCCTGCATCCTGT-3') и двух зондов (5'-FAM-CCCGTCCTCATGCC-RTQ-3' и 5'-R6G-CCCGTCCCATGCC-FQ-3'), несущих «гаситель» на 3'-конце и разные флуоресцентные красители (FAM и R6G) на 5'-конце. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, смесь содержала 40 — 100 нг ДНК; 300 нМ каждого праймера; по 100 — 200 нМ Taqman-зондов, конъюгированных с FAM или R6G; 200 мкМ-ные dNTP, амплификационный буфер, термостабильную Taq-полимеразу — 0,5 ед. акт./реакц.

Амплификация проводилась с помощью амплификатора iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) в следующих условиях: начальная денатурация 3' при 96°C ; затем 40 циклов, включающих денатурацию при 96°C - 8'', отжиг праймеров и последующую элонгацию при 60°C — 35'' (каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала в диапазонах, соответствующим интервалам флуоресценции флуорофоров FAM и R6G).

Полиморфизм генов *IL1RN* (VNTR интрона 2) изучали с помощью аллель-специфичной ПЦР с последующей детекцией в электрофорезе. VNTR аллели в гене *IL1RN*, обозначали следующим образом: аллель *IL1RN**1 содержал четыре tandemных повтора по 86 н.п.; аллель *IL1RN**2 — два tandemных повтора; аллель *IL1RN**3 — пять tandemных повтора; аллель *IL1RN**4 три tandemных повтора.

Типирование SNP полиморфизмов генов *IL1B* (rs1143634) и *IL6* (rs1800795) проводили с помощью

сайт-специфической рестрикции ферментом TaqI (ООО «СибЭнзим», г. Новосибирск) продуктов ПЦР с последующей детекцией в электрофорезе. Детальное описание генотипирования полиморфизмов *IL1B*, *IL1RN*, *IL4* и *IL6* приведено в работах [7, 8].

Частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов, а также соответствие распределения наблюдаемых частот генотипов исследуемых генов теоретически ожидаемым по равновесию Харди-Вайнберга проверяли по критерию χ^2 . Вычисление проводили с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия, <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Попарное сравнение частот генотипов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* и их сочетаний в изучаемых группах проводили при помощи четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность вариации при числе степеней свободы, равном 1, а также двустороннего точного теста Фишера, если значение хотя бы в одной ячейке таблицы сопряженности было меньше 5 (ППП "STATISTICA 6.0", номер серии: № 31415926535897). Ко всем экспериментально установленным значениям уровня значимости была применена поправка Бонферрони. Отличия между группами считали статистически значимыми, если экспериментально установленные значения уровня значимости были меньше уровня значимости по Бонферрони:

$$p < \frac{0,05}{m}$$

где m — количество независимых статистических тестов на уровне значимости α .

Силу ассоциации анализируемых признаков определяли с помощью величины отношения шансов (OR). Для OR рассчитывали доверительный интервал (CI) при 95 % уровне значимости. Ассоциацию считали: отрицательной, если OR было меньше 1; нейтральной (отсутствующей), если OR было равно 1; положительной, если OR было больше 1. Коэффициент OR высчитывали только для значимых по Бонферрони экспериментальных результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ распределения частот генотипов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* у женщин изучаемых групп показал их соответствие ожидаемым частотам при равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Характер распределения частот генотипов генов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR интрон 2), *TNFA* (rs1800629) и *IL6* (rs1800795) у женщин изучаемых групп в нашем исследовании в целом соответствовал результатам других авторов относительно характера их распределения у жителей Западной Сибири [5, 9].

На первом этапе методом «случай-контроль» отдельно изучали ассоциации материнских генотипов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR интрон 2), *TNFA* (rs1800629) и *IL6* (rs1800795) с НБ инфекционного генеза. Данные представлены в таблице 1.

Наше исследование показало, что отдельно для полиморфных вариант генов *IL1B*, *IL1RN* и *IL6*

статистически значимые ассоциации с НБ инфекционного генеза у женщин отсутствовали (табл. 1). В то же время установлена единственная высоко значимая положительная ассоциация генотипа AA гена *TNFA* (rs1800629) с НБ инфекционного генеза. Так генотип AA гена *TNFA* значимо чаще встречался у женщин группы НБ в отличие от женщин контрольной группы (21,8 % против 0 %, соответственно; $\chi^2 = 13,70$, $p = 0,0004$, с учетом поправки Бонферрони $p_{\text{cor}} = 0,0016$). Носители этого генотипа имели высокую вероятность развития НБ инфекционного генеза, значение OR для них составило 47,3 (CI 95%: 20,6 – 108,3).

На втором этапе изучали ассоциации сочетаний генотипов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR интрон 2), *TNFA* (rs1800629) и *IL6* (rs1800795) у женщин с НБ инфекционного генеза. При сопоставлении частот комбинаций генотипов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* в группе НБ и контроль было установлено, что для четырехчленных и трехчленных комбинаций генотипов изучаемых генов цитокинов какие-либо ассоциации с НБ отсутствовали. Однако при сопоставлении двухчленных комбинаций генотипов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* была выявлена единственная значимая положительная ассоциация сочетания

генотипа *IL1RN**1/*1 с генотипом GG гена *IL6*. Сочетание генотипа *IL1RN**1/*1 с GG гена *IL6* чаще выявлялось у женщин группы НБ, чем в контрольной группе (55,6 % против 13,8 % в контроле, $\chi^2 = 11,63$, $p = 0,0006$, с учетом коррекции по Бонферрони (18 статистических тестов) $p_{\text{cor}} = 0,011$). Сочетание генотипов *1/*1 гена *IL1RN* и GG гена *IL6* может в 7,3 раза повышать вероятность развития НБ инфекционного генеза у женщин (CI 95 %: 3,2 – 16,7).

Выявленная нами ассоциация генотипа AA гена *TNFA* (rs1800629) с НБ инфекционного генеза согласуется с данными литературы, где ранее сообщалось о связи аллеля (-308)A гена *TNFA* с НБ (мета-анализ) [14], с преждевременными родами у женщин с бактериальным вагинозом [13], а также с развитием эндотелиальной дисфункции у женщин при гестозе [4].

Следует отметить, что в литературе дискутируется взаимосвязь генотипов *1/*1 гена *IL1RN* и GG гена *IL6* с НБ. С одной стороны, в качестве маркера НБ у женщин чаще рассматривается генотип *2/*2 гена *IL1RN* [11]. С другой стороны, выявлено, что женщины с генотипом *1/*1 имеют низкую концентрацию вагинального белка IL1-Ra [11]. Предполагается, что они могут быть более чувствительны к инфекции и

Таблица 1

Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов генов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* у женщин с физиологическим течением беременности и женщин с НБ инфекционного генеза

Группа	IL1B (rs1143634)			
	Генотипы			
	ТТ	СТ	СС	
контроль	6 (5,2)	45 (38,8)	65 (56,0)	
НБ	2 (5,4)	16 (43,2)	19 (51,4)	
уровень статистической значимости, <i>p</i>	1,000	0,7729	0,7575	
Группа	IL1RN (VNTR, интрон 2)			
	Генотипы			
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2
контроль	65 (48,8)	44 (40,1)	0	6 (7,0)
НБ	19 (55,9)	13 (38,2)	2 (5,4)	2 (5,9)
уровень статистической значимости, <i>p</i>	0.8960	0.8429	0.0556	1.0000
Группа	TNFA (rs1800629)			
	Генотипы			
	AA	GA	GG	
контроль	0	20 (25,3)	59 (76,7)	
НБ	5 (21,8)	7 (30,4)	11 (47,8)	
уровень статистической значимости, <i>p</i>	0,0004 <i>cor 0,0016</i>	0,8250	0,0287 <i>cor 0,115</i>	
Группа	IL6 (rs1800795)			
	Генотипы			
	CC	GC	GG	
контроль	40 (34,5)	57 (49,1)	19 (16,4)	
НБ	6 (16,2)	18 (48,6)	13 (35,2)	
уровень статистической значимости, <i>p</i>	0,5690	0,8910	0,0271 <i>cor 0,108</i>	

Примечание: в скобках указана доля генотипов (%) от общего числа обследованных в данной группе.

повышенной секреции других провоспалительных цитокинов, и это, в свою очередь, отражается на ранних потерях плода или преждевременных родах [14]. У женщин генотип GG гена *IL6* (rs1800795) связан с высоким риском преждевременных родов, не имеющих ассоциации с внутриутробной инфекцией [12], однако, его связь с НБ обсуждается [16]. Установлено, что люди с генотипом GG гена *IL6* (rs1800795) характеризуются высокими плазматическими уровнями белка IL-6 - основного медиатора воспаления, при этом сам генотип GG является маркером ряда аутоиммунных и воспалительных заболеваний [1]. Исходя из данных литературы и собственных результатов, является очевидным, что репродуктивные потери у женщин с сочетанием *IL1RN**1/*1, *IL6**GG могут быть связаны с их генетически детерминированной высокой восприимчивостью к урогенетальной инфекции, при этом данное сочетание может более, чем в 7 раз повышать вероятность развития НБ инфекционного генеза у женщин.

В целом, полиморфные варианты генов *TNFA* (rs1800629), *IL1RN* (VNTR интрон 2), и *IL6* (rs1800795) вносят определенный вклад в развитие инфекционной формы НБ. В дальнейшем планируется провести такую работу на больших выборках с привлечением большего спектра генов-модификаторов иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова С.В. Роль полиморфизма генов цитокинов в развитии заболеваний печени // Сучасна гастроентерология. — 2004. — № 5. — С. 15—20.
2. Громова А.Ю., Симбирцев А.С. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека // Цитокины и воспаление. — 2005. — № 4. — С. 3—12.
3. Левкович М.А. Современные представления о механизмах формирования иммунного ответа при угрозе прерывания беременности инфекционного генеза // Рос. иммунол. журн. — 2010. — № 4. — С. 415.
4. Радьков О.В., Калинин М.Н., Заварин В.В. Влияние полиморфизма генов цитокинов на формирование дисфункции эндотелия при гестозе // Цитокины и воспаление. — 2010. — № 3. — С. 15—18.
5. Рудко А.А., Кондратьева Е.И., Янкина Г.Н. Полиморфизм генов-модификаторов иммунного ответа: влияние на развитие целиакии и варианты ее клинического течения в Томской области // Молекулярная биология. — 2008. — № 1. — С. 42—49.

Сведения об авторах

Попова Ольга Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН (650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, д. 10; тел.: (3842)545952; e-mail: olmak06@mail.ru)

Гордеева Людмила Александровна — заведующая лабораторией иммуногенетики ИЭЧ СО РАН, кандидат биологических наук (650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, д. 10; тел.: (3842)545952; e-mail: gorsib@rambler.ru, ihe@kemtel.ru)

Шаталина Ирина Викторовна — инженер-технолог лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН (650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, д. 10; тел.: (3842)545952; e-mail: ihe@kemtel.ru)

Нерсисян Светлана Львовна — заведующая медико-генетической консультации КОКБ (650000, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 22; тел.: 8 (3842) 396023)

Оленникова Римма Витальевна — врач-генетик КОКБ Медико-генетическая консультация (650000, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 22; тел.: 8 (3842) 396023)

Филипенко Максим Леонидович — заведующий группой фармакогеномики ИХБФМ СО РАН, кандидат биологических наук (630090, г. Новосибирск, пр-т Академика М.А. Лаврентьева, д. 8; тел.: (383-3)33-35-71, (383-3)33-35-71; e-mail: max@niboch.nsc.ru)

Глушков Андрей Николаевич — директор ИЭЧ СО РАН, доктор медицинских наук (650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, д. 10; тел.: (3842) 575079)

6. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. — М.: Триада Х, 2002. — 305 с.

7. Шабалдин А.В., Гордеева Л.А., Глушкова О.А. Полиморфизм генов HLA DRB1*, IL1Ra*, и IL1β у женщин с репродуктивными нарушениями // Рос. иммунол. журн. — 2008. — № 1. — С. 63—69.

8. Шабалдин А.В., Гордеева Л.А., Глушкова О.А. Ассоциации сочетаний генов HLA DRB1*, IL4*, IL6* с репродуктивными потерями у женщин // Иммунология. — 2008. — № 3. — С. 132—137.

9. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коломейчук М.Ю. Полиморфизм промоторного региона генов IL-4, IL-6 и IL-10 у пациенток с раком молочной железы // Мед. иммунология. — 2009. — № 11. — С. 21—28.

10. Ширшев С.В. Механизмы иммунноэндокринного контроля процессов репродукции. — Екатеринбург: УрО РАН, 2002. — Т. 2. — 557 с.

11. Barton P.T., Gerber S., Skupski D.W., Witkin S.S. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism, vaginal Interleukin-1 receptor antagonist concentrations, and vaginal Ureaplasma urealyticum colonization in pregnant women // Infect. Immun. — 2003. — Vol. 71 (1). — P. 271—274.

12. Hartel Ch., Finas D., Ahrens P. Polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery // Mol. Hum. Reprod. — 2004. — Vol. 10, N 12. — P. 911—915.

13. Macones G.A., Parry S., Elkousy M. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth // Am. J. Obstet. Gynecol. — 2004. — Vol. 190. — P. 1504—1508.

14. Medica I. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage — a meta-analysis // Reproductive BioMedicine Online. — 2009. — N 3. — P. 406—414.

15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. In: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor, Lab. Press., 1989. — P. 17—19.

16. Unfried G., Bocskor S., Endler G. A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage // Hum. Reprod. — 2003. — Vol. 18. — P. 267—270.

17. Witkin S.S., Gerber S., Ledger W.J. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease // Clin Infect Dis. — 2002. — Vol. 34. — P. 204—209.

А.А. Савченко, Д.Э. Здитовецкий, А.Г. Борисов, Н.А. Лузан

**ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА
У БОЛЬНЫХ С РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ****НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)
Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск)**

Исследованы иммунологические показатели у больных с распространенным гнойным перитонитом (РГП). Установлено, что при РГП выявляется дисбаланс в иммунной системе, который характеризуется недостаточностью клеточного звена и повышением активности гуморального. Состояние клеточного звена иммунной системы при РГП определяется снижением количества Т- (прежде всего за счет фракций цитотоксических Т-лимфоцитов и экспрессирующих маркер поздней активации), NK- и NKT-клеток. При этом в периферической крови больных РГП повышается содержание Th₂-клеток и B1-лимфоцитов. Состояние гуморального звена иммунной системы при РГП характеризуется повышением содержания IgA и IgG. С помощью корреляционного анализа и раздельным определением энтропии фенотипического состава лимфоцитов и иммуноглобулинов установлено повышение регуляторного влияния на гуморальное звено иммунной системы.

Ключевые слова: перитонит, лимфоциты, иммуноглобулины

**FEATURES OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH EXTENSIVE
PURULENT PERITONITIS**

A.A. Savchenko, D.E. Zditovetskiy, A.G. Borisov, N.A. Luzan

**Research Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk
State Medical University named after V.F. Voino-Yasenetskiy, Krasnoyarsk**

We investigated immunological parameters in patients with extensive purulent peritonitis (EPP). It is established that the EPP revealed an imbalance in the immune system, which is characterized by a deficiency of cellular part and increased activity of the humoral. Status of cellular immunity is determined by the decrease in the EPP number of T- (primarily through fractions of cytotoxic T-lymphocytes and expressing of late activation marker), NK- and NKT-cells. In the peripheral blood of patients with EPP increases the content of Th₂-cells and B1-lymphocytes. Status humoral immunity in the EPP is characterized by increased Ig A and Ig G levels. With the help of correlation analysis and the separate definition of the entropy of the lymphocytes phenotypic composition and immunoglobulins found an increase in regulatory effect on the humoral immunity.

Key words: peritonitis, lymphocytes, immunoglobulins

Несмотря на достижения в медицине летальность при распространенном гнойном перитоните (РГП), являющаяся главным критерием оценки эффективности применяемых способов лечения, удерживается на уровне 20–30 %, достигая наиболее высоких цифр (50 % и более) при третичном перитоните и перитоните, сопровождающемся развитием полиорганной недостаточности (ПОН) и септического шока [3, 14]. В связи с этим, появляется необходимость поиска новых методов лечения данной патологии.

Активное участие системы иммунитета во многих жизненно важных процессах организма приводит к тому, что нарушения иммунореактивности обуславливают широкое как функциональное, так и структурное (патоморфологическое) многообразие проявлений патологий человека [5]. Показано, что перитонит протекает на фоне иммунодефицита, а в терминальной стадии (полиорганной недостаточности) иммунная недостаточность наиболее выражена [6, 8]. Предполагается, что нарушения в иммунной системе могут иметь решающее значение для возникновения различных осложнений заболевания. В связи с этим, только детальное изучение иммунопатогенеза РГП позволит разработать эффективные методы иммуноактивной терапии.

Целью данного исследования явилось изучение зависимости иммунологических показателей у больных РГП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением находились 50 больных с РГП (22 мужчин и 28 женщин) внебольничного и госпитального происхождения, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии МУЗ «ГКБ № 6 имени Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил $54,2 \pm 19,2$ года. Из исследования были исключены больные, у которых РГП был осложнением панкреонекроза, неоперабельных онкологических заболеваний органов брюшной области и неоперабельного нарушения мезентериального кровообращения. Исходную степень тяжести больных определяли по шкале SAPSII [11]. Тяжесть РГП исходно определяли по Мангеймскому индексу перитонита (МИП) и индексу брюшной полости (ИБП) [1, 12]. Наличие и степень выраженности ПОН исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [13]. При оценке тяжести синдрома системной воспалительной реакции (CCBP) мы придерживались критериев ACCP/SCCM [7]. В качестве контроля обследовано 135

здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующих панелях: CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5, CD3-FITC/HLA-DR-PE/CD25-PC5/CD45-PC7, CD4-FITC/CD294-PE/CD45-PC7, CD19-FITC/CD5-PE/CD45-FITC, CD95-FITC/CD19-PE/CD45-PC7. Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора OptiLyse C (Beckman Coulter, USA). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA). Концентрацию иммуноглобулинов А, М и G в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в агарозном геле по Манчини.

Дополнительно в качестве критерия неопределенности состояния клеточного и гуморального звена иммунной системы высчитывали энтропию популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов (энтропия лимфоцитов) и энтропию концентрации основных классов иммуноглобулинов (энтропия иммуноглобулинов) [4].

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна — Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические проявления ССВР перед первичной операцией по поводу РГП отмечались у 47 (94,0 ± 3,4 %) больных. Преобладали больные с тяжелыми проявлениями ССВР (тяжелый сепсис и септический шок) — 34 (68,0 ± 6,6 %). Тяжесть состояния по шкале SAPS II составила 29 (16; 37) балла. Выраженность ПОН по шкале SOFA составила 2 (1; 4) балла.

Интраоперационная оценка тяжести РГП дала следующие результаты: МИП в среднем составил 28 (25; 33), ИБП в среднем 14 (13; 14). С учетом интраоперационной оценки тяжести РГП у 29 (58,0 ± 7,0 %) больных применен «полуоткрытый» метод хирургического лечения РГП с этапными ревизиями и санациями брюшной полости в программном режиме с интервалом 36 — 48 часов.

При исследовании иммунологических показателей обнаружено, что у больных РГП значительно повышено количество лейкоцитов в перифери-

ческой крови, но при снижении процентного содержания лимфоцитов и абсолютного количества $CD3^+$ -клеток (табл. 1). Кроме того, у больных РГП выявляется понижение относительного и абсолютного количества $CD3^+CD8^+$ - и $CD3^+HLA-DR^+$ -лимфоцитов, а также определяется снижение процентного уровня $CD4^+CD294^+$ -клеток. При исследовании состояния В-клеточного звена иммунной системы обнаружено 2-кратное повышение процентного количества $CD19^+CD5^+$ -лимфоцитов. Состояние клеточного звена иммунной системы у больных РГП также характеризуется снижением относительного и абсолютного количества $CD6^+CD56^+$ -клеток ($p = 0,046$ и $p = 0,001$, соответственно) и абсолютного уровня $CD3^+CD56^+$ -лимфоцитов ($p = 0,033$).

При исследовании содержания в сыворотке крови основных классов иммуноглобулинов и их уровня синтеза обнаружено, что у больных РГП в 1,9 раза повышена концентрация Ig А и в 1,4 раза — концентрация IgG. При этом у больных РГП наблюдается 2-кратное повышение уровня относительного синтеза IgA.

Анализ результатов полученных результатов позволяет определить, что у больных РГП в периферической крови на фоне выраженного повышения количества лейкоцитов (в 2,4 раза) наблюдается снижение процентного содержания лимфоцитов. При этом обнаружена отрицательная взаимосвязь между абсолютным уровнем лимфоцитов и ИБР ($r = -0,36$, $p = 0,045$).

Фенотипический состав лимфоцитов в крови у больных РГП характеризуется снижением абсолютного количества Т-лимфоцитов и повышением содержания В1-клеток. В1-лимфоциты являются минорной фракцией В-клеток крови, локализуются преимущественно в брюшной и плевральной полостях, синтезируют Ig М и Ig А к бактериальным антигенам [2, 5]. Особенностью В1-клеток также является их способность выполнять роль антиген-презентирующих клеток. Состояние Т-клеточного иммунитета у больных характеризуется снижением относительного и абсолютного количества цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-клеток с маркером поздней активации (HLA-DR-рецептор). Кроме того, при РГП обнаружено повышение в периферической крови процентного уровня Th_2 -клеток ($CD4^+CD294^+$ -лимфоциты). Th_2 -лимфоциты, вырабатывая комплекс цитокинов (прежде всего, интерлейкин-3, интерлейкин-4, интерлейкин-5), стимулируют пролиферацию активированных В-лимфоцитов, тем самым стимулируя гуморальный иммунитет [5, 10]. Необходимо отметить, что только у больных РГП обнаружена положительная взаимосвязь между количеством В1-клеток и уровнем Th_2 -лимфоцитов ($r = 0,60$, $p = 0,023$). Более того, только у больных с РГП выявляется взаимосвязь относительного количества Th_2 -лимфоцитов с процентным содержанием $CD3^+CD25^+$ -клеток ($r = 0,69$, $p < 0,001$). Следовательно, иммунопатогенез РГП характеризуется регуляторными процессами, при которых уровень экспрессии

Таблица 1

Иммунологические показатели больных РГП (Me, C₂₅ – C₇₅)

Показатели	Контроль, n = 156		Перитонит, n = 50		p
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,75	4,75–7,50	13,75	9,00–16,25	< 0,001
Лимфоциты, %	36,0	29,0–45,0	12,5	10,0–17,0	< 0,001
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2,11	1,52–2,75	1,75	1,38–2,57	
CD3 ⁺ , %	66,9	60,0–72,0	66,2	55,9–71,1	
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	1,34	0,96–1,83	1,07	0,84–1,53	0,049
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	42,0	34,0–48,0	40,0	31,0–45,6	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,80	0,53–1,19	0,61	0,48–0,99	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	27,0	21,0–33,0	21,8	16,7–27,0	0,007
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,56	0,36–0,82	0,37	0,20–0,60	0,003
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	11,9	7,0–16,5	14,3	6,3–31,3	
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,17	0,11–0,34	0,27	0,09–0,58	
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	15,0	9,8–20,0	3,6	2,2–7,2	< 0,001
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /л	0,33	0,22–0,50	0,05	0,04–0,13	< 0,001
CD4 ⁺ CD294 ⁺ , %	12,6	11,9–15,0	24,4	8,8–32,5	0,047
CD4 ⁺ CD294 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,49	0,17–0,59	0,37	0,20–0,70	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,50	1,11–1,93	1,75	1,30–2,43	
CD19 ⁺ , %	14,0	9,0–17,0	14,9	11,3–18,0	
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,26	0,17–0,39	0,24	0,18–0,39	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	0,9	0,6–1,0	1,8	1,0–2,9	0,012
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,02	0,01–0,04	0,03	0,02–0,06	
CD19 ⁺ CD95 ⁺ , %	0,7	0,1–0,9	1,0	0,1–1,4	
CD19 ⁺ CD95 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,01	0,005–0,02	0,01	0,005–0,03	
CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	19,0	13,5–22,0	14,5	9,2–19,2	0,046
CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,39	0,25–0,55	0,19	0,12–0,39	0,001
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , %	4,6	2,6–11,18	4,5	1,9–8,5	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,19	0,07–0,32	0,07	0,03–0,19	0,033
IgA, г/л	2,07	1,32–3,20	3,85	2,54–4,61	< 0,001
IgM, г/л	1,20	0,58–1,80	0,72	0,58–1,23	
IgG, г/л	11,11	8,60–15,00	15,50	8,23–21,70	0,016
IgA/CD19 ⁺ , нг/клетку	7,14	4,02–14,56	14,02	8,55–19,52	0,004
IgM/CD19 ⁺ , нг/клетку	4,68	2,45–9,17	3,02	2,65–5,54	
IgG/CD19 ⁺ , нг/клетку	44,64	26,57–73,68	55,10	27,11–97,63	

маркера ранней активации Т-клеток совпадает с изменением содержания в крови больных V1- и Th₂-лимфоцитов.

Состояние клеточного звена иммунитета при РГП также характеризуется снижением количества NK- и NKT-клеток. NKT-лимфоциты относят к клеткам врожденного иммунитета [5, 9]. Помимо цитотоксической функции они являются практически единственным источником интерферона- γ на первом этапе реакции внедрения патогенов.

Состояние гуморального звена иммунной системы при РГП характеризуется увеличением концентрации IgA и IgG, а также уровнем от-

носительного синтеза IgA. Данная гуморальная реакция определяется поражением слизистых при РГП с наличием бактериальной инфекции. Выявляются особенности корреляционных взаимосвязей между гуморальным и клеточными звеньями иммунной системы в контроле и при РГП. Так, у лиц контрольной группы не выявлены взаимосвязи между содержанием лимфоцитов различного фенотипа и концентрацией иммуноглобулинов различных классов, тогда как при РГП обнаружена отрицательная взаимосвязь между процентным содержанием CD3⁺CD4⁺-клеток и концентрацией Ig G ($r = -0,45$, $p = 0,033$). Также

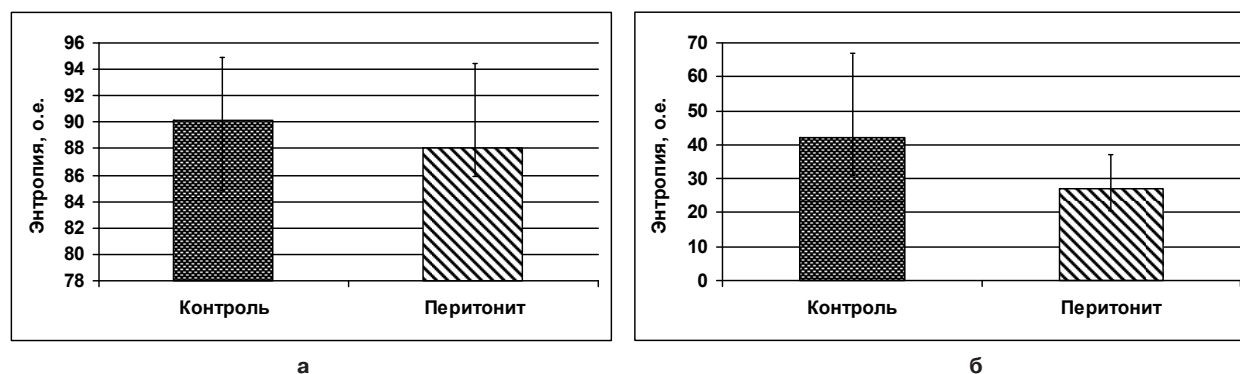


Рис. 1. Уровни энтропии клеточного (а) и гуморального (б) звеньев иммунной системы в контроле и при РГП.

необходимо отметить, что если у лиц контрольной группы с уровнями относительного синтеза IgA, IgM и IgG отрицательно коррелирует относительное количество $CD3^+CD4^+$ -лимфоцитов (соответственно, $r = -0,17$, $p = 0,046$; $r = -0,28$, $p < 0,001$; $r = -0,22$, $p = 0,010$), то у больных РГП процентное содержание $CD3^+CD8^+$ -клеток положительно взаимосвязано с уровнями относительного синтеза IgA и IgG (соответственно, $r = 0,48$, $p = 0,029$ и $r = 0,55$, $p = 0,009$). У лиц контрольной группы с уровнем содержания В-лимфоцитов в крови положительно взаимосвязано количество $CD3^+CD8^+$ - и $CD16^+/56^+$ -клеток (соответственно, $r = 0,20$, $p = 0,010$ и $r = 0,16$, $p = 0,039$). В то же время, у больных РГП выявляются положительные взаимосвязи процентного содержания В-лимфоцитов с относительным количеством $CD3^+CD4^+$ -клеток ($r = 0,41$, $p = 0,027$), активированных Т-клеток ($r = 0,40$, $p = 0,035$) и соотношением $CD4^+/CD8^+$ ($r = 0,46$, $p = 0,015$). Следовательно, у больных РГП наблюдается усиление регуляторного влияния клеточного звена на гуморальный иммунитет. При этом также появляются взаимосвязи между эффекторными показателями клеточного и гуморального иммунитета (между содержанием цитотоксических Т-лимфоцитов и уровнями относительного синтеза иммуноглобулинов).

Используя в качестве обобщенного показателя дестабилизации клеточного и гуморального иммунитета энтропию, установлено, что энтропия популяционного состава лимфоцитов при РГП не отличается от контрольного диапазона, тогда как энтропия гуморального звена иммунной системы у больных РГП в 1,6 раза ниже, чем в контрольной группе (рис. 1). Обращает внимание, что энтропия клеточного звена иммунной системы значительно выше, чем гуморального (как в группе контроля, так и при РГП). Кроме того, если коэффициент вариации клеточного звена в контроле составляет 7,7 и при РГП — 18,5, то коэффициент вариации гуморального иммунитета у лиц контрольной группы составляет 73,5 и при РГП — 58,3. Такое соотношение уровней энтропии характеризует большую регуляторную зависимость гуморального звена иммунной системы, которая значительно возрастает при РГП, что связано с иммунопатогенезом

заболевания и, соответственно, высоким уровнем скоординированности гуморальных реакций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у больных РГП выявляется дисбаланс в иммунной системе, который характеризуется недостаточностью клеточного звена и повышением активности гуморального. Состояние клеточного звена иммунной системы при РГП определяется снижением количества Т- (прежде всего за счет фракций цитотоксических Т-лимфоцитов и экспрессирующих маркер поздней активации), NK- и NKT-клеток. При этом в периферической крови больных РГП повышается содержание Th_2 -клеток и В1-лимфоцитов. Состояние гуморального звена иммунной системы при РГП характеризуется повышением содержания IgA и IgG. С помощью корреляционного анализа и отдельным определением энтропии фенотипического состава лимфоцитов и иммуноглобулинов установлено повышение регуляторного влияния на гуморальное звено иммунной системы. Полученные результаты исследования определяют необходимость стимулировать клеточное звено иммунной системы для повышения эффективности лечения и восстановления после острого воспалительного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савельев В.С., Филимонов М.И., Гельфанд Б.Р. Программируемый перитонеальный лаваж в лечении распространенного перитонита // *Анналы хирургии*. — 1996. — № 3. — С. 25–29.
2. Сидорова Е.В. В-1 лимфоциты. Происхождение, дифференцировка, функции // *Успехи современной биологии*. — 2009. — Т. 129, № 1. — С. 27–38.
3. Суковатых Б.С., Блинков Ю.Ю., Букреева А.Е. Применение иммобилизованных форм гипохлорита натрия в комплексном лечении распространенного гнойного перитонита // *Вестн. хирургии им. И.И. Грекова*. — 2011. — Т. 170, № 6. — С. 32–36.
4. Тихончук В.С, Ушаков И.Б., Карпов В.Н., Зуев В.Г. Возможности использования интегральных показателей периферической крови человека // *Воен.-мед. журн.* — 1992. — № 3. — С. 27–31.

5. Ярилин А.А. Иммунология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.
6. Bierhoff M., Krutwagen E., van Bommel E.F., Verburgh C.A. Listeria peritonitis in patients on peritoneal dialysis: two cases and a review of the literature // Neth. J. Med. — 2011. — Vol. 69, N 10. — P. 461 — 464.
7. Bone R.S., Balk R.A.B., Cerra F.B. American college of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis // Crit. Care Med. — 1992. — Vol. 20, N 6. — P. 864 — 874.
8. Broughton A., Verger C., Goffin E. Pets-related peritonitis in peritoneal dialysis: companion animals or Trojan horses? // Semin. Dial. — 2010. — Vol. 23, N 3. — P. 306 — 316.
9. Godfrey D.I., Rossjohn J. New ways to turn on NKT cells // J. Exp. Med. — 2011. — Vol. 208, № 6. — P. 1121 — 1125.
10. Harris N., Gause W.C. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminthes // Trends Immunol. — 2011. — Vol. 32, N 2. — P. 80 — 88.
11. Le Gall J.-R., Lemeshow S., Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study // JAMA. — 1993. — Vol. 270. — P. 2957 — 2963.
12. Linder M.M., Wacha H., Feldmann U. Der Mannheimer Peritonitis-Index. Ein Instrument zur intraoperativen Prognose der Peritonitis // Chirurg. — 1987. — N 58. — P. 84 — 91.
13. Vincent J.L., Moreno R., Takala J. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine // Intensive Care Med. — 1996. — Vol. 22, N 7. — P. 707 — 710.
14. Wiest R., Krag A., Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond // Gut. — 2012. — Vol. 61, N 2. — P. 297 — 310.

Сведения об авторах

Савченко Андрей Анатольевич — руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии им. проф. А.Т. Пшоники ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел.: (3912) 125-263; e-mail: aasavchenko@yandex.ru)

Здзитовецкий Дмитрий Эдуардович — заведующий кафедрой хирургических болезней им. проф. Ю.М. Лубенского ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», кандидат медицинских наук, доцент

Борисов Александр Геннадьевич — ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, кандидат медицинских наук

Лузан Наталья Алексеевна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН

П.В. Сарап¹, А.А. Останин², Ю.С. Винник³**КЛАСТЕРНАЯ СТРУКТУРА ОРГАНИЗАЦИИ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ
С УРГЕНТНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ**¹Городская клиническая больница № 6 им. Н.С. Карповича (Красноярск)²НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)³Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск)

Иммунная система пациентов с ургентной хирургической патологией подвержена воздействию множества повреждающих факторов. Их действие приводит к формированию отдельных кластеров с центрами в точках, соответствующих оптимальным характеристикам иммунной системы. Дистанция от центра кластера (ДК) тесно связана с состоянием пациента. С целью охарактеризовать особенности показателей состояния пациентов в центральных и периферических областях кластеров обследованы 442 пациента с экстренной патологией органов брюшной полости. С использованием количества CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ лимфоцитов выделены 6 кластеров иммунного статуса. Проведено сравнение показателей пациентов, принадлежавших к центральному и периферическому квантилям одного кластера. Результаты исследования показывают, что периферические области кластеров характеризуются большими значениями показателей интоксикации и тяжести состояния. Показатели свидетельствуют о большей напряженности иммунной системы и вегетативной регуляции на периферии кластеров. Кластерная принадлежность и ДК — важные критерии для оценки тяжести состояния пациентов и оптимизации методов лечения.

Ключевые слова: иммунитет, ургентная хирургия, кластерный анализ

**CLUSTER STRUCTURE OF ORGANIZATION OF IMMUNE STATUS
IN PATIENTS WITH URGENT SURGICAL PATHOLOGY**P.V. Sarap¹, A.A. Ostanin², Y.S. Vinnik³¹City Clinical Hospital N 6 named after N.S. Karpovich, Krasnoyarsk²Institute of clinical immunology SB RAMS, Novosibirsk³Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voino-Yasenskiy, Krasnoyarsk

The immune system of patients with urgent surgical pathology is affected by multiple damaging factors. Their action leads to the formation of separate clusters with centers at points corresponding to the optimal characteristics of the immune system. The distance from the cluster center (DC) is closely related to the patient. In order to characterize the features of indicators of the patients in the central and peripheral areas of clusters 442 patients with urgent abdominal pathology were examined. Using the number of CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ lymphocytes allocated six clusters of immune status. We compared the patients belonging to the central and peripheral quantiles of each cluster. The results show that the peripheral area of the clusters are characterized by high values of indicators of intoxication and severity of the condition. Indicators show most intensity of the immune system and autonomic regulation in the periphery of the clusters. Cluster membership and DC are important criteria for evaluating the severity of the patients and to optimize treatment methods.

Key words: immune system, urgent surgery, cluster analysis

Иммунная система пациентов с ургентной хирургической патологией подвержена воздействию множества повреждающих факторов. Нарушения иммунного статуса определяют характер течения послеоперационного периода, исход заболевания и сроки выздоровления [8, 13]. Совершенствование методов лечения этой категории пациентов невозможно без коррекции иммунного статуса. Разработка методов коррекции иммунных нарушений, требует более детального изучения патогенетических особенностей функционирования иммунной системы.

Современные методы системного анализа позволяют с новых позиций рассмотреть организацию иммунного ответа [9, 12]. Формирование взаимосвязей внутри систем происходит при участии внешних факторов. Для компенсации влияний извне элементы системы стремятся приобрести оптимальные характеристики [5]. В результате этого в областях с оптимальными характеристиками появляются сгу-

щения данных — кластеры, состоящие из элементов системы с относительно сходными свойствами. Дистанция показателей от центра кластера (ДК) связана характеристиками элементов [15].

Ранее мы показали, что с увеличением ДК тяжесть состояния пациентов увеличивается [14]. Это позволило сделать вывод о том, что области, близкие к центрам кластеров, характеризуются меньшей тяжестью состояния пациентов [14]. В связи с этим становится актуальным изучение различий показателей состояния пациентов в центральных и периферических областях кластеров.

Цель исследования: охарактеризовать особенности показателей состояния пациентов в центральных и периферических областях кластеров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 442 пациента с экстренной патологией органов брюшной полости, требовавшей

экстренного оперативного лечения. Среди них — пациенты с перфоративными язвами желудка и двенадцатиперстной кишки — ДПК (162 человек, 36,6 %), проникающими ранениями с повреждением органов брюшной полости (73, 16,5 %), панкреонекрозами (45, 10,2 %), острой спаечной кишечной непроходимостью (70, 15,8 %), деструктивными формами аппендицита (31,7 %), у 104 пациентов, включая вышеперечисленных, наблюдались другие острые воспалительные процессы (23,5 %). Перитонит и абдоминальный сепсис наблюдался у 292 человек (66,1 %). В то же время изменения состава лейкоцитов крови, соответствующие синдрому системной воспалительной реакции (ССВР), отмечены на момент исследования только у 54 пациентов (12,2 %). Госпитальная пневмония развилась у 11 пациентов (2,5 %), полиорганная недостаточность — у 59 больных (13,3 %). Выздоровевших пациентов — 381 (86,2 %), в 61 случае (13,8 %) заболевание закончилось летальным исходом. Пациенты обследованы в течение первых двух суток с момента операции, а также на 5—7-е и 10—12-е сутки послеоперационного периода. В исследование включены 949 результатов обследований. Интегральную оценку тяжести состояния пациентов проводили в динамике с помощью шкал *Apache II*, *SAPS II*, *SOFA*, *MODS*.

Все пациенты были оперированы в течение первых суток с момента госпитализации. Оперативное лечение включало лапаротомию, ревизию органов брюшной полости, устранение последствий травмы или ранения, ликвидацию (по возможности) очага инфекции. При невозможности одномоментного устранения гнойного процесса в брюшной полости проводились программированные релапаротомии. Все пациенты получали инфузионную, детоксикационную и антибактериальную терапию в объеме, адекватном тяжести состояния.

Исследовали показатели периферической крови: количество лейкоцитов (L , $\times 10^9/L$), абсолютное количество лимфоцитов (АКЛ) в мкл; показатели лейкоцитарных индексов интоксикации (ЛИИ): по Я.Я. Кальф-Калифу (ЛИИ_{КК}), по В.К. Островскому (ЛИИ_{ОС}), по С.Ф. Химич в модификации А.А. Костюченко с соавт. (ЛИИ_Х) [3]. Исследовали показатели вегетативной регуляции: индекс стресса (ИС), число признаков напряженности (ЧПН) адаптационных реакций организма по Л.Х. Гаркави (1987) [1], индекс *Kerdö* (ИК), показатель минутного объема кровотока (МОК) [2]. Определяли уровень экспрессии на лимфоцитах молекул: CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD38, CD95. Использовали моноклональные антитела, производимые ЗАО «Сорбент» (Москва, Россия). В расчетах использовали значения абсолютного числа клеток (в мкл) крови (*abs*), экспрессирующих молекулы: CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD38, CD95. Фагоцитарную активность нейтрофилов изучали с помощью латекс-теста. Оценивали фагоцитарный индекс (ФИ) и число фагоцитирующих нейтрофилов (ЧФН). Концентрацию сывороточных иммуноглобулинов А, М, G определяли методом

иммунопреципитации в агаровом геле по G. Mancini (1965). Выявление циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) проводили после инкубации с раствором ПЭГ-6000 с учетом результатов на фотоэлектроколориметре при длине волны 315 нм. Уровень ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α , интерферона- γ (ИФ- γ) в сыворотке крови оценивали с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Биохимические показатели крови измеряли на биохимическом анализаторе «Hitachi-912» с использованием адаптированных методик. Измерение интенсивности экспрессии на поверхности лимфоцитов катехоламин-рецепторных и серотонин-рецепторных комплексов определяли с помощью модифицированного люминесцентно-гистохимического метода Фалька — Хилларпа [7].

Расчёты выполняли с помощью пакета статистических программ «Statistica for Windows 6.0». В качестве основных статистических параметров учитывали среднее арифметическое значение величин (*M*) и их стандартную ошибку (*m*). Различия показателей в группах проверяли с помощью *U*-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни. Для оценки взаимосвязи между показателями состояния пациентов и ДК использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Критический уровень значимости (*p*) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Значения $p < 0,01$ представляли числом в форме мантииссы и показателя степени.

Выбор наиболее информативных показателей для кластеризации осуществляли методами факторного анализа. Процедура выделения главных компонент (ГК) заключается в поиске в многомерном пространстве осей факторов, описывающих значения дисперсии изучаемых переменных. Рассматривали факторы с учетом критерия значимости, предложенного H.F. Kaiser [10], с собственными значениями $\lambda > 1,0$. Для повышения интерпретируемости факторов использовали метод вращения VARIMAX, позволяющий получать более контрастные факторные нагрузки [11]. В качестве массива данных использовали показатели: количество лейкоцитов, абсолютные количества CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD16+n, CD20+, CD25+, CD38+, CD95+, число фагоцитирующих нейтрофилов, концентрации IgG, IgA, IgM, циркулирующих иммунных комплексов. Оптимальное число кластеров определяли на основании вычисления величин Евклидовых расстояний между среднегрупповыми величинами [4].

Многомерный анализ корреляционных взаимосвязей 15 показателей гемоиммунограммы 442 пациентов с ургентной хирургической патологией позволил извлечь и ранжировать «латентные» факторы (главные компоненты, ГК 1-15) по степени их воздействия на процессы, протекающие в иммунной системе [6, 14]. Состояние иммунной системы обследованных пациентов существенно зависит от влияния четырех факторов, численно выраженных значениями ГК 1-4 $\lambda > 1,0$. Так, первый фактор определяет 44,85 % всех возможных состояний им-

Таблица 1

Характеристики кластеров иммунной системы ($M \pm m$, мкл^{-1})

Показатель	Кластер 1 $n = 15$	Кластер 2 $n = 71$	Кластер 3 $n = 166$	Кластер 4 $n = 241$	Кластер 5 $n = 253$	Кластер 6 $n = 203$
abs CD3+	1332,81 $\pm$ 64,5	889,7 $\pm$ 17,42	630,75 $\pm$ 6,86	428,83 $\pm$ 4,11	273,18 $\pm$ 3,52	127,82 $\pm$ 3,70
abs CD4+	811,2 $\pm$ 60,95	510,72 $\pm$ 11,41	363,86 $\pm$ 4,47	263,46 $\pm$ 3,54	161,11 $\pm$ 2,35	71,62 $\pm$ 2,14
abs CD8+	752,8 $\pm$ 38,19	537,06 $\pm$ 14,78	384,17 $\pm$ 5,5	264,93 $\pm$ 3,14	164,31 $\pm$ 2,41	75,52 $\pm$ 2,40
abs CD16+	977,73 $\pm$ 84,66	570,28 $\pm$ 24,59	412,57 $\pm$ 9,42	296,06 $\pm$ 6,46	198,5 $\pm$ 4,21	116,33 $\pm$ 3,29

Примечание: достоверность различий между кластерами для всех показателей, $p < 0,001$.

мунной системы обследованных пациентов, второй — 17,32 %, третий — 8,34 %, четвертый — 7,47 %. В сумме эти четыре фактора определяют вариации состояния иммунной системы обследованных пациентов на 77,52 %. В соответствии с канонами статистики, колебания значений других факторов не являются существенными с точки зрения изменения состояния иммунной системы [6, 14].

В качестве критериев кластеризации показателей иммунного статуса были использованы показатели, наиболее тесно связанные со значениями наиболее влияющей ГК-1: abs CD3+, abs CD4+, abs CD8+, abs CD16+ [14]. Были выделены 6 кластеров — вариантов организации иммунной системы [14] (табл. 1).

Показатели Apache II и MODS пациентов 1 кластера прямо коррелируют с величиной ДК [14]. У пациентов 2, 3 и 4-го кластеров отмечена положительная связь между ДК и тяжестью состояния пациентов по шкалам Apache II, SOFA, SAPS II, MODS [14]. У пациентов 5-го кластера отмечена положительная связь между ДК и тяжестью состояния по шкале SOFA [14].

Дальнейшие исследования проводили с использованием методов квантильной статистики. Показатели пациентов были распределены в четыре квантиля в зависимости от удаления от центра кластера. Как наиболее различающиеся по величине ДК сравнивали показатели, относящиеся к 1-му квантилю (наиболее близкие к центру кла-

стера) и 4-му квантилю (относящиеся к периферии кластера).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов в первом кластере иммунной системы в виду малого числа наблюдений выявлены различия только показателя abs CD16+. Зарегистрированы наибольшие значения показателя abs CD16+ на периферии кластера (998,32 $\pm$ 73,71 и 1428,78 $\pm$ 124,17 соответственно; $p = 0,018$), что можно расценивать как более интенсивную нагрузку на механизмы конституционального иммунитета.

У пациентов, показатели которых принадлежат периферии 2-го кластера, выше количество лейкоцитов и значения шкал тяжести состояния Apache II, SOFA, SAPS II, MODS (табл. 2). В пользу большей интоксикации у пациентов на периферии 2-го кластера свидетельствуют высокие уровни ЛДГ (483,97 $\pm$ 24,65 vs 600,67 $\pm$ 26,42 Ед/л; $p = 0,003$) и билирубина (5,98 $\pm$ 0,87 vs 9,74 $\pm$ 1,70 мкмоль/л ; $p = 0,038$). Однако значения общего белка были выше, а уровень среднемолекулярных пептидов (СМП) — ниже на периферии 2-го кластера (табл. 2). У пациентов, показатели которых принадлежат центру 2-го кластера, ниже уровень симпатикотонии (ИК, МОК). При этом в центре 2-го кластера меньше показатель ЧПН, что свидетельствует о меньшем напряжении процессов адаптации. Также в центре 2-го кластера был выше уровень холестерина — одного из факторов стабилизации

Таблица 2

Различия квантилей второго кластера иммунной системы ($M \pm m$, мкл^{-1})

Показатель	Квантиль-1 ($n = 27$)	Квантиль-4 ($n = 27$)	Достоверность различий
L, $10^9/\text{л}$	8,93 $\pm$ 0,54	11,28 $\pm$ 0,89	$p = 0,014$
ИК, %	1,14 $\pm$ 2,73	12,98 $\pm$ 3,12	$p = 0,003$
МОК, мл/мин	3033,52 $\pm$ 201,83	3809,52 $\pm$ 355,51	$p = 0,020$
ЧПН	2,19 $\pm$ 0,20	3,38 $\pm$ 0,22	$p = 7,052 \times 10^{-4}$
Общий белок, г/л	51,36 $\pm$ 2,34	65,80 $\pm$ 2,31	$p = 4,678 \times 10^{-4}$
СМП, у.е.	1427,22 $\pm$ 189,16	714,16 $\pm$ 95,01	$p = 0,028$
Apache II	6,15 $\pm$ 0,46	8,52 $\pm$ 0,65	$p = 0,002$
SOFA	0,96 $\pm$ 0,21	2,57 $\pm$ 0,31	$p = 2,346 \times 10^{-4}$
SAPS II	22,52 $\pm$ 1,22	28,14 $\pm$ 1,40	$p = 0,004$
MODS	1,04 $\pm$ 0,16	2,33 $\pm$ 0,27	$p = 4,273 \times 10^{-4}$

мембран клеток ($4,31 \pm 0,09$ vs $3,98 \pm 0,10$ ммоль/л; $p = 0,015$).

В центре 3-го кластера ниже значения показателей интоксикации: L (табл. 3), ЛИИкк ($1,54 \pm 0,19$ vs $2,44 \pm 0,29$; $p = 0,008$), ЛИИос ($2,03 \pm 0,12$ vs $2,69 \pm 0,17$; $p = 4,182 \times 10^{-4}$), ЛИИх ($2,53 \pm 0,69$ vs $3,54 \pm 0,52$; $p = 1,034 \times 10^{-4}$), ЛДГ ($486,33 \pm 12,39$ vs $553,00 \pm 9,76$ Ед/л; $p = 7,435 \times 10^{-5}$). В центре 3-го кластера ниже уровень симпатикотонии, оцененный с помощью показателей ИК и МОК, уровень стресса, о котором свидетельствуют значения ИС и ЧПН. Уровень холестерина выше в центре 3-го кластера ($4,25 \pm 0,04$ vs $3,97 \pm 0,08$ ммоль/л; $p = 1,659 \times 10^{-4}$). В центре кластера выше уровень

экспрессии на лимфоцитах молекул: CD20, CD38, CD95. Этому соответствуют меньшие значения шкал тяжести состояния Apache II, SOFA, SAPS II, MODS (табл. 3). Напряженность фагоцитарного звена иммунной системы выше на периферии 3-го кластера, о чем свидетельствуют значения показателей ФИ и ЧФН (табл. 3). Также был выше показатель abs CD16+н, свидетельствующий о более интенсивной нагрузке на неспецифический иммунитет.

На периферии 4-го кластера выше значения показателей интоксикации: уровень лейкоцитов, ЛИИх ($2,68 \pm 0,27$ vs $5,15 \pm 0,87$; $p = 0,016$), СМП, ЛДГ ($470,74 \pm 9,98$ vs $555,19 \pm 12,76$ Ед/л;

Таблица 3

Различия квантилей третьего кластера иммунной системы ($M \pm m$, мкл⁻¹)

Показатель	Квантиль-1 ($n = 58$)	Квантиль-4 ($n = 57$)	Достоверность различий
L, 10^9 /л	$8,72 \pm 0,56$	$11,51 \pm 0,79$	$p = 8,865 \times 10^{-4}$
ИК, %	$11,18 \pm 1,12$	$15,59 \pm 1,39$	$p = 0,004$
МОК, мл/мин	$3562,22 \pm 91,00$	$3920,32 \pm 106,31$	$p = 0,001$
ИС	$0,46 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	$p = 2,296 \times 10^{-5}$
ЧПН	$2,66 \pm 0,14$	$3,14 \pm 0,15$	$p = 0,034$
CD20+, %	$18,57 \pm 0,30$	$17,60 \pm 0,45$	$p = 0,034$
CD38+, %	$15,85 \pm 0,20$	$16,85 \pm 0,40$	$p = 0,018$
CD95+, %	$17,57 \pm 0,33$	$18,68 \pm 0,25$	$p = 0,004$
abs CD16+н, мкл ⁻¹	$1912,78 \pm 184,03$	$2434,17 \pm 166,14$	$p = 0,004$
ФИ, %	$49,81 \pm 1,32$	$47,00 \pm 1,38$	$p = 0,044$
ЧФН, мкл ⁻¹	$2647,47 \pm 164,62$	$3435,43 \pm 227,56$	$p = 0,004$
Apache II	$6,47 \pm 0,36$	$8,95 \pm 0,52$	$p = 1,897 \times 10^{-4}$
SOFA	$1,41 \pm 0,17$	$2,50 \pm 0,20$	$p = 1,940 \times 10^{-4}$
SAPS II	$23,07 \pm 0,81$	$28,16 \pm 1,18$	$p = 0,002$
MODS	$1,36 \pm 0,16$	$2,46 \pm 0,19$	$p = 3,100 \times 10^{-5}$

Таблица 4

Различия квантилей четвертого кластера иммунной системы ($M \pm m$, мкл⁻¹)

Показатель	Квантиль-1 ($n = 79$)	Квантиль-4 ($n = 79$)	Достоверность различий
L, 10^9 /л	$8,82 \pm 0,47$	$11,63 \pm 0,72$	$p = 8,804 \times 10^{-4}$
АКЛ, мкл ⁻¹	$1562,03 \pm 20,46$	$1787,92 \pm 55,43$	$p = 0,002$
CD20+, %	$19,30 \pm 0,32$	$18,17 \pm 0,40$	$p = 0,016$
CD25+, %	$16,99 \pm 0,34$	$15,28 \pm 0,21$	$p = 1,047 \times 10^{-4}$
abs CD8+, мкл ⁻¹	$257,69 \pm 2,40$	$276,31 \pm 7,21$	$p = 0,010$
ФИ, %	$48,30 \pm 0,83$	$46,10 \pm 1,39$	$p = 0,005$
ИЛ-4, пг/мл	$7,16 \pm 0,29$	$5,19 \pm 0,55$	$p = 0,008$
ИЛ-1-РА, пг/мл	$1456,85 \pm 152,82$	$940,65 \pm 182,21$	$p = 0,022$
Общий белок, г/л	$61,65 \pm 1,18$	$56,54 \pm 1,06$	$p = 8,860 \times 10^{-4}$
СМП, у.е.	$598,40 \pm 104,37$	$597,62 \pm 44,97$	$p = 0,010$
Apache II	$7,96 \pm 0,55$	$11,22 \pm 0,57$	$p = 4,355 \times 10^{-6}$
SOFA	$1,87 \pm 0,19$	$3,09 \pm 0,20$	$p = 1,141 \times 10^{-5}$
SAPS II	$26,87 \pm 1,32$	$32,49 \pm 1,43$	$p = 0,002$
MODS	$1,89 \pm 0,20$	$2,99 \pm 0,18$	$p = 1,020 \times 10^{-5}$

$p = 1,000 \times 10^{-8}$) (табл. 4). Это соответствовало большему значению показателей шкал тяжести состояния Apache II, SOFA, SAPS II, MODS. За счет числа лейкоцитов на периферии кластера были выше уровни АКЛ и abs CD8^+ (табл. 4). В центре 4-го кластера выше уровень экспрессии на лимфоцитах молекул CD20, CD25; выше экспрессия на лейкоцитах рецепторов CA-R ($459,84 \pm 60,65$ vs $202,67 \pm 36,34\%$; $p = 9,805 \times 10^{-5}$) и ST-R ($155,61 \pm 1,98$ vs $147,97 \pm 2,92\%$; $p = 0,007$), уровень холестерина ($3,96 \pm 0,11$ vs $3,71 \pm 0,09$ ммоль/л; $p = 0,002$). Также в центре кластера выше продукция ИЛ-4 и ИЛ-1-РА и ФИ (табл. 4).

На периферии 5-го кластера ниже, чем в центре, уровень экспрессии молекул: CD4, CD20, CD25, CD38, CD95. Однако, количественные показатели: АКЛ, abs CD3^+ и abs CD38^+ выше на периферии 5-го кластера (табл. 5). На периферии 5-го кластера выше значения показателей интоксикации: креатинина ($116,61 \pm 8,65$ vs $157,16 \pm 13,47$ мкмоль/л; $p = 0,048$), СМП, показатели шкалы тяжести состояния SOFA. Там же ниже уровень общего белка (табл. 5) и выше уровень цитолиза, о чем

свидетельствуют показатели АЛАТ ($41,54 \pm 5,18$ vs $56,07 \pm 5,50$ Ед/л; $p = 0,042$). Тонус симпатической нервной системы выше в центре 5-го кластера, о чем свидетельствуют значения ИК и МОК (табл. 5).

На периферии 6-го кластера ниже уровень экспрессии молекул: CD3, CD4, CD8, CD25, CD95; abs CD4^+ , abs CD8^+ (табл. 6). Эти показатели соответствуют более низкому уровню общего белка (табл. 6), что в целом может характеризовать периферию 6-го кластера как область с меньшей интенсивностью пластических процессов. На периферии 6-го кластера выше показатели интоксикации: уровень билирубина ($20,34 \pm 1,93$ vs $17,18 \pm 1,84$ мкмоль/л; $p = 0,045$), мочевины ($5,68 \pm 0,55$ vs $6,94 \pm 0,53$ ммоль/л; $p = 0,020$), СМП (табл. 6).

Вероятно, у пациентов 5-го и 6-го кластеров тяжесть состояния определяется не столько характеристиками показателей, используемых традиционными шкалами тяжести состояния, сколько изменениями на уровне клеточных процессов и межклеточной кооперации. Снижение уровня достоверности корреляционных связей между ДК и показателями шкал тяжести состояния,

Таблица 5

Различия квантилей пятого кластера иммунной системы ($M \pm m$, мкл^{-1})

Показатель	Квантиль-1 ($n = 80$)	Квантиль-4 ($n = 80$)	Достоверность различий
ИК, %	$22,28 \pm 0,92$	$16,44 \pm 2,25$	$p = 0,011$
МОК, мл/мин	$4707,78 \pm 68,90$	$4559,88 \pm 128,89$	$p = 0,005$
АКЛ, мкл^{-1}	$1083,19 \pm 22,27$	$1274,23 \pm 36,43$	$p = 3,689 \times 10^{-5}$
CD4+, %	$15,31 \pm 0,31$	$14,18 \pm 0,66$	$p = 0,031$
CD20+, %	$20,21 \pm 0,33$	$18,84 \pm 0,46$	$p = 0,039$
CD25+, %	$16,24 \pm 0,36$	$14,65 \pm 0,31$	$p = 0,003$
CD38+, %	$18,72 \pm 0,24$	$17,71 \pm 0,39$	$p = 0,049$
CD95+, %	$19,79 \pm 0,52$	$17,56 \pm 0,42$	$p = 8,750 \times 10^{-4}$
abs CD3^+ , мкл^{-1}	$271,65 \pm 3,02$	$293,24 \pm 8,49$	$p = 0,022$
abs CD38^+ , мкл^{-1}	$202,32 \pm 4,94$	$225,24 \pm 8,27$	$p = 0,015$
Общий белок, г/л	$59,93 \pm 0,98$	$55,52 \pm 0,94$	$p = 0,001$
СМП, у.е.	$490,50 \pm 55,42$	$600,13 \pm 41,72$	$p = 0,004$
SOFA	$2,49 \pm 0,19$	$3,19 \pm 0,22$	$p = 0,031$

Таблица 6

Различия квантилей шестого кластера иммунной системы ($M \pm m$, мкл^{-1})

Показатель	Квантиль-1 ($n = 61$)	Квантиль-4 ($n = 61$)	Достоверность различий
CD3+, %	$23,49 \pm 0,63$	$19,16 \pm 1,00$	$p = 0,002$
CD4+, %	$13,83 \pm 0,40$	$11,34 \pm 0,67$	$p = 0,002$
CD8+, %	$14,17 \pm 0,47$	$11,03 \pm 0,67$	$p = 2,592 \times 10^{-4}$
CD25+, %	$13,61 \pm 0,55$	$12,17 \pm 0,59$	$p = 0,034$
CD95+, %	$18,53 \pm 0,44$	$17,35 \pm 0,53$	$p = 0,043$
abs CD4^+ , мкл^{-1}	$74,43 \pm 1,83$	$58,59 \pm 5,28$	$p = 0,003$
abs CD8^+ , мкл^{-1}	$75,87 \pm 1,90$	$59,01 \pm 5,83$	$p = 0,002$
Общий белок, г/л	$57,97 \pm 1,17$	$54,36 \pm 1,16$	$p = 0,009$
СМП, у.е.	$536,81 \pm 29,70$	$787,85 \pm 38,68$	$p = 4,894 \times 10^{-6}$

а также небольшое количество различающихся показателей свидетельствуют о дезорганизации функционирования иммунной системы не только на периферии, но и в центрах 5-го и 6-го кластеров. Это предположение подтверждает тот факт, что в ряду от первого до шестого кластеров снижается количество иммунокомпетентных клеток (табл. 1).

Полученные результаты показывают различия показателей пациентов, принадлежащих к центрам и периферии кластеров функциональной организации иммунного статуса. Периферические области кластеров характеризуются большими значениями показателей интоксикации и тяжести состояния. Показатели свидетельствуют о большей напряженности иммунной системы и вегетативной регуляции на периферии кластеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрение иммунной системы с позиций фундаментальных знаний об организации сложных саморегулирующихся систем позволяет выделить кластеры функциональной организации иммунной системы. Кластерная принадлежность и дистанция от центра кластера являются новыми информативными характеристиками состояния пациента. Перспективными областями применения знаний об особенностях состояния пациентов в зависимости от удаленности от центра кластеров являются оценка тяжести состояния пациентов и оптимизация подбора лекарственной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. — Ростов н/Д: Феникс, 1990. — 223 с.
2. Заболевания вегетативной нервной системы / А.М. Вейн и др. — М.: Медицина, 1991. — 624 с.
3. Костюченко А.А., Бельских А.Н., Тулушов А.Н. Интенсивная терапия послеоперационной раневой инфекции и сепсиса. — СПб.: Фолиант, 2000. — 448 с.
4. Леончик Е.Ю., Савастру О.В. Кластерный анализ. Терминология, методы, задачи. — Одесса: ОНУ им. И.И. Мечникова, 2007. — 208 с.

5. Пригожин И., Стенгерс И. Порядок из хаоса: новый диалог с природой. — М.: Прогресс, 1986. — 432 с.

6. Сарап П.В., Винник Ю.С., Останин А.А. Факторный анализ показателей иммунного статуса пациентов с urgentной хирургической патологией // Сиб. мед. журн. — 2010. — № 8. — С. 30—33.

7. Способ количественной оценки уровня экспрессии катехоламин- и серотонин-рецепторных комплексов на поверхности лейкоцитов: Пат. №2377565 Рос. Федерация: МПК G01N33/48 / П.В. Сарап, Ю.С. Винник, Н.С. Миноранская, Е.А. Чихачев, Е.В. Чижикова. — № 2007119750, заявл. 28.05.2007; опубл. 27.12.2009, Бюл. № 26; Приоритет 10.12.2008.

8. Bantel H., Schulze-Osthoff K. Cell death in sepsis: a matter of how, when, and where // Crit. Care. — 2009. — Vol. 13. — P. 173.

9. Freeman W.J., Kozma R., Werbos P.J. Biocomplexity: adaptive behavior in complex stochastic dynamical systems // Biosystems. — 2001. — Vol. 2. — P. 109—123.

10. Kaiser H.F. The application of electronic computers to factor analysis // Educational and Psychological Measurement. — 1960. — Vol. 20. — P. 141—151.

11. Kaiser H.F. The Varimax criterion for analytic rotation in factor analysis // Psychometrika. — 1958. — Vol. 23. — P. 187—200.

12. Manian F.A. Modern medicine and chaos theory // JAMA. — 1997. — Vol. 17. — P. 1399—1400.

13. Oberholzer A., Souza S.M., Tschoeke S.K. et al. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis // Shock. — 2005. — Vol. 6. — P. 488—493.

14. Sarap P.V., Ostanin A.A., Vinnik Y.S. Structural and clinical features of immune system clusters in patients with urgent surgical pathology // WASJ. — 2012. — Vol. 16, N 2. — P. 207—212.

15. Zhang X., Fu M., Xiao J., Hu G. Self-organization of chaos synchronization and pattern formation in coupled chaotic oscillators // Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys. — 2006. — Vol. 7. — P. 1520—1522.

Сведения об авторах

Сарап Павел Владимирович — заведующий отделением переливания крови МБУЗ «ГКБ № 6 им. Н.С. Карповича» г. Красноярск, врач аллерголог-иммунолог, кандидат медицинских наук (660069, г. Красноярск, ул. Московская, д. 5а, кв. 6; тел. моб.: +7-960-758-40-98; email: mssgbox@mail.ru)

Останин Александр Анатольевич — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Винник Юрий Семенович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии КрасГМУ

Л.В. Сахно, М.А. Тихонова, О.Ю. Леплина, А.А. Останин, Е.Р. Черных

ИНТЕРЛЕЙКИН-10 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ РЕГУЛЯТОР PD-1-B7-H1-ОПОСРЕДУЕМОЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование фенотипических и функциональных свойств дендритных клеток (ДК) здоровых доноров и больных туберкулезом легких (ТБ), а также влияние экзогенного IL-10, добавляемого в процессе генерации ДК, на фенотип и апоптоз-индуцирующую активность ДК здоровых доноров. Было обследовано 60 больных туберкулезом легких, различающихся по уровню ответа на туберкулиновый очищенный белковый дериват (PPD), и 40 здоровых доноров крови. Установлено, что у больных ТБ дендритные клетки, генерированные *in vitro* из моноцитов крови в присутствии GM-CSF+IFN- α , характеризуются повышенной экспрессией B7-H1, высоким уровнем продукции IL-10 и низкой аллостимуляторной активностью в СКЛ. В нашем исследовании была выявлена положительная взаимосвязь между эндогенной продукцией IL-10 и экспрессией B7-H1 в общей группе обследованных. Продемонстрировано, что добавление IL-10 в процессе генерации ДК здоровых доноров приводило к повышению содержания ДК экспрессирующих B7-H1, снижению их аллостимуляторной активности и усилению проапоптогенной активности дендритных клеток в СКЛ.

Ключевые слова: B7-H1, дендритные клетки, апоптоз, IL-10

INTERLEUKIN-10 REGULATES PD-1-B7-H1-MEDIATED CYTOTOXIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS

L.V. Sakhno, M.A. Tikhonova, O.Yu. Lepkina, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

In this investigation the phenotypic and functional properties of healthy donor and patient with pulmonary tuberculosis (PT) dendritic cells (DCs) were characterized. We also studied the influence of IL-10 on the phenotype and apoptosis-inducing activity of healthy donor DCs. 60 patients with pulmonary tuberculosis with different proliferative response to antigens of *M. tuberculosis* (purified protein derivative, PPD) and 40 healthy donors were enrolled in this study. It was revealed that DCs, generated *in vitro* from PT patient's blood monocytes with GM-CSF+IFN- α , were characterized by increased B7-H1 expression, up-production of IL-10 and reducing of allostimulatory activity in mixed lymphocyte culture (MLC). The endogenous IL-10 production by DCs was correlated with expression of B7-H1 in the general group of persons. It was revealed that addition of IL-10 to semi-mature DCs of healthy donor results in increasing of B7-H1 expression, diminishing of allostimulatory activity and enlargement of pro-apoptogenic activity of DCs.

Key words: B7-H1, dendritic cells, apoptosis, IL-10

Цитотоксическая функция дендритных клеток, особенно генерируемых в присутствии интерферона- α (IFN-ДК), активно обсуждается в последние годы в связи с выявленной способностью ДК лизировать клетки различных опухолевых линий [7]. Однако участие ДК в индукции апоптоза Т-клеток и возможное значение этого феномена остается практически не изученным.

Известно, что активированные через Т-клеточный рецептор CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки экспрессируют рецептор программированной клеточной смерти (PD-1), а ДК несут на своей поверхности молекулу B7-H1, являющуюся лигандом для PD-1 (PD-L1). Поэтому включение сигнального пути PD-1-B7-H1 при взаимодействии ДК с Т-лимфоцитами может индуцировать апоптоз/анергию Т-лимфоцитов. При персистирующих инфекциях генерируются толерогенные ДК с повышенной экспрессией B7-H1 и низкой экспрессией костимуляторных молекул CD80 и CD86. В свою очередь, на Т-лимфоцитах, активированных антигенами патогенных микроорганизмов, повышается экспрессия рецептора PD-1. Связывание PD-1 с PD-L1 через определенные сигнальные пути может приводить к повышенной

гибели антигенспецифических лимфоцитов [4, 6]. Вероятно, вовлечение PD-1-B7-H1 взаимодействия иммунокомпетентных клеток может приводить к нарушению антигенспецифического ответа при инфекционных заболеваниях.

Известно, что интерлейкин-10 (IL-10) принимает участие в иммуносупрессии и хронизации воспалительного процесса при инфекции. Учитывая известные данные о стимулирующем влиянии IL-10 на экспрессию B7-H1 [3], а также выявленный нами факт повышенной продукции IL-10 моноцитами и генерируемыми из них ДК у больных туберкулезом (ТБ) [1] представляется вероятным предположение о вовлечении IL-10 в процесс повышения апоптоз-индуцирующей активности ДК больных. При таком рассмотрении, активация PD-1-B7-H1 сигнального пути при взаимодействии ДК с Т-лимфоцитами, может являться одним из механизмов подавления антигенспецифического иммунного ответа в целом и толерогенной/супрессорной активности ДК в частности.

Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование фенотипических и функциональных свойств ДК здоровых доноров и больных

туберкулезом, а также влияние экзогенного IL-10, добавляемого в процессе генерации ДК, на фенотип и апоптоз-индуцирующую активность ДК здоровых доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 60 больных туберкулезом легких: 37 мужчин и 23 женщины в возрасте от 16 до 61 года, включая 23 (38 %) с фиброзно-кавернозной, 31 (52 %) с инфильтративной и 6 (10 %) с диссеминированной формами ТБ. Активное бацилловыделение (БК +) выявили у 36 больных (60 %). При лабораторном исследовании лекарственную резистентность зарегистрировали у 12 из 60 пациентов (20 %). Обследование всех пациентов проводили после получения информированного согласия. В исследование были включены 40 здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и возрасту. Обследование проводили после получения информированного согласия.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина и культивировали ($0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10 % инактивированной сыворотки доноров крови IV (AB) группы при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали туберкулиновый очищенный белковый дериват (PPD) в дозе 50 мкг/мл. Интенсивность пролиферации оценивали на 6 сут. по включению ³H-тимидина (1 мКи/лунку), добавленного за 18 ч до окончания культивирования. В зависимости от уровня пролиферативного ответа больные ТБ были разделены на 2 подгруппы — с сохраненным (> 12500 имп./мин; n = 38; подгруппа 1 и сниженным (< 12500 имп./мин; n = 22; подгруппа 2) ответом на PPD.

Моноциты выделяли в 6-луночных планшетах (Nunclo, Дания) путем прилипания к пластику МНК (3×10^6 клеток/мл) в присутствии 5 % инактивированной сыворотки доноров крови IV (AB) группы. ДК генерировали из моноцитов в течение 4 сут. в среде RPMI-1640 с 5 % сыворотки плодов коровы (Биолот, С-Пб) в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN-α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч в присутствии 10 мкг/мл липополисахарида (LPS *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich). В серии экспериментов одновременно с LPS добавляли интерлейкин-10 (Sigma, 5 нг/мл).

Оценку экспрессии B7-H1 на ДК проводили с использованием моноклональных анти-B7-H1-антител (PharMingen, США), меченных фикоэритрином (PE) методом проточной цитофлуориметрии (FASC Calibur, Becton Dickinson, США). В культуральных супернатантах генерированных ДК определяли концентрацию IL-10 с помощью наборов для иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией фирмы-производителя («Вектор-Бест», Новосибирск).

Аллостимуляторную активность ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). Для этого МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку) культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных ДК здоровых доноров и больных ТБ в соотношении 10:1 в среде RPMI-1640 и 10 % инактивированной сыворотки доноров крови IV (AB) группы. Интенсивность пролиферации оценивали на 5-е сут. радиометрически по включению ³H-тимидина. Индекс стимуляции в СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Уровень апоптоза и распределение Т-лимфоцитов по фазам клеточного цикла оценивали в 3-суточной алло-СКЛ. Клеточный цикл и уровень апоптоза CD4⁺ и CD8⁺(CD4⁻) Т-клеток оценивали методом трехцветной проточной цитометрии. Для этого, 25 мкл МНК ($1,0 \times 10^6$), полученных после культивирования в алло-СКЛ, инкубировали в течение 45 мин при 4 °C в темноте с 5 мкл FITC-конъюгированных анти-CD3-антител и 5 мкл PE-конъюгированных анти-CD4 (Сорбент, Москва). После однократной отмывки забуференным физиологическим раствором, содержащим 0,02 % ЭДТА и 1 % азида натрия (раствор «А») клетки фиксировали в течение 30 мин холодным 0,5 % раствором параформальдегида. Фиксированные клетки центрифугировали, осадок ресуспендировали в 0,5 мл раствора А, содержащего РНКазу в концентрации 20 мкг/мл, после чего клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин при 37 °C. Затем клетки обрабатывали 7-амино-актиномицином D (7-AAD, Calbiochem, Германия) в конечной концентрации 2 мкг/мл в темноте в течение 30 минут при 4 °C.

Анализ клеточного цикла проводили по оценке гистограмм ДНК (красная флуоресценция). Относительное содержание клеток с диплоидным (клетки в G₀/G₁ фазах клеточного цикла) и гипердиплоидным (клетки в S, G₂/M фазах клеточного цикла) набором ДНК определяли в гейтах CD3⁺CD4⁺ или CD3⁺CD8⁺ (CD4⁻) Т-лимфоцитов (зеленая и оранжевая флуоресценция). Апоптотические клетки, ДНК которых подвергалась фрагментации, формировали характерный гиподиплоидный пик. Результаты выражались в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов (не менее 10000).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона — Манна — Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное исследование экспрессии B7-H1 на ДК показало, что у здоровых доноров относительное содержание ДК с поверхностной экспрессией B7-H1 варьировало от 18 до 79, а

медианное значение составляло 38 % (табл. 1). Содержание В7-Н1-позитивных клеток в культурах ДК больных ТБ варьировало от 24 до 90 и медианное значение составляло 67 %. Таким образом, ДК больных ТБ характеризовались достоверно более высоким уровнем экспрессии В7-Н1 по сравнению с ДК здоровых доноров. Согласно данным литературы, а также полученным нами ранее результатам больные ТБ характеризуются выраженной гетерогенностью по уровню пролиферативного ответа Т-клеток на антигены *M. tuberculosis*, например, туберкулиновый очищенный белковый дериват (PPD). При этом часть пациентов характеризуется сохранным ответом на PPD, тогда как у других ответ на PPD резко снижен, что свидетельствует о состоянии PPD-анергии циркулирующих Т-клеток. Эта подгруппа пациентов отличается также более высоким уровнем апоптоза CD4 и CD8-Т-лимфоцитов. Поэтому мы также сравнили содержание В7-Н1⁺ ДК в подгруппах больных с сохранным (подгруппа 1) и сниженным (подгруппа 2) ответом на PPD. Несмотря на отсутствие достоверных различий в подгруппах, ДК PPD-анергичных пациентов характеризовались наиболее выраженным возрастанием доли В7-Н1-позитивных клеток. Действительно, доля пациентов с повышенным содержанием В7-Н1⁺ ДК (превышающим верхнюю квартильную границу нормативного диапазона) в группе анергичных больных была выше, чем у реактивных пациентов (75 против 57 %).

Исследование концентрации IL-10 в супернатантах ДК показало, что ДК больных отличались достоверно повышенным уровнем продукции IL-10. Медианное значение уровня IL-10 в культурах ДК больных практически в 4 раза превышало таковое в культурах ДК доноров, причем наиболее высокая продукция данного цитокина наблюдалась в подгруппе PPD-анергичных пациентов (табл. 1). Сопоставление эндогенной продукции IL-10 и экспрессии В7-Н1 дендритными клетками в общей группе обследованных пациентов, включающей больных ТБ и здоровых доноров, выявило наличие прямой корреляционной связи между указанными пара-

метрами ($R_s = 0,49$; $p = 0,006$; $n = 30$). Еще более выраженная достоверная прямая корреляционная связь была выявлена при анализе сопряженности продукции IL-10 и количества В7-Н1-позитивных ДК в группе доноров ($R_s = 0,86$; $p = 0,003$; $n = 9$).

Сравнение способности ДК доноров и больных ТБ (с повышенной экспрессией В7-Н1) стимулировать пролиферацию Т-клеток в ответ на аллоантигены в СКЛ продемонстрировало выраженное снижение аллостимуляторной активности ДК больных ТБ (4345 ± 709 против 12113 ± 1263 имп./мин у доноров, $p_u < 0,05$) (табл. 1). Снижение аллостимуляторной активности ДК регистрировалось как у PPD-реактивных, так и PPD-анергичных пациентов, однако в последнем случае было достоверно более выраженным.

В нашем исследовании была выявлена положительная взаимосвязь между эндогенной продукцией IL-10 и экспрессией В7-Н1, поэтому следующей задачей являлось исследование фенотипических и функциональных свойств ДК здоровых доноров при добавлении экзогенного IL-10 в процессе генерации ДК. IL-10 добавляли на стадии созревания ДК здоровых доноров (одновременно с LPS). Полученные результаты (табл. 2) показали, что добавление IL-10 приводило к повышению содержания ДК экспрессирующих В7-Н1 молекулу на своей поверхности и снижению их аллостимуляторной активности.

Кроме того, было установлено, что добавление IL-10 приводило к усилению проапоптогенной активности дендритных клеток в СКЛ. Так, культуры МНК, стимулированные ДК, генерируемыми в присутствии IL-10, содержали достоверно более высокое количество апоптотических CD3⁺CD8 Т-лимфоцитов (табл. 3). Следует отметить, что количество пролиферирующих (в S, G₂/М фазе цикла) Т-клеток в СКЛ статистически значимо не отличалось при использовании в качестве клеток стимуляторов ДК генерированных в присутствии и отсутствие IL-10 (табл. 3). Следовательно, ДК здоровых доноров, культивированные в присутствии экзогенного IL-10, не блокировали прохождение клеточного цикла Т-лимфоцитами.

Сравнительная характеристика ДК здоровых доноров и больных туберкулезом

Таблица 1

Показатель	Здоровые доноры	Больные ТБ	Больные ТБ Подгруппа № 1 PPD ответ > 12500 имп./мин	Больные ТБ Подгруппа №2 PPD ответ < 12500 имп./мин
1. Экспрессия В7-Н1 ⁺ (%)				
М ± S.E. медиана	42,3 ± 4,4 (19) 38	61,0 ± 2,9 (44)* 67	58,1 ± 3,6 (32)* 62,5	68,8 ± 3,9 (12)* 70
2. Продукция IL-10 (пг/мл)				
М ± S.E. медиана	490 ± 125 (13) 224	821 ± 60 (31)* 975	797 ± 70 (25)* 899	921 ± 95 (6)* 1027
3. Аллостимуляторная активность				
Пролиферативный ответ в СКЛ (имп./мин)	12113 ± 1263 (24)	4345 ± 709 (55)*	6173 ± 1126 (31)*	1983 ± 366 (24)*.#

Примечание: данные представлены в виде М ± S.E. В скобках – количество наблюдений. * – $p_u < 0,05$ – достоверность различий показателей по сравнению с донорами. Здесь и далее в таблицах: U-критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

Таблица 2

Влияние интерлейкина-10, добавляемого на стадии созревания, на фенотипические и функциональные свойства ДК здоровых доноров

Показатель	ДК здоровых доноров	
	LPS (n = 14)	LPS + интерлейкин-10 (n = 14)
B7-H1 ⁺ ДК (%)	40,4 ± 4,1	48,1 ± 5,3*
Алlostимуляторная активность:		
- пролиферативный ответ (имп/мин)	13432 ± 1841	9230 ± 992*
- индекс стимуляции в СКЛ	35,6 ± 6,9	23,7 ± 3,8*

Примечание: данные представлены в виде $M \pm S.E.$ В скобках – количество наблюдений. * – $p_u < 0,05$ – достоверность различий показателей в присутствии и отсутствие интерлейкина-10 на стадии дозревания ДК.

Таблица 3

Влияние интерлейкина-10 как дозревающего сигнала на способность ДК стимулировать апоптоз и пролиферацию Т-клеток в смешанной культуре

Показатель	Условия культивирования ДК-стимуляторов	
	LPS (n = 14)	LPS+IL-10 (n = 14)
1. Количество апоптотических Т-клеток (%)		
CD3 ⁺ CD4 Т-клетки	8,3 ± 1,8	10,4 ± 2,3
CD3 ⁺ CD8 Т-клетки	11,2 ± 2,0	17,0 ± 2,8*
2. Количество пролиферирующих (в S,G ₂ /M фазе цикла) Т-клеток (%)		
CD3 ⁺ CD4 Т-клетки	17,9 ± 3,3	15,8 ± 3,2
CD3 ⁺ CD8 Т-клетки	18,6 ± 2,2	18,9 ± 2,5

Примечание: данные представлены в виде $M \pm S.E.$ В скобках – количество наблюдений. * – $p_u < 0,05$ – достоверность различий показателей в присутствии и отсутствие IL-10 на стадии дозревания ДК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В предыдущем исследовании было продемонстрировано, что активация Т-клеток в присутствии ДК больных туберкулезом приводила к более выраженному увеличению количества апоптотических и уменьшению доли пролиферирующих Т-лимфоцитов [2]. В аллогенной СКЛ после 3-суточного сокультивирования МНК с ДК увеличивалось количество PD-1⁺ CD4⁺ и CD8⁺-Т-клеток, причем относительное количество этих клеток статистически значимо не различалось при стимуляции ДК больных ТБ и здоровых доноров [2]. Учитывая выше сказанное можно предположить, что более высокий уровень апоптоза Т-клеток в присутствии ДК пациентов с туберкулезом в большей степени связан с функциональными особенностями ДК.

Полученные в настоящем исследовании данные демонстрируют, что ДК больных туберкулезом отличаются более высокой экспрессией B7-H1 и повышенной продукцией IL-10. Выявленные факты согласуются с данными других авторов, которые зарегистрировали вовлечение дендритных клеток с повышенной экспрессией B7-H1 в развитие Т-клеточных дисфункций при различных заболеваниях [3, 5].

Выявленная прямая корреляционная зависимость между экспрессией B7-H1 и продукцией IL-10 дендритными клетками позволила предположить важную роль эндогенной продукции IL-10 в регуляции экспрессии B7-H1 на поверхности ДК. Для более детального выяснения роли IL-10

в регуляции экспрессии B7-H1 мы исследовали влияние экзогенного IL-10 на экспрессию B7-H1 молекул и алlostимуляторную способность дендритных клеток здоровых доноров при добавлении данного цитокина на стадии дозревания ДК. Полученные результаты показали, что добавление IL-10 сопровождалось статистически значимым усилением экспрессии B7-H1 на поверхности ДК здоровых доноров и снижением их алlostимуляторной активности. Кроме того, добавление IL-10 на стадии созревания ДК приводило к усилению их проапоптогенной активности по отношению к популяции CD3⁺CD8 Т-лимфоцитов. Этот факт согласуется с полученными нами ранее данными о большей чувствительности CD8⁺ Т-лимфоцитов к апоптогенному влиянию ДК больных ТБ [2]. Важно отметить, что относительное количество ДК здоровых доноров, экспрессирующих B7-H1 в присутствии экзогенного IL-10, не достигало значений, характерных для ДК больных ТБ. Также, апоптоз-индуцирующая способность ДК здоровых доноров генерированных в присутствии IL-10 увеличивалась, но не достигала значений характерных для апоптоз-индуцирующей активности ДК больных. Таким образом, IL-10 является важным, но, по-видимому, не единственным фактором, регулирующим проапоптогенную активность ДК. Для ДК, генерированных в присутствии GM-CSF и IL-4, продемонстрировано, что добавление IL-10 приводит к усилению экспрессии B7-H1, причем связывание моноклональных антител против анти-

гена B7-H1 с ДК усиливало их аллостимуляторную способность [5]. В нашем исследовании впервые продемонстрировано, что усиление экспрессии B7-H1 в присутствии IL-10 регистрируется и для IFN- Δ C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сахно Л.В., Распай Ж.М., Тихонова М.А. Дефект антигенпрезентирующих клеток у больных туберкулезом легких // Мед. иммунология. — 2009. — Т. 11, № 2–3. — С. 245–254.
2. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Леплина О.Ю. Роль PD-1/B7-H1-опосредованного пути в нарушении антигенспецифического ответа у больных туберкулезом легких // Иммунология. — 2011. — Т. 32. — С. 89–93.
3. Curiel T.J., Wei S., Dong H., Alvarez X. et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity // Nat Med. — 2003. — Vol. 9. — P. 562–567.
4. Dong H., Chen X. Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses // Cell. Mol. Immunology. — 2006. — Vol. 3. — P. 179–187.
5. Selenko-Gebauer N., Majdic O., Szekeres A., Hofler G. et al. B7-H1 (Programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy // J. Immunol. — 2003. — Vol. 170. — P. 3637–3644.
6. Sharpe A.H., Wherry E.J., Ahmed R., Freeman G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection // Nature Immunology. — 2007. — Vol. 8. — P. 239–245.
7. Wesa A.K., Storkus W.J. Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer // Cell Death and Differentiation. — 2008. — Vol. 15. — P. 51–57.

Сведения об авторах

Сахно Людмила Васильевна – старший научный сотрудник НИИ клинической иммунологии СО РАМН, кандидат биологических наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383)-228-21-01; e-mail: ct_lab@mail.ru)

Тихонова Марина Александровна – ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Леплина Ольга Юрьевна – старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук

Останин Александр Анатольевич – главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ клинической иммунологии СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Черных Елена Рэмовна – заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, заместитель директора НИИКИ СО РАМН по науке НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, член-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (тел. раб.: 236-03-29; e-mail: ct_lab@mail.ru)

**А.Н. Силков, Т.В. Ковалевская-Кучерявенко, С.А. Фалалеева, Ю.А. Шевченко,
Б.М. Непомнящих, С.В. Сенников**

СЫВОРОТОЧНЫЕ УРОВНИ ЦИТОКИНОВ И ИХ ПРОДУКЦИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

В статье представлены результаты исследования уровня цитокинов в сыворотке и кондиционных средах культур мононуклеарных клеток периферической крови у больных атопическим дерматитом в период максимально выраженных симптомов и вне обострения, а также в сравнении с условно здоровыми донорами. При атопическом дерматите выявлены высокие концентрации по сравнению со здоровыми донорами сывороточных Тх2-цитокинов IL-5 и IL-13, а также провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 и основного цитокина Тх1 — IFN γ . В кондиционных средах культур МНК больных атопическим дерматитом напротив, выявлено значимое снижение спонтанной секреции регуляторных цитокинов IL-10 и IL-17, а также сниженная в сравнении с контролем митоген-стимулированная продукция Тх2 цитокинов IL-5 и IL-13 и Тх1 цитокинов IL-12 и INF- γ . Только для IL-1 β выявлен статистически значимый высокий уровень стимулированной секреции вне обострения АД. Стандартная (симптоматическая) комбинированная терапия атопического дерматита не оказывает значимого влияния на продукцию цитокинов в периферическом кровотоке.

Ключевые слова: атопический дерматит, цитокины, сыворотка, кондиционная среда

SERUM LEVEL AND PRODUCTION OF CYTOKINES BY PBMC IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS

**A.N. Silkov, T.V. Kovalevskaya-Kutcheryavenko, S.A. Falaleyeva, J.A. Shevchenko,
V.M. Nepomnyashikh, S.V. Sennikov**

Research Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk

The paper presents the results of measurements of cytokine levels in serum and conditioned medium of PBMC cultures from the patients with atopic dermatitis with the exacerbation and remission in comparison with the healthy donors. We have shown that the serum levels of the key cytokines IL-5 and IL-13, proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 and the main Th1 cytokine — IFN γ — were higher compared to healthy donors. In the conditioned media of peripheral blood mononuclear cells, in contrast, we have found a significant decrease of the spontaneous secretion of key cytokines IL-10 and IL-17. We have shown that the stimulated secretion of IL-5 and IL-13, IL-12 and INF- γ is significantly reduced in comparison with the control level. Only IL-1 β revealed a statistically significant higher level of stimulated secretion without exacerbation of atopic dermatitis. The contemporary therapy has no effect on cytokine production.

Key words: atopic dermatitis, cytokines, serum, conditioned medium

В исследованиях иммунной компоненты различных заболеваний цитокины занимают важное место, поскольку являются одним из центральных звеньев иммунорегуляции. Известно, что цитокины и их гены могут быть использованы как в целях диагностики, так и применены для разработки цитокиновых и антицитокиновых стратегий терапии заболеваний, в патогенезе которых они играют заметную роль. Одним из таких заболеваний можно считать атопический дерматит (АД) — распространенное аллергическое заболевание кожи, имеющее мультифакториальную природу, включающую нарушения иммунной системы [1, 11, 12]. Основой патогенеза АД является результат взаимодействия генетической предрасположенности [4], изменений в структуре и функционировании эпидермального барьера [5] и иммунологических нарушений [3]. Иммунологическая концепция формирования АД рассматривает в качестве ключевого события дисбаланс между иммунорегуляторными белками — цитокинами Т-хелперов 1-го и 2-го типа [3], который в купе с нарушениями функций кератиноцитов и антигенпрезентирующих клеток

приводит к формированию хронических очагов аллергического воспаления. Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы являлось сравнительное исследование цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных клеток и уровня цитокинов в периферическом кровотоке у пациентов, страдающих атопическим дерматитом, в разные фазы заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы результаты клинико-иммунологического обследования 24 человек (7 мужчин и 17 женщин, в возрасте от 15 до 48 лет), страдающих АД, в обострение и вне обострения симптомов. Диагноз АД был верифицирован не менее, чем за 2 года до включения пациента в группу исследования. Ограниченно-локализованная форма АД установлена у 5 больных (21 %), распространенная — у 16 (67 %), диффузная — у 3 (12 %). Тяжесть обострения заболевания оценивали по критерию SCORAD — медиана индекса в обострение составила 58,5 баллов, вне обострения — 15 баллов. Медиана уровня общего IgE в исследуемой

группе составила 508 МЕ/мл. Все больные находились на стационарном лечении и получали стандартную терапию периода обострения АД согласно Клиническим рекомендациям по дерматологии и Российскому национальному согласительному документу по atopическому дерматиту: элиминационные мероприятия, глюкокортикостероиды системные (по показаниям), наружную терапию, в том числе и топические стероиды, уход за кожей с использованием эмолиентов, десенсибилизирующие, антигистаминные средства, энтеросорбенты, физиолечение [1]. Пациенты включались в исследование с их информированного согласия. Группу контроля составили 16 практически здоровых добровольцев (4 мужчины и 12 женщин) в возрасте от 23 до 58 лет, не имеющих заболеваний кожи и/или других аллергических заболеваний.

Объектами исследования являлись: сыворотка периферической крови и кондиционные среды культур мононуклеарных клеток. Отбор периферической крови производился стерильными одноразовыми инструментами из локтевой вены в общем количестве 20 мл в вакуумные пробирки VACUTEST (KIMA, Италия), содержащие в качестве антикоагулянта K3EDTA при получении клеток, либо усилители свертывания при выделении сыворотки. У больных отбор образцов проводился дважды: при поступлении в период обострения заболевания и при выписке, в период снижения клинических проявлений.

Выделение сыворотки выполнялось из сгустка крови после центрифугирования 30 минут при 3000 об./мин, собранные образцы маркировали и помещали на хранение при -20°C до анализа.

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) из цельной крови выполняли стандартно, в градиенте плотности фиколл-урографина. Клетки культивировали в полной культуральной среде RPMI 1640, содержащей: 10 % ЭТС, 2 мМ L-глутамина, 80 мкг/мл гентамицина, 100 мкг/мл ампициллина и 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанола. Культивирование МНК проводили в 24-луночных плоскодонных планшетах, в

каждую лунку помещали 1 мл полной культуральной среды, содержащей 1×10^6 клеток. Для стимуляции клеток использовали митоген — Конканавалин А (КонА) в концентрации 10 мкг/мл. Сбор кондиционных сред производили через 24 часа после начала инкубирования клеток. Собранные образцы маркировали и хранили при -20°C до анализа.

Содержание цитокинов в сыворотках крови и кондиционных средах культур МНК определяли с помощью коммерческих наборов компании Bio-Rad с использованием оборудования и программного обеспечения Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрических критериев: Вилкоксона для парных измерений и Манна — Уитни для сравнения с группой контроля. Различия сравниваемых величин признавали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Все данные приведены в виде медианы значений и интерквартильного размаха: Ме (25 % — 75 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном анализе уровней провоспалительных цитокинов в сыворотке крови было установлено, что как в период обострения, так и в период снижения клинических проявлений АД у больных наблюдаются уровни IL-1 β и IL-6 превышающие нормативные значения, полученные в группе условно здоровых доноров (табл. 1). Следует отметить, что уровень рецепторного антагониста IL-1 (IL-1Ra) в сыворотке больных также превышал донорский, что свидетельствует об активации компенсаторных механизмов регуляции активности провоспалительных цитокинов. Роль провоспалительных цитокинов в патогенезе АД остается недостаточно ясной, однако в некоторых работах показано сходство АД и псориаза, при котором отмечаются стабильно высокие концентрации провоспалительных цитокинов [6, 9].

Согласно мнению некоторых авторов, в фазу обострения АД преобладают цитокины Th2 типа,

Концентрация цитокинов в сыворотке периферической крови

Таблица 1

Цитокин	АД обострение, пг/мл (n = 24)	АД вне обострения, пг/мл (n = 24)	Группа контроля, пг/мл (n = 16)
IL-6	8,74 (7,88–10,72)**	10,09 (7,15–11,72)**	6,06 (5,71–7,08)
IL-1 β	2,67 (2,2–3,19)*	2,88 (2,44–3,28)*	2,36 (2,05–2,47)
IL-1Ra	88,32 (34,69–162,02)*	99,2 (24,05–193,67)*	36,08 (4,76–65,35)
IL-4	8,38 (7,76–8,97)	8,49 (7,86–9,41)	7,71 (6,63–8,53)
IL-5	5,69 (4,55–7,79)*	6,52 (5,07–7,59)**	4,39 (3,84–5,13)
IL-13	16,32 (11,93–22,80)*	18,38 (10,83–22,88)*	11,72 (9,27–14,19)
IL-12	31,23 (18,64–43,61)	32,88 (17,03–52,75)	7,26 (7,46–35,89)
IFN- γ	309,3 (269,0–400,7)*	330,8 (297,2–392,1)**	245,1 (227,7–287,0)
IL-10	8,41 (5,71–10,98)	8,06 (5,15–12,45)	5,96 (4,13–8,11)
IL-17	83,43 (63,02–94,96)	81,47 (56,68–107,96)	71,67 (37,8–87,28)

Примечание: * — различия от группы контроля при $p < 0,05$; ** — различия от контроля при $p < 0,001$.

тогда как в период ремиссии возможно значимое повышение цитокинов Тх1 типа [9]. В нашей работе мы обнаружили значимое повышение сывороточных концентраций некоторых ключевых Тх2 цитокинов, участвующих в патогенезе АД. Так уровни IL-5 и IL-13 в обострение, а также вне обострения у АД-пациентов значимо превышали сывороточные показатели здоровых доноров, однако в отношении концентраций IL-4 статистически значимых различий нами не обнаружено (табл. 1). Также мы выявили статистически значимое повышение уровня IFN- γ не только в период ослабления тяжести заболевания ($Z = -3,7$; $p = 0,00025$), но и в острую фазу АД ($Z = -2,8$; $p = 0,0053$). При этом другой Тх1 цитокин – IL-12 – демонстрировал тенденцию к увеличению при atopическом дерматите ($Z = 1,89$; $p = 0,058$). Сывороточные концентрации исследованных нами регуляторных цитокинов IL-10 и IL-17 статистически значимо не отличались от таковых у здоровых доноров, однако, как медианные, так и квартильные значения в группах больных для всех исследованных цитокинов демонстрировали тенденцию к превышению таковых в группе контроля.

При сравнительном анализе концентраций цитокинов в сыворотке периферической крови у больных АД в период обострения и в период снижения клинических проявлений заболевания после стандартной терапии мы не выявили статистически значимых различий. Полученные данные свидетельствуют, что современная комплексная терапия atopического дерматита, купируя лишь клинические симптомы, не оказывает влияния на цитокиновый профиль у пациентов.

По данным литературы у пациентов с АД известно о повышенной секреции Тх2 цитокинов IL-4, IL-5, IL-13, IL-31 как покоящимися, так и стимулированными мононуклеарами периферической крови [8], локально в коже выявляются высокие концентрации IL-17, а результаты предшествующих исследований IL-10 достаточно противоречивы [3]. Для исследования цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных клеток при atopическом дерматите, мы провели анализ уровней цитокинов в кондиционных средах МНК, представленных в таблицах 2 и 3.

В проведенном нами исследовании у больных АД отмечалось значимое снижение спонтанной

Таблица 2

Уровень цитокинов в кондиционных средах культур не стимулированных МНК

Цитокин	АД обострение, пг/мл ($n = 24$)	АД вне обострения, пг/мл ($n = 24$)	Группа контроля ($n = 16$)
IL-6	42,49 (23,38–84,57)	52,66 (17,62–179,53)	64,48 (32,5–128,69)
IL-1 β	0,23 (0,23–1,76)*	0,5 (0,23–9,3)	10,55 (0,5–14,84)
IL-1Ra	31,32 (18,14–66,84)	51,5 (24,05–72,16)	59,84 (36,05–86,64)
IL-4	2,65 (0,8–4,42)	3,11 (1,49–4,15)	1,78 (0,73–4,0)
IL-5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
IL-13	23,82 (11,69–43,25)	25,97 (14,64–42,5)	20,34 (16,39–33,19)
IL-12	18,07 (14,42–24,36)	21,62 (14,96–29,46)	28,87 (17,13–45,80)
IFN- γ	129,28 (83,47–184,25)	151,89 (121,5–225,47)	143,1 (85,14–218,54)
IL-10	5,24 (3,0–7,13)*	4,32 (3,04–8,29)*	6,92 (5,21–15,5)
IL-17	17,37 (5,38–26,56)*	15,74 (9,9–25,58)**	41,31 (29,80–65,0)

Примечание: * – различия от группы контроля при $p < 0,05$; ** – различия от контроля при $p < 0,001$.

Таблица 3

Уровень цитокинов в кондиционных средах культур МНК, стимулированных КонА

Цитокин	АД обострение, пг/мл ($n = 24$)	АД вне обострения, пг/мл ($n = 24$)	Группа контроля ($n = 16$)
IL-6	3661,2 (2053,7–7267,3)	3854,2 (2015,6–8031,99)	6547,7 (2485,9–9031,0)
IL-1 β	630,29 (302,97–1458,6)	962,1 (617,3–1523,8)*	626,7 (502,1–831,8)
IL-1Ra	490,98 (367,26–561,7)*	539,92 (433,08–667,72)	573,4 (488,2–746,7)
IL-4	11,46 (8,56–14,77)	12,10 (9,39–14,65)	12,9 (12,5–14,7)
IL-5	26,72 (7,43–46,05)*	24,31 (11,82–42,75)*	44,8 (30,8–113,8)
IL-13	153,97 (76,28–233,13)*	168,98 (99,09–234,19)*	220,1 (164,6–440,6)
IL-12	49,7 (40,39–60,45)**	47,73 (39,92–61,56)**	85,3 (60,6–121,7)
IFN- γ	1332,9 (1004,6–2601,1)*	1633,3 (1125,1–2603,1)*	2814,7 (2235,3–4362,3)
IL-10	147,87 (84,66–238,35)*	106,15 (67,13–180,67)**	271,5 (201,5–342,9)
IL-17	193,9 (131,8–308,1)**	176,32 (121,23–299,93)*	365,6 (289,6–480,7)

Примечание: * – различия от группы контроля при $p < 0,05$; ** – различия от контроля при $p < 0,001$.

Таблица 4

Индексы стимуляции продукции цитокинов в кондиционных средах культур МНК

Цитокин	АД обострение (n = 24)	АД вне обострения (n = 24)	Группа контроля (n = 16)
IL-6	106,01 (35–168,04)	53,16 (21,73–163,73)	76,68 (50–136,57)
IL-1 β	1591,3 (647,7–5326,9)*	950,96 (148,9–3590,6)*	85,41 (28,48–1662,72)
IL-1Ra	15,17 (7,66–28,13)	11,4 (6,52–26,68)	11,5(6,04–17,72)
IL-4	5,05 (2,67–17,27)	4,02 (3,08–7,45)	8,58 (3,62–21,7)
IL-5	63,38 (14,65–1 15,13)*	47,29 (22,69–106,88)*	111,93 (77,04–2 84,49)
IL-13	5,36 (3,3–13,65)*	5,94 (3,86–11,18)*	11,67 (7,59–17,01)
IL-12	2,83 (2,17–4,03)	2,19 (1,7–3,15)	3,5 (1,7–6,09)
IFN- γ	13,58 (4–26,54)	9,6 (7,07–19,96)*	23,08 (11,58–35,86)
IL-10	33,43 (18,33–67,07)	20,65 (11,29–36,92)	23,64 (17,7–51,26)
IL-17	16,01 (7,01–33,61)	13,95 (8,23–19,31)	9,22 (6,07–16,13)

Примечание: * – различия от группы контроля при $p < 0,05$; ** – различия от контроля при $p < 0,001$.

и стимулированной митогеном секреции ряда цитокинов. Уровень спонтанной и секреции регуляторных цитокинов: IL-10 и IL-17 в обострение, а также вне обострения был значимо ниже уровня секреции в группе контроля. Также при исследовании спонтанной секреции нами зафиксирована низкая продукция провоспалительного цитокина IL-1 β мононуклеарными клетками больных АД, а уровень продукции IL-5 не стимулированными МНК был ниже предела чувствительности метода, как у больных, так и в группе контроля (табл. 2).

Вне зависимости от фазы АД мы наблюдали статистически значимое, по сравнению с показателями группы здоровых доноров, снижение секреции митоген-индуцированными МНК Т-клеточных цитокинов: IL-12 и IFN- γ (Tx1), IL-5 и IL-13 (Tx2), IL-10 и IL-17 (Treg). Единственным цитокином, для которого выявлено повышение продукции стимулированными МНК у больных АД, был IL-1 β (табл. 3).

В качестве дополнительной характеристики цитокинпродуцирующей активности МНК был использован индекс стимуляции продукции цитокинов, который был получен простым отношением уровня цитокина в культуре, стимулированной митогеном КонА, к его уровню в не стимулированной культуре, для каждого индивида. Индексы стимуляции для каждого цитокина в исследованных выборках приведены в таблице 4. Статистический анализ полученных данных подтвердил, что МНК больных АД при стимуляции митогеном КонА демонстрируют значимо сниженный цитокиновый ответ как Tx1-клеток – IFN- γ , так и Tx2 клеток – IL-5 и IL-13. Также независимо от активности клинических проявлений, у больных АД зафиксирована повышенная стимуляция провоспалительного цитокина IL-1 β при сохранении индексов стимуляции IL-1Ra на уровне донорских значений.

При анализе концентраций цитокинов в кондиционных средах культур МНК периферической крови мы также, как и в случае с сывороточными уровнями цитокинов, не получили значимых различий от проявления симптомов АД; и в обостре-

ние, и вне обострения значения концентраций исследованных цитокинов значимо не отличались.

Обобщая полученные результаты можно сказать, что в отношении цитокинов: IL-5, IL-13 и IFN- γ у больных АД выявлены оппозитные изменения – высокие уровни в сыворотке крови и низкие в кондиционных средах стимулированных мононуклеарных клеток, на фоне повышенного уровня провоспалительных цитокинов, в частности IL-1 β , что указывает на смещение цитокинового профиля в сторону провоспалительных медиаторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленный дисбаланс регуляторных и провоспалительных цитокинов, с одной стороны, свидетельствует, что сывороточный цитокиновый фон при атопическом дерматите формируется, по всей вероятности, не за счет циркулирующего пула иммунокомпетентных клеток, а за счет продуцентов, локализованных непосредственно в очагах повреждения кожи, в пользу чего свидетельствуют и данные литературы о повышенной продукции цитокинов в «кожном окне» при атопическом дерматите [2]. С другой стороны, общая тенденция снижения продукции иммунорегуляторных цитокинов мононуклеарными клетками больных атопическим дерматитом в культуре может свидетельствовать о некоторой сниженной функциональной активности или анергии циркулирующих мононуклеаров крови при этом заболевании.

Однако, обращает на себя внимание уровень провоспалительных цитокинов, который значимо повышен (IL-1 β и IL-6) в сыворотке крови больных атопическим дерматитом и в культурах стимулированных мононуклеаров (IL-1 β), демонстрируя при этом невероятно высокие индексы стимуляции. Значимость провоспалительных цитокинов в патогенезе не так однозначна в настоящее время для атопического дерматита, как, например, для псориаза [6, 9], но, тем не менее, IL-1 β при атопическом дерматите вполне заслуживает пристального внимания исследователей.

Важным, на наш взгляд, является факт отсутствия значимых изменений в уровне цитокинов в сыворотке и в кондиционных средах культур МНК периферической крови у больных atopическим дерматитом на фоне снижения клинических признаков заболевания в процессе терапии. Следовательно, стандартная комбинированная терапия, не включающая специфические методы иммунокоррекции, не оказывает значимого влияния на цитокиновый профиль больных АД. Особое значение имеют сохраняющиеся высокие сывороточные уровни IL-5 и IL-13, которые рассматриваются как значимые звенья патогенеза и возможные молекулы-мишени для антицитокиновой терапии atopического дерматита [7, 11].

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (ГК № 16.512.11.2245)

ЛИТЕРАТУРА

1. Атопический дерматит: рек. для практ. врачей. — М.: Фармус Принт, 2002. — 45 с.
2. Загрешенко Д.С., Климов В.В., Денисов А.А. Цитокины «кожного окна» при atopическом дерматите // Бюл. сибир. мед. — 2009. — № 3. — С. 32–36.
3. Brandt E.B., Sivaprasad U. Th2 cytokines and atopical dermatitis // J. Clin. Cell. Immunol. — 2011. — Vol. 10. — P. 23.
4. Cantani A., Micera M. A study on 300 asthmatic children, 300 controls and their parents confirms the genetic transmission of allergy and asthma // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. — 2011. — Vol. 15. — P. 1051–1056.
5. Cork M.J., Danby S.G., Vasilopoulos Y., Hadgraft J. et al. Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis // Journal of Investigative Dermatology. — 2009. — Vol. 129. — P. 1892–1908.
6. Gutman-Yassky E., Lowes M.A., Fuentes-Duculan J., Whynot J. et al. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopical dermatitis from psoriasis // J. Allergy Clin. Immunol. — 2007. — Vol. 119. — P. 2010–2017.
7. Jung T., Stingl G. Atopic dermatitis: Therapeutic concepts evolving from new pathophysiologic insights // J. Allergy Clin. Immunol. — 2008. — Vol. 122. — P. 1074–1081.
8. Machura E., Mazur B. Intracellular production of il-2, il-4, ifn-gamma, and tnfr-alpha by peripheral blood cd3+ and cd4+ t cells in children with atopical dermatitis // Eur J Pediatr. — 2007. — Vol. 166, N 8. — P. 789–795.
9. Novak N., Bieber T., Leung D.Y.M. Immune mechanisms leading to atopical dermatitis // J Allergy Clin Immunol. — 2003. — Vol. 112. — P. 128–139.
10. Spergel J.M. Immunology and Treatment of Atopic Dermatitis // Am. J. Clin. Dermatol. — 2008. — Vol. 9, N 4. — P. 233–234.
11. Williams H., Robertson C., Stewart A. World-wide variations in the prevalence of symptoms of atopical eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood // J. Allergy Clin. Immunol. — 1999. — Vol. 103. — P. 125.
12. Zeppa L., Bellini V., Posted P.L. Atopic dermatitis in adults // J. Dermatol. — 2011. — Vol. 22. — P. 40–46.

Сведения об авторах

Силков Александр Николаевич — старший научный сотрудник ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат биологических наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14; тел.: (383) 2221910; e-mail: exon@ngs.ru)

Ковалевская-Кучерявенко Татьяна Владимировна — врач аллерголог, отделение аллергологии клиники иммунопатологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Фалалеева Светлана Алексеевна — аспирант, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Шевченко Юлия Александровна — научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат биологических наук

Непомнящих Вера Макаровна — заведующая отделением аллергологии клиники иммунопатологии, врач высшей категории, заслуженный врач РФ ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Сенников Сергей Витальевич — заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

С.В. Смирнова, У.В. Малык ¹, М.В. Смольникова

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ ЧЕРВЕОБРАЗНОГО ОТРОСТКА И ИММУНОПАТОГЕНЕЗА ОСТРОГО АППЕНДИЦИТА У БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЕЙ

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)
Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск)

¹ ФМБА Клиническая больница № 51 (Железногорск)

Червеобразный отросток как один из важнейших звеньев иммунной системы, не только выполняет иммунологический надзор в организме человека, но и может служить «шоковым» органом развития аллергического воспаления. Морфологические изменения, наблюдающиеся в воспаленном аппендиксе, выявляют ряд особенностей, присущих с одной стороны форме заболевания, с другой стороны — генезу воспаления. В статье указаны изменения функционального состояния иммунной системы и морфологические особенности червеобразного отростка у больных острым аппендицитом, свидетельствующих в пользу аллергического генеза воспаления.

Ключевые слова: аппендицит, иммунная система, морфология, аллергия

THE MORPHOLOGY FEATURES OF THE APPENDIX AND IMMUNOPATOGENESIS OF ACUTE APPENDICITIS AT PATIENTS WITH ALLERGY

S.V. Smirnova, U.V. Malyk ¹, M.V. Smolnikova

Research Institute for Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk
Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk

¹ Clinical Hospital No 51, Zheleznogorsk

Appendix as one their major part of immune system, not only carries out immunological supervision in an organism of the person, but also can serve as "shock" body of development of an allergic inflammation. Morphological changes observed in the inflamed shoot, reveal a number of the features inherent on the one hand in the form of disease, from other side — genesis of inflammation. In the review changes of a functional condition of immune system and morphological features appendix at patients with acute appendicitis, testifying in favor of allergic genesis inflammation are specified.

Key words: appendicitis, immune system, morphology, allergy

Червеобразный отросток, как периферический орган иммунной системы, играет существенную роль в иммунологических процессах, происходящих в организме человека. Расположенный на границе двух отделов кишечника и чрезвычайно насыщенный лимфоидными фолликулами отросток является иммунорецепторным органом, который по принципу обратной связи регулирует полноту ферментного расщепления продуктов питания с помощью оценки степени антигенности химуса. Червеобразный отросток не только выполняет иммунологический надзор, как один из важнейших звеньев иммунной системы, но и может служить «шоковым» органом развития аллергического воспаления. Аллергическая теория дает возможность объяснить в некоторых случаях механизмы развития острого аппендицита [1]. Аллергический механизм воспаления предполагает проникновение аллергенов во внутреннюю среду и сенсибилизацию организма. В условиях сенсибилизации в лимфоидной ткани, под действием даже небольших по силе раздражителей, как специфического, так и неспецифического характера, очень легко возникает гиперергическое воспаление с некрозом и разрушением фолликулов, гиперемией сосудов всех слоев стенки червеобразного отростка. Особен-

ности воспаления при остром аппендиците обусловлены каскадом реакций с участием большого разнообразия клеток, факторов и медиаторов на местном и системном уровнях, взаимодействие которых и формирует характерный патологический процесс.

В связи с чем, была поставлена **цель** исследования: изучить морфологические изменения в червеобразном отростке и иммунологические показатели при остром аппендиците у больных с отягощенным аллергологическим анамнезом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 120 человек (53 мужчины и 67 женщин), средний возраст составил 20,4 (16,1; 35,5) года. В структуре патологии выделены следующие группы: больные с подозрением на острый аппендицит — аппендикулярная колика (АК, $n = 30$), пациенты, которым в процессе наблюдения на фоне купирования болевого синдрома, диагноз острого аппендицита снят; острый катаральный аппендицит (ОКА, $n = 30$); острый деструктивный (флегмонозный/гангренозный) аппендицит (ОДА, $n = 30$). Контрольную группу составили практически здоровые лица ($n = 30$), сопоставимые по полу и возрасту.

Всем больным выполнена аппендэктомия, проведено специфическое аллергологическое обследование (сбор аллергологического анамнеза, определение общего IgE методом иммуноферментного анализа с помощью тест-систем ООО «Алкор Био»). Определение характера воспалительных и деструктивных изменений основывалось на интраоперационной характеристике макропрепарата и результатах патоморфологического исследования удаленного червеобразного отростка (ЧО). Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови исследовали методом флуоресцентной микроскопии с использованием моноклональных антител. Концентрацию общих IgA, IgM, IgG в сыворотке периферической крови определяли методом радиальной иммунодиффузии по G. Mancini (1965). Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) в сыворотке крови оценивали турбидиметрическим методом. Статистическая обработка проведена с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Так как наблюдались отклонения от нормального распределения выборок, определяемого по методу Колмогорова — Смирнова и критерию Шапиро — Уилка, количественные данные в таблицах и тексте представлены в виде медианы (Me), и интерквартильного интервала (Q1 — Q3), где Q1 — 25 процентиль, Q3 — 75 процентиль. При сравнительном анализе двух групп по количественным признакам использовали непарный непараметрический критерий Вилсона — Манна — Уитни (U). Для анализа одновременно трех и более групп, применяли непараметрический H-критерий Краскела — Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отягощенный аллергологический анамнез отмечен у 70 % больных острым аппендицитом, из них в 28,5 % выявлена пищевая аллергия и 71,5 % — лекарственная аллергия. Клиника острого аппендицита развилась у 25 % больных на фоне острого респираторного заболевания (возможно респираторной аллергии), у 50 % — на фоне нарушения диеты. Следует отметить, что аллергическое воспаление чаще всего формируется на уровне барьерных органов, одним из которых является ЖКТ. Аппендикс наиболее «благоприятный» участок для реализации патологического процесса, в том числе аллергического генеза. Выявленные нами морфологические изменения, наблюдающиеся в воспаленном аппендиксе, имеют ряд особенностей, присущих с одной стороны форме заболевания, с другой — генезу воспаления.

При остром аппендиците аллергического генеза (рис. 1) — клеточная инфильтрация состоит сплошь из эозинофилов, плазмочитов и лимфоцитов. Количество эозинофилов в поле зрения — до 18, нейтрофилов — до 5. Процесс инфильтрации диффузного характера, захватывает слизистую и подслизистую оболочки. Покровный эпителий слизистой оболочки местами слущен, удается

видеть множественные первичные аффекты Ашоффа. Характерна высокая степень инфильтрации лимфоидных фолликулов. Они резко гиперплазированы, границы четкие, со светлыми зародышевыми центрами, герминативные центры отечны. В соединительной ткани интенсивный отек стромы, выражена фрагментация эластических и ретикулярных волокон. Сосуды ЧО паретически расширены, полнокровны, с умеренно выраженным стазом. Просветы отдельных сосудов полностью выполнены эозинофилами. Стенки сосудов утолщены, эндотелий набухший с участками гомогенизации.

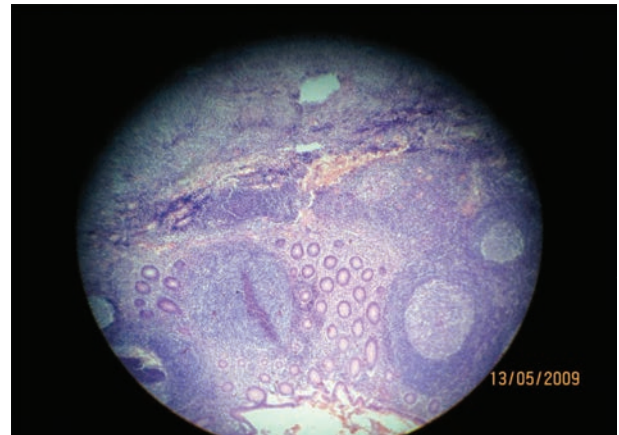


Рис. 1. Острый аппендицит аллергического генеза. Во всех частях стенки отмечается отек, гиперплазия фолликулов, ограниченные очаговые кровоизлияния. Лимфоидные фолликулы резко гиперплазированы, границы нечеткие, со светлыми зародышевыми центрами. Видны первичные аффекты Ашоффа.

При остром аппендиците неаллергического генеза (рис. 2) — процесс инфильтрации очагового характера, состоит преимущественно из нейтрофилов и макрофагов, с примесью эозинофилов и плазмочитов (эозинофилов в поле зрения — от 1 до 4, нейтрофилов — до 20), захватывает поверхност-

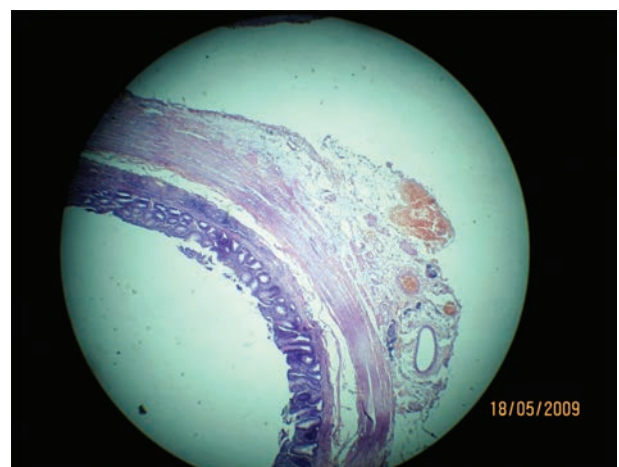


Рис. 2. Острый аппендицит неаллергического генеза. Процесс инфильтрации захватывает поверхностный отдел слизистой оболочки. Эластические и ретикулярные волокна фрагментированы частично. Лимфоидные фолликулы мелкие.

ный отдел слизистой оболочки. Лимфоидные фолликулы мелкие, границы смазаны, без выраженных зародышевых центров. Имеется незначительный отек стромы, эластические и ретикулярные волокна фрагментированы частично. В сосудах отростка слабо выраженный стаз.

Таким образом, для ОА аллергического генеза характерны: резкая гиперплазия фолликулов, обширное вовлечение отростка в воспалительный процесс с интенсивным отеком, тяжелым застоем, поражением сосудов (плазматическое пропитывание, фибриноидный некроз их стенок), а так же дезорганизация и разволокнение парапластической субстанции. При ОА аллергического генеза эозинофильно-клеточная инфильтрация отмечена в 100 % случаев, неаллергического — в 40–45 %. По степени тяжести самих деструктивных изменений, трудно дифференцировать эти две формы аппендицита, и местная эозинофильно-клеточная реакция приобретает значение важного критерия в установлении диагноза.

В периферической крови отмечался лейкоцитоз у 75 % больных. Сравнительный анализ показателей лейкограммы между группами АК, ОКА и ОДА выявил следующие достоверные изменения (табл. 1): снижение удельного веса моноцитов при АК неаллергического генеза относительно группы контроля; увеличение удельного веса эозинофилов при ОКА аллергического генеза относительно всех групп; повышение количества нейтрофилов и абсолютного количества моноцитов при ОДА относительно всех групп.

Изменения популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов в группе больных ОКА аллергического генеза (табл. 2) характеризуются: увеличением количества лимфоцитов относительно контроля и группы ОДА, повышением

числа CD4+ -клеток и абсолютного количества CD3+ -лимфоцитов относительно группы контроля и группы ОДА, снижением относительного числа CD8+ -лимфоцитов относительно контроля. В группе ОДА в зависимости от генеза воспаления выявлены следующие изменения: увеличение лейкоцитов, снижение относительного числа лимфоцитов относительно всех групп, снижение общего числа CD3+ - и CD4+ -лимфоцитов относительно всех групп, повышение относительного числа CD8+ -лимфоцитов при аллергическом генезе воспаления относительно всех групп.

При оценке гуморального звена иммунитета у больных ОКА неаллергического генеза выявлено снижение уровня IgG и IgA, повышение IgM относительно контроля и группы ОКА аллергического генеза. В группе больных ОА аллергического генеза независимо от формы заболевания повышены уровни IgE и IgG относительно контроля и группы ОКА неаллергического генеза, что свидетельствует о преобладании реактивных механизмов запуска аллергического воспаления (табл. 3).

ВЫВОДЫ

1. Определены морфологические особенности червеобразного отростка при остром аппендиците в зависимости от генеза воспаления. При остром аппендиците аллергического генеза — диффузная эозинофильная инфильтрация, гиперплазия лимфоидных фолликулов, интенсивный отек стромы, выраженный стаз сосудов.

2. В зависимости от формы и генеза воспаления при остром аппендиците установлены изменения показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Острый катаральный аппендицит аллергического генеза характеризуется повышением содержания CD3+ и CD4+-

Таблица 1
Показатели лейкограммы при остром аппендиците в зависимости от формы и генеза воспаления (Ме; Q 1-Q 3)

Показатели	контроль (n = 15)	АК (n = 15)	АК (n = 15)*	ОКА (n = 15)	ОКА (n = 15)*	ОДА (n = 15)	ОДА (n = 15)*	p
Нф (10 ⁹ /л)	2,9 (2,33–3,3)	4,14 (3,86–5,74)	2,97 (2,43–3,65)	5,57 (3,8–7,81)	5,46 (4,27–6,88)	7,77 (6,28–9,16)	7,38 (4,11–8,65)	p _{1,6} < 0,01 p _{1,7} < 0,05 p _{4,6} < 0,05 p _{межгр} = 0,08
Нф (%)	53 (48–58,2)	68,6 (62–72,05)	52,8 (50,2–55,9)	65,4 (54,95–72,85)	49,5 (46,25–51,97)	75,1 (69–79,85)	62,3 (54,35–77,0)	p _{1,6} < 0,05 p _{1,7} < 0,01 p _{5,6} < 0,05 p _{межгр} = 0,04
Мн (10 ⁹ /л)	0,42 (0,34–0,49)	0,41 (0,33–0,53)	0,47 (0,3–0,55)	0,6 (0,41–0,88)	0,67 (0,4–0,78)	0,68 (0,49–0,87)	0,71 (0,54–0,89)	p _{1,2} < 0,05 p _{2,7} < 0,05 p _{межгр} = 0,42
Мн (%)	8,08 (6,15–9,22)	5,33 (3,65–6,05)	8,05 (6,31–10,18)	7,72 (6,84–8,72)	5,86 (4,22–7,75)	6,98 (5,22–8,67)	7,39 (6,34–9,18)	p _{1,2} < 0,01 p _{2,4} < 0,05 p _{2,6} < 0,05 p _{межгр} = 0,05
Эо (10 ⁹ /л)	0,1 (0,06–0,21)	0,21 (0,19–0,33)	0,22 (0,15–0,3)	0,12 (0,04–0,32)	0,24 (0,13–0,39)	0,08 (0,03–0,16)	0,17 (0,04–0,28)	p _{1,5} < 0,05 p _{5,7} < 0,05 p _{межгр} = 0,22
Эо (%)	1,84 (1,4–3,3)	2,47 (1,4–8,9)	2,01 (1,63–5,08)	1,44 (0,53–2,87)	5,16 (2,74–6,26)	0,53 (0,32–1,4)	1,3 (0,31–3,05)	p _{1,5} < 0,05 p _{4,5} < 0,01 p _{межгр} = 0,06

Примечание: * – аллергический генез воспаления, p – достоверность различий (U-критерий Манна – Уитни), p_{межгр} – достоверность различий (по методу Краскела – Уоллиса).

Таблица 2

Показатели популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов в зависимости от формы и генеза воспаления (Ме; Q1–Q3)

Показатели	Контроль (n = 15)	АК (n = 15)	АК* (n = 15)	ОКА (n = 15)	ОКА* (n = 15)	ОДА (n = 15)	ОДА* (n = 15)	p
Лц (10 ⁹ /л)	4,96 (4,38–6,9)	8,9 (7,65–10,15)	6,2 (5,38–8,15)	10,1 (8,39–12,65)	9,4 (8,4–11,6)	12 (11,2–14,35)	13 (9,8–14,9)	p _{1,6} < 0,05 p _{1,7} < 0,05 p _{3,6} < 0,01 p _{3,7} < 0,05 p _{межгр} = 0,04
Лф (%)	35,35 (31,65–8,85)	24,4 (20,25–25,64)	32,6 (31,7–37,05)	24,8 (16,85–32,5)	39,4 (32,92–42,15)	16,2 (13,2–21,85)	24,1 (16,3–33,15)	p _{1,2} < 0,05 p _{1,5} < 0,01 p _{1,6} < 0,05 p _{1,7} < 0,05 p _{2,5} < 0,01 p _{5,6} < 0,05 p _{5,7} < 0,01 p _{межгр} = 0,02
Лф (10 ⁹ /л)	1,65 (1,34–2,34)	1,42 (1,21–2,17)	2,17 (1,66–2,56)	2,2 (1,43–2,7)	2,49 (1,94–3,03)	2,12 (1,29–2,39)	2,2 (1,76–2,98)	p _{1,5} < 0,05 p _{5,6} < 0,01 p _{5,7} < 0,05 p _{межгр} = 0,03
CD3 ⁺ (%)	71,5 (68–75)	70 (61–73)	66 (61–70)	58 (55,5–60)	62 (46–60,5)	43 (39–45)	42 (38–51)	p _{1,6} < 0,05 p _{1,7} < 0,01 p _{5,6} < 0,05 p _{5,7} < 0,05 p _{межгр} = 0,08
CD3 ⁺ (10 ⁹ /л)	1531,5 (1383,2–1634)	1359 (1060–1499)	1451 (1196–1684)	1009 (961–1063,5)	1587 (1390–1727)	721 (691,5–810)	654 (601,5–843)	p _{1,5} < 0,05 p _{1,6} < 0,05 p _{1,7} < 0,05 p _{5,6} < 0,01 p _{5,7} < 0,05 p _{межгр} = 0,07
CD4 ⁺ (%)	35,5 (32–45)	38 (33–43)	35 (32,5–40)	38 (33,5–41,5)	41 (36,5–42,5)	23 (20–25,5)	22 (19,5–28)	p _{1,5} < 0,01 p _{1,6} < 0,05 p _{1,7} < 0,05 p _{5,6} < 0,05 p _{5,7} < 0,05 p _{межгр} = 0,03
CD4 ⁺ (10 ⁹ /л)	654 (489–859,2)	673 (333–752,5)	627 (329,5–732)	702 (531,5–753)	844 (786,5–1024)	170 (145,5–200)	165 (143,5–199)	p _{1,5} < 0,05 p _{1,6} < 0,01 p _{1,7} < 0,05 p _{5,6} < 0,05 p _{5,7} < 0,05 p _{межгр} = 0,04
CD8 ⁺ (%)	36,5 (31,25–39)	40 (37–46)	42 (38,5–48)	39 (34,5–48,5)	28 (24–29)	41 (35,5–47)	46 (42–49)	p _{1,7} < 0,05 p _{5,7} < 0,05 p _{межгр} = 0,03
CD8 ⁺ (10 ⁹ /л)	428,5 (358,7–565,5)	489 (429–679,5)	463 (458,5–605)	420 (384,5–649)	413 (513,5–699)	387 (269,5–350)	392 (391–480,5)	p _{1,3} < 0,05 p _{2,3} < 0,05 p _{межгр} = 0,08

Примечение: * – аллергический генез воспаления, p – достоверность различий (U-критерий Манна – Уитни), p_{межгр.} – достоверность различий (по методу Краскела – Уолиса).

лимфоцитов, снижением относительного числа CD8⁺-клеток. Острый деструктивный аппендицит аллергического генеза характеризуется снижением абсолютного и относительного числа CD3⁺- и CD4⁺-лимфоцитов, повышением относительного числа CD8⁺-лимфоцитов. При остром аппендиците аллергического генеза, независимо от формы заболевания – отмечено повышение концентрации IgE, что свидетельствует в пользу атопии. При остром деструктивном аппендиците аллергического генеза – повышение концентрации IgG и ЦИК.

Таким образом, возникает вопрос, необходимо ли хирургическое вмешательство при аппендиците [2]. Совершенно очевидно, что единственно правильной тактикой хирурга в случаях воспаления червеобразного отростка, независимо от гене-

за воспаления (аллергического, неаллергического) является его удаление – аппендэктомия. Это, прежде всего, предотвращается прогрессирование местной воспалительной реакции и ликвидирует очаг всевозможных осложнений. Однако при остром аппендиците аллергического генеза, аппендэктомия не решает проблему аллергии вообще. Поэтому в случае наличия эквивалентов аллергии у больных острым аппендицитом, в дальнейшем требуется целенаправленное проведение специфического аллергологического обследования с целью установления и элиминации причинно-значимых аллергенов для профилактики развития аллергического воспаления на уровне других «шоковых» территорий, поскольку аппендэктомия решает проблему только местного характера.

Таблица 3

Показатели гуморального звена иммунитета в зависимости от формы острого аппендицита (Ме; Q1–Q3)

Показатели	контроль (n = 15)	КК (n = 15)	КК* (n = 15)	ОКА (n = 15)	ОКА* (n = 15)	ОДА (n = 15)	ОДА* (n = 15)	p
Ig E (МЕ)	42,65 (26,57–71,55)	54 (35,3–79,4)	103,7 (58,35–139,9)	38 (18,45–53,2)	172,5 (141,85–215,8)	50 (44,15–84,2)	189,1 (142,95–231,5)	$p_{1,5} < 0,01$ $p_{1,7} < 0,05$ $p_{4,5} < 0,05$ $p_{4,7} < 0,05$ $p_{\text{межгр}} = 0,03$
Ig A (г/л)	2,95 (2,4–3,65)	1,3 (0,85–3,3)	3,1 (2,6–3,85)	1,3 (1,2–1,65)	2,9 (2–3,8)	3,4 (2,25–4,2)	3,8 (2,26–4,15)	$p_{1,4} < 0,01$ $p_{4,5} < 0,05$ $p_{\text{межгр}} = 0,04$
Ig M (г/л)	0,95 (0,72–1,2)	1,6 (0,9–2,6)	1 (0,7–1,3)	2,8 (1,6–5,6)	0,9 (0,7–1,3)	4,8 (3,8–5,2)	1,3 (1–3,39)	$p_{1,4} < 0,01$ $p_{4,5} < 0,05$ $p_{\text{межгр}} = 0,01$
Ig G (г/л)	12,45 (9,55–15,17)	7,9 (7,25–14,45)	17,2 (16,35–18,65)	8,1 (7,6–11,45)	16,6 (14,75–18)	16,2 (14,25–18,05)	19,4 (17,2–20,9)	$p_{1,5} < 0,05$ $p_{1,7} < 0,05$ $p_{4,5} < 0,01$ $p_{4,7} < 0,05$ $p_{\text{межгр}} = 0,02$
ЦИК (у.е.)	24,5 (8,5–45,75)	46 (39,5–64,5)	110 (61,5–128)	81 (60–91)	106 (95–119)	107 (98,5–123)	129 (78–138,5)	$p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} < 0,05$ $p_{\text{межгр}} = 0,04$

Примечание: * – аллергический генез воспаления, p – достоверность различий (U-критерий Манна – Уитни), $p_{\text{межгр}}$ – достоверность различий (по методу Краскела – Уоллиса).

ЛИТЕРАТУРА

1. Harlak A., Gulec M., Menten O. Atopy is a risk factor for acute appendicitis? A prospective clinical study // J. Gastrointest. Surg. – 2008. – Vol. 12. – P. 1251 – 1256.
2. Mason R.J. Surgery for appendicitis: it is necessary? // Surg. Infect. (Larchmt). – 2008. – Vol. 9, N 4. – P. 481 – 488.

Сведения об авторах

Смирнова Светлана Витальевна – заместитель директора по научной работе ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (660100, г. Красноярск, ул. Чкалова, д. 41, кв. 117; тел. раб.: 8 391 228 06 81; email: svetvita@mail.ru)

Малык Ульяна Владимировна – врач-хирург ФГУЗ ФМБА клиническая больница № 51 (г. Железногорск), кандидат медицинских наук

Смоляникова Марина Викторовна – к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН

О.В. Смирнова

ХРОНИЧЕСКИЙ МИЕЛОЛЕЙКОЗ – КЛИНИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)

Проведено изучение особенностей клинических проявлений и иммунитета у больных хроническим миелолейкозом в зависимости от стадии заболевания. У больных при поступлении чаще выявлялись одышка, сердцебиения, лимфаденопатия, гепатомегалия, спленомегалия, проявления геморрагического синдрома. У больных независимо от стадии диагностировались иммунные нарушения, при этом наибольшие изменения – в терминальной стадии. У больных в развернутую, и в терминальную стадии развивался Т-клеточный иммунодефицит. Особенностью терминальной стадии являлось снижение содержания NK-клеток и В-лимфоцитов.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, иммунитет

CHRONIC MYELOID LEUKEMIA – CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PECULIARITIES IN ADULT PATIENTS

O.V. Smirnova

Research Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk

A study of the peculiarities of clinical manifestations and immunity in patients with chronic myeloid leukemia, depending on the stage of disease was made. In patients at admission were more prevalent shortness of breath, palpitations, lymphadenopathy, hepatomegaly, splenomegaly, hemorrhagic manifestations. Patients diagnosed at any stage had immune disturbances, with the greatest change – in the terminal stage. In patients in an expanded and in the terminal stages T-cell immunodeficiency developed. The peculiarity of the terminal stage was the reduction of NK-cells and B-lymphocytes.

Key words: chronic myeloid leukemia, immunity

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) составляет 20 % среди всех лейкозов. В странах Европы и Северной Америки по частоте распространения он занимает третье место после острых лейкозов и хронического лимфолейкоза. В Японии, Индии, Индонезии и других странах с низкой заболеваемостью хронический лимфолейкоз занимает второе место. Ежегодная заболеваемость ХМЛ составляет 1 – 1,5 на 100 тыс. населения во всех странах, и остается практически стабильной на протяжении последних 50 лет. Мужчины заболевают чаще женщин, составляя 55 – 60 % больных. Половина пациентов заболевает в возрасте 30 – 50 лет, чаще между 30 – 40 годами. При ХМЛ не выявлены признаки наследования заболевания, однако, известны отдельные сообщения о случаях семейного ХМЛ. ХМЛ выявлялся у лиц, переживших атомную бомбардировку в Хиросиме и Нагасаки, и среди больных спондилоартритом, получавшим рентгенотерапию.

В основе патогенеза ХМЛ лежит образование слитного гена BCR-ABL, продуцирующего белок со значительно более выраженной тирозинкиназной активностью, чем его нормальный прототип [8]. Активация различных участков генов ABL и BCR, возникающая в результате их слияния, обуславливает последовательную цепь событий в клетках, которые в конечном итоге ведут к увеличению клеточной пролиферации, нарушению дифференцировки клеток-предшественников. Клетки-носители гена BCR-ABL имеют меньшую по сравнению с нормальными, чувствительность к факторам, вызывающим апоптоз, что приводит не только к увеличению массы

опухолевых клеток, но и к эволюции болезни в связи с выживанием клеток с добавочными мутациями. Таким образом, биологический эффект BCR-ABL гена при ХМЛ сводится к: 1) увеличению митогенной активности в связи с усилением передачи митотического сигнала путем активации рецепторов гемопоэтических факторов; 2) нарушению адгезии клеток к строме; 3) ингибированию апоптоза; 4) возникновению нестабильного генома клетки в связи со снижением функции гена ABL [6].

В предшественниках нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, эритробластов, мегакариоцитов, моноцитов, макрофагов, В-лимфоцитов у больных ХМЛ обнаружена транслокация (9; 22) (q34; q11) и образуются клетки-носительницы, способствующие прогрессированию заболевания. Еще одним фактором, обуславливающим развитие онкологического заболевания, является снижение реактивности иммунной системы. С одной стороны, доказано, что именно иммунодефицитное состояние определяет развитие злокачественной опухоли [1, 9]. С другой, накапливается все больше сведений, что и сама опухоль индуцирует развитие иммунной супрессии, которая может проявляться в широком диапазоне (от незначительной степени до полной анергии) [7]. Механизмы, ответственные за нарушения функции иммунной системы, в настоящее время полностью не определены. Таким образом, несмотря на ряд проведенных исследований, многое в патогенезе ХМЛ остается неизученным. Недостаточно полно исследованы механизмы иммунной реактивности при ХМЛ. В связи с этим, целью настоящего исследе-

дования было изучение особенностей клинических проявлений и иммунитета у больных ХМЛ в зависимости от стадии заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В группу изучения были взяты 44 больных ХМЛ, при этом у 20 из них (45,5 %) диагностировалась развернутая стадия, а у 24 больных (54,5 %) — терминальная стадия заболевания. Средний возраст больных составил $55,2 \pm 2,4$ года, мужчин 18 (40,9 %) и женщин 26 (59,1 %). В качестве контроля обследовано 125 практически здоровых взрослых того же возрастного диапазона, которые были отобраны при профилактических осмотрах в ЛПУ города Красноярск. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, HLA-DR. Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный ($CD4^+/CD8^+$), лейко-Т-клеточный (Лейкоциты/ $CD3^+$), лейко-В-клеточный (Лейкоциты/ $CD19^+$) индексы, а также индекс активации Т-лимфоцитов ($HLA-DR^+/CD19^+$). Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М и G в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом, используя тест-системы ЗАО «Вектор-Бест». Состояние гуморального иммунитета характеризовали также уровнем относительного синтеза IgA ($IgA/CD19^+$), IgM ($IgM/CD19^+$) и IgG ($IgG/CD19^+$).

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MS Excel 2000 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакетов прикладных программ Statistica 7.0 производился статистический анализ для параметрических и непараметрических данных. Оценка достоверности различий осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента и критерия Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинически начальную стадию ХМЛ определить не удастся. Первым симптомом является нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом до миелоцитов и промиелоцитов при нормальном самочувствии больного. С нарастанием лейкоцитоза возникает потливость, слабость, повышенная утомляемость. Эти признаки обычно появляются при лейкоцитозе, превышающем $20 - 30 \times 10^9/\text{л}$. Имеются случаи, когда больные при уровне лейкоцитов $200 \times 10^9/\text{л}$ не отмечали каких-либо неприятных ощущений. Иногда первыми симптомами болезни служат тяжесть и небольшая боль в левом подреберье в связи с увеличением селезенки. Современная ранняя диагностика лейкоза показала, что увеличение селезенки есть почти всегда, но нередко многие месяцы и годы её не удастся пальпировать. В основе спленомегалии лежит миелоидная метаплазия в селезенке.

В развернутой стадии наблюдается астенический синдром (слабость, утомляемость), обусловленный повышенным клеточным распадом, который в отдельных случаях сопровождается гиперурикемией.

При очень высоком лейкоцитозе, достигающем $500 \times 10^9/\text{л}$ и более, возможны нарушения кровообращения в головном мозге, в связи со стазами лейкоцитов. В желудочно-кишечном тракте возникает кровотечение с последующим развитием ДВС-синдрома. Выраженной анемии и тромбоцитопении нет. Если цитостатическая терапия не проводится, то заболевание постепенно прогрессирует: нарастает лейкоцитоз, увеличиваются селезенка и печень, нарастают слабость, утомляемость и потливость [2].

Со временем патологический процесс прогрессирует. Это выражается в медленном, но неуклонном увеличении селезенки, в постепенном нарастании лейкоцитоза, требующего увеличения дозы цитостатиков, в некотором снижении показателей красной крови и тромбоцитов. Иногда в течение ХМЛ выявляется промежуточная (переходная) стадия, характеризующаяся снижением эффективности ранее используемых препаратов, ростом лейкоцитоза, увеличением в формуле крови миелоцитов и промиелоцитов. В этот период кариологический анализ выявляет появление Ph-позитивных клеток, которые начинают образовывать субклон. На каком-то непредсказуемом этапе монотонно развивающаяся доброкачественная опухоль превращается в опухоль поликлоновую, злокачественную, и процесс вступает в терминальную стадию. Клинически это проявляется внезапным изменением всей картины болезни: либо начинает быстро расти селезенка и в ней появляются инфаркты, либо без видимой причины повышается температура, либо появляются сильные боли в костях, либо развиваются плотные очаги саркомного роста в лимфатических узлах. Эти проявления болезни связаны с возникновением новых мутантных субклонов в рамках основного опухолевого клона, не способных к дифференцировке, но непрерывно пролиферирующих, вытесняющих исходный дифференцирующийся клон клеток. Изредка болезнь начинается с терминальной стадии. Развитие терминальной стадии меняет всю клиническую и гематологическую картину болезни. Становятся яркими признаки опухолевой прогрессии, отсутствующие прежде. Возникает тромбоцитопения, в ряде случаев лейкопения. В крови уменьшается процент сегментов и палочкоядерных нейтрофилов, увеличивается процент миелоцитов, промиелоцитов и бластных клеток. Возникает бластоз крови. Гематологические изменения в терминальной стадии ХМЛ чаще проявляются бластным кризом, характеризующимся нарастанием содержания бластов в костном мозге и крови. Вместе с бластными клетками, имеющими четкие цитохимические признаки родоначальников того или иного ряда, в крови и костном мозге находят и недифференцируемые бластные элементы. Количество бластных клеток может варьировать от 2 — 3 до 15 %. В терминальной стадии ХМЛ резко возрастает процент базофилов. Довольно редким вариантом является моноцитарный криз — появление и нарастание числа моноцитов. В крови обнаруживают осколки ядер мегакариоцитов и много эритрокариоцитов. В терминальной стадии угнетается нор-

мальное кроветворение. Именно гранулоцитопения, тромбоцитопения и анемия отягощают состояние больных. В ряде случаев начало терминальной стадии сопровождается увеличением селезенки, в которой обнаруживается высокий процент бластов. Иногда симптомом этой стадии становится увеличение печени с развитием в ней омоложенной миелоидной ткани. Одно из проявлений терминальной стадии — возникновение лейкемидов в коже, склонных к метастазированию, как по коже, так и в другие органы и системы. В терминальной стадии у больных ХМЛ часто встречается нейрорлейкемия, а в лимфатических узлах обнаруживаются очаги саркомного роста. Важнейшим и ранним признаком терминальной стадии и приближающегося бластного криза является развитие рефрактерности к цитостатикам, так как лейкозные клетки больных характеризуются повышенной мутабельностью [3].

У 20 больных (45,5 %) заболевание диагностировалось в развернутую стадию, а у 24 больных (54,5 %) — в терминальную стадию. У 6 больных (25 %) в терминальной стадии развился бластный нелимфоидный криз с последующим летальным исходом. Средняя продолжительность болезни составила $47,5 \pm 7,8$ месяца. Выписались живыми из стационара после проведения лечения 38 больных (86,4 %) ХМЛ. 6 больных умерли в стационаре при проведении терапии, что составило 13,6 % от всех заболевших: 3 — от инфекционных осложнений и 3 — от кровотечений.

У 3 больных (6,8 %) заболевание начиналось с анемических симптомов, у 13 (29,5 %) — с гиперпластических нарушений (главным образом — с увеличения селезенки), у 2 (4,5 %) — с инфекционных поражений, у 24 (54,5 %) — со смешанных симптомов заболевания и у 2 больных (4,5 %) — клинически начало заболевания протекало бессимптомно. У 34 больных (77,3 %) при поступлении выявлялась лихорадка. Все больные (100 %) жаловались на слабость и снижение работоспособности. 31 больной (70,5 %) отмечали у себя головокружение, а 21 (47,7 %) — шум в ушах.

У 23 больных (52,3 %) при поступлении при осмотре выявлялись различные проявления геморрагического синдрома: у 14 (31,8 %) — подкожные кровоизлияния, у 3 (6,8 %) — кровотечения из десен, у 6 (13,6 %) — носовые кровотечения.

У 36 больных (81,8 %) ХМЛ определялись симптомы различных инфекционно-воспалительных процессов. У 17 (38,6 %) при поступлении обнаруживались увеличенные лимфатические узлы различных групп и локализаций, у 4 (9,1 %) — гипертрофические изменения десен. У 38 больных (86,4 %) выявлялась гепатомегалия, у 27 (61,4 %) — спленомегалия. У 5 больных (11,4 %) диагностировались отеки нижних конечностей. Как правило, у больных ХМЛ наблюдается сочетание выраженного астеновегетативного синдрома со спленомегалией.

У 23 больных (52,3 %) при поступлении выявлялась одышка при незначительной физической нагрузке, а 12 (27,3 %) — жаловались на сердцебиения. Вероятно, одышка обусловлена появлением

гепатомегалии и спленомегалии, а также, учитывая их возраст, не исключается наличие сопутствующего кардиологического заболевания.

Больные ХМЛ получали адекватную стадии терапию. В развернутой стадии — миелосан, гидреа, в терминальной стадии при развитии бластного нелимфоидного криза — терапия по программе 7 + 3.

У всех 44 больных (100 %) получена ответная реакция организма на проводимую терапию. У 14 (31,8 %) возникла панцитопения во время лечения, у 26 (59,1 %) — в крови агранулоцитоз. Этот период осложнился появлением инфекции у 26 больных (59,1 %), у 6 (13,6 %) — геморрагические нарушения, у 32 (72,7 %) — анемические осложнения средней и тяжелой степени тяжести.

Таким образом, у наблюдаемых больных ХМЛ заболевание чаще начиналось с возникновения в клинической картине смешанных симптомов заболевания. У большинства больных при поступлении выявлялись лихорадка, слабость, снижение работоспособности, головокружения, одышка, проявления геморрагического синдрома, сопутствующий инфекционный процесс, гепатомегалия, спленомегалия. У всех больных была ответная реакция на проводимое лечение. Однако у большинства больных развился агранулоцитоз с инфекционными осложнениями. У большинства больных выявлялись и анемические осложнения.

ХМЛ — опухоль, возникающая из ранних клеток-предшественниц миелопоэза, дифференцирующихся до зрелых форм, поэтому клеточным субстратом лейкоза являются преимущественно гранулоциты, в основном нейтрофилы. Тяжелое течение заболевания, неуклонное прогрессирование процесса, несмотря на проводимое лечение, большое количество осложнений, трудоспособный возраст заболевших — все это определяет чрезвычайную актуальность изучения патогенеза ХМЛ с позиций механизмов иммунореактивности [5].

При исследовании состояния клеточного звена иммунитета у больных ХМЛ установлено, что в терминальной стадии снижаются абсолютные содержания лейкоцитов и лимфоцитов в крови, относительно контрольных показателей, а последний параметр и относительно показателей больных в развернутой стадии. Независимо от стадии заболевания, у больных снижаются относительные уровни $CD3^{+}$ -, $CD4^{+}$ -клеток, повышается процентный уровень $CD19^{+}$ -лимфоцитов, относительно показателей контрольной группы. У больных в терминальной стадии снижаются абсолютные концентрации $CD3^{+}$ -, $CD4^{+}$ -, $CD8^{+}$ -, $CD16^{+}$ -, $CD19^{+}$ -лимфоцитов и лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR⁺-антиген, относительно контрольных значений, при этом показатели абсолютного содержания $CD8^{+}$ -, $CD19^{+}$ -, HLA-DR⁺-лимфоцитов достоверно ниже, чем у больных в развернутой стадии (табл. 1).

У больных в развернутой стадии абсолютные показатели $CD19^{+}$ - и HLA-DR⁺-лимфоцитов достоверно выше, чем у больных в терминальной стадии и контрольной группы. У больных ХМЛ независимо от стадии заболевания снижен лейко-В-клеточный

коэффициент, относительно контрольных значений. У больных в развернутой стадии снижен иммунорегуляторный индекс, по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

При исследовании состояния гуморального звена иммунитета установлено, что у больных в развернутой стадии ХМЛ, относительно контрольных показателей, снижены коэффициенты относительного синтеза IgA и IgM, причем последний показатель достоверно ниже, чем у больных в терминальной стадии. У больных в терминальной стадии снижены концентрации IgA и IgM в крови, относительно контрольной группы (табл. 2).

Таким образом, у больных в развернутой стадии ХМЛ снижаются относительные уровни Т-лимфоцитов, CD4⁺-клеток, цитотоксических лимфоцитов, повышаются относительное и абсолютное содержания В-лимфоцитов и абсолют-

ное количество лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR антиген. У больных в развернутой стадии снижаются лейко-В-клеточный коэффициент и иммунорегуляторный индекс. При исследовании состояния гуморального звена иммунной системы у больных в развернутой стадии обнаружено снижение уровней относительного синтеза IgA и IgM.

У больных в терминальной стадии ХМЛ обнаружено снижение абсолютных количеств лейкоцитов и лимфоцитов в крови, относительных и абсолютных уровней Т-лимфоцитов, CD4⁺-клеток, и абсолютных количеств цитотоксических лимфоцитов, NK-клеток, В-лимфоцитов и лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR антиген, и повышение относительного уровня В-лимфоцитов. У больных в терминальной стадии снижен лейко-В-клеточный коэффициент. При исследовании состояния гуморального звена иммунной системы у больных

Таблица 1
Состояние фенотипического состава лимфоцитов крови у больных на разных стадиях ХМЛ (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль (n = 118)		Развернутая (n = 20)		Терминальная (n = 24)	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	5,73	4,85–7,75	6,10	4,90–9,40	3,0	0,95–11,30
					$p_1 < 0,05$	
Лимфоциты (%)	38,0	31,0–45,0	40,50	28,0–83,0	63,0	21,5–79,0
Лимфоциты (10 ⁹ /л)	2,16	1,61–2,83	2,69	1,52–4,55	1,06	0,60–3,26
					$p_1 < 0,01; p_2 < 0,05$	
CD3 ⁺ (%)	67,0	60,0–72,0	40,00	36,0–56,0	42,0	37,0–61,5
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
CD3 ⁺ (10 ⁹ /л)	1,39	1,01–1,88	1,25	0,53–2,7	0,49	0,23–1,71
					$p_1 < 0,001$	
CD4 ⁺ (%)	44,0	34,0–49,0	23,0	22,0–35,0	30,0	22,0–39,0
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
CD4 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,84	0,55–1,27	0,70	0,37–1,37	0,38	0,14–1,10
					$p_1 < 0,001$	
CD8 ⁺ (%)	27,0	20,0–34,0	20,50	15,5–28,0	24,0	16,0–31,0
			$p_1 < 0,05$			
CD8 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,57	0,38–0,89	0,49	0,38–1,29	0,24	0,11–0,57
					$p_1 < 0,001; p_2 < 0,01$	
CD16 ⁺ (%)	20,0	17,0–23,0	18,0	7,0–25,0	21,0	8,50–38,0
CD16 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,45	0,31–0,60	0,41	0,17–0,81	0,23	0,14–0,41
					$p_1 < 0,01$	
CD19 ⁺ (%)	13,5	9,0–16,0	25,0	12,0–33,0	19,0	11,0–24,0
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,01$	
CD19 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,27	0,18–0,39	0,64	0,32–1,19	0,19	0,07–0,32
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,05; p_2 < 0,01$	
HLA-DR ⁺ (%)	15,0	12,0–20,0	17,0	7,0–35,0	17,0	10,5–24,0
HLA-DR ⁺ (10 ⁹ /л)	0,35	0,23–0,47	0,51	0,27–1,26	0,17	0,08–0,42
			$p_1 < 0,05$		$p_1 < 0,01; p_2 < 0,05$	

Примечание: p_1 – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы, p_2 – с показателями больных на развернутой стадии.

Таблица 2

Величины коэффициентов, характеризующих состояние клеточного звена иммунной системы и состояние гуморального иммунитета крови у больных на разных стадиях ХМЛ (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль (n = 118)		Развернутая (n = 20)		Терминальная (n = 24)	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Лейкоциты/CD3 ⁺	4,15	3,33–5,22	5,27	2,31–12,01	4,26	3,3–11,9
Лейкоциты/CD19 ⁺	20,83	16,45–29,2	10,95	4,71–17,09	13,44	8,1–26,3
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,05$	
HLA-DR ⁺ /CD19 ⁺	1,29	0,93–1,53	1,16	1,15–1,35	1,26	1,0–1,63
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,52	1,13–1,95	1,40	1,0–1,5	1,7	0,9–2,0
			$p_1 < 0,05$			
IgA (г/л)	1,91	1,33–3,20	1,67	0,71–3,2	1,25	0,49–3,2
					$p_1 < 0,05$	
IgM (г/л)	1,20	0,50–1,80	0,73	0,51–1,40	0,52	0,4–0,79
					$p_1 < 0,001$	
IgG (г/л)	10,3	8,18–14,12	14,0	6,4–36,0	6,65	5,2–22,0
IgA/CD19 ⁺ (нг/кл.)	6,73	3,85–13,46	1,13	0,76–3,66	5,07	1,6–36,7
			$p_1 < 0,001$			
IgM/CD19 ⁺ (нг/кл.)	4,07	1,65–11,0	0,92	0,51–2,32	2,80	0,73–8,1
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,05$	
IgG/CD19 ⁺ (нг/кл.)	38,84	25,3–66,67	29,76	5,46–45,65	66,6	20–137,6

Примечание: то же, что и для табл. 1.

в терминальной стадии обнаружено снижение в крови концентрации IgA и IgM.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у больных ХМЛ при поступлении чаще выявлялись одышка, сердцебиения, лимфаденопатия, гепатомегалия, спленомегалия. У наблюдаемых больных заболевание чаще начиналось со смешанных симптомов (54,5 %) и чаще выявлялись проявления геморрагического синдрома (52,3 %). У больных независимо от стадии выявляются иммунные нарушения. При ХМЛ наибольшие изменения иммунного статуса регистрируются в терминальной стадии. У больных ХМЛ и в развернутую, и в терминальную стадии развивается Т-клеточный иммунодефицит. Особенностью терминальной стадии больных ХМЛ является снижение содержания НК-клеток и В-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Г., Козлов В.К. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунодепрессии и иммунной резистентности // Цитокины и воспаление. — 2004. — № 1. — С. 8–19.
2. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. — М.: Ньюдиамед, 2002. — Т. 1. — 280 с.
3. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. — М.: Ньюдиамед, 2003. — Т. 2. — 280 с.
4. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. — М.: Медицина, 2001. — 576 с.
5. Ярилин А.А. Основы иммунологии. — М.: Медицина, 1999. — 608 с.
6. Afar D.E., Goga A., McLaughlin J., Witte O.N. et al. Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc // Science. — 1994. — Vol. 264, N 5157. — P. 424–426.
7. Chiou S.H., Sheu B.C., Chang W.C. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies // J. Reprod. Immunol. — 2005. — Vol. 67, N 1–2. — P. 35–50.
8. Issa J.P., Baylin S.B., Herman J.G. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications // Leukemia. — 1997. — Vol. 11, Suppl. 1. — P. 7–11.
9. Kotlan B., Simsa P., Teillaud J.L., Fridman W.H. et al. Novel ganglioside antigen identified by B cells in human medullary breast carcinomas: the proof of principle concerning the tumor-infiltrating B lymphocytes // J. Immunol. — 2005. — Vol. 175, N 4. — P. 2278–2285.

Сведения об авторах

Смирнова Ольга Валентиновна — заведующая лабораторией клинической патофизиологии и аллергологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (660062, г. Красноярск, ул. Вильского, 7а, кв. 136; тел.: 89135679719)

М.В. Смольникова, С.В. Смирнова

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ IL4 (C-590T) И IL10 (C-597A) С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)

Псориатический артрит — хроническое прогрессирующее заболевание суставов, протекающее на фоне псориаза. Как и артрит с псориазом в отдельности, он представляет собой системное мультифакториальное заболевание, причины которого доподлинно неизвестны, в связи с чем профилактика данного заболевания неэффективна. Предполагается, что существует генетически обусловленная предрасположенность к развитию псориатического артрита, в которой существенное значение имеют гены цитокинов, основных медиаторов иммунного ответа. Проведено исследование распределения полиморфизма генов противовоспалительных цитокинов IL4 (C-590T) и IL10 (C-597A) у больных псориазом, псориатическим артритом и здоровых доноров. Получено распределение генов IL4 и IL10 в европейской популяции г. Красноярск. Установлена ассоциация полиморфного маркера C-590T гена IL4, расположенного в промоторной области, с псориатическим артритом. Полученные данные позволяют предположить, что аллельный вариант C-590 является предрасполагающим фактором к более тяжелому течению псориаза и развитию патологии костно-суставной системы.

Ключевые слова: полиморфизм генов, псориатический артрит, интерлейкин

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHIC MARKERS OF THE IL4 (C-590T) AND IL10 (C-597A) GENES AND PSORIATIC ARTHRITIS

M.V. Smolnikova, S.V. Smirnova

Institute of Medical Problems of the North SB RAMS (Krasnoyarsk)

Psoriatic arthritis is a chronic progressive disease of joints developing along with psoriasis. Likewise arthritis and psoriasis alone, it represents the systemic multifactorial disease of unknown etiology; therefore prevention of the disease is inefficient. Genetic predisposition to psoriatic arthritis development is proposed with essential role of genes coding for cytokines, the main mediators of immune response. A study of the prevalence of polymorphisms of the genes of anti-inflammatory cytokines IL4 (C-590T) and IL10 (C-597A) in patients with psoriasis, psoriatic arthritis and healthy donors was carried out. The prevalence of the polymorphisms in the European population of Krasnoyarsk was obtained. An association of the C-590T polymorphic marker of the promoter region of the IL4 gene with psoriatic arthritis was established. The obtained results suggest that the C-590 allele is a contributing factor to heavier course of psoriasis and the development of bone system pathology.

Key words: genes polymorphism, psoriatic arthritis, interleukin

Псориатический артрит (ПА) представляет собой хронический прогрессирующий системный воспалительный процесс костно-суставной системы и развивается, по данным разных авторов, у 30–70 % пациентов с псориазом [1, 6, 7]. У одних больных псориаз предшествует развитию артрита, у других артрит и псориаз развиваются одновременно. Какое из этих двух слагаемых является следствием, а какое — причиной, пока однозначно не определено. Патогенетические механизмы псориаза окончательно не выяснены, что делает прогноз и профилактику данного заболевания затруднительной. Важную роль в патогенезе псориаза, как одного из мультифакториальных заболеваний, играет генетическая предрасположенность. Считается, что генетические факторы составляют около 60–70 % среди других причин возникновения псориаза, клинического течения заболевания и темпа прогрессирования костно-хрящевой деструкции [2, 3].

Основанием для признания роли генетических факторов при ПА послужили статистически достоверное учащение случаев ПА в семьях больных этим заболеванием, а также результаты, полученные близнецовым методом [15]. Однако подавля-

ющее большинство случаев ПА не укладывается в законы менделевской генетики. Вероятно, развитие заболевания вызвано не каким-либо генетическим дефектом, а неблагоприятным сочетанием нормальных полиморфных аллелей различных генов — полиморфизмом. В отличие от мутаций генные полиморфизмы встречаются в популяции исключительно часто и сами по себе не имеют патологической значимости [4]. Нежелательный эффект проявляется лишь при достижении избыточного сочетания «неудачных» аллелей генов и/или действия провоцирующих внешних факторов [8].

Учитывая иммунопатологические изменения при ПА, наиболее перспективным направлением является исследование полиморфных вариантов генов, вовлеченных в формирование иммунного ответа. При псориазе и псориатическом артрите наблюдается дисбаланс продуцируемых Th1/Th2 клетками интерлейкинов (IL), которые обеспечивают межклеточные медиаторные контакты, участвуя в запуске иммунопатологических реакций [5]. Установленное гиперактивное состояние Т-хелперной системы иммунитета при псориазе сегодня рассматривается как ключевой момент в каскаде взаимодействий между клетками воспалительного

инфильтрата, кровеносными сосудами и кератиноцитами, приводящий к развитию клинических проявлений [6]. На современном этапе поиска и изучения генов-маркеров предрасположенности (резистентности), характера течения псориаза, развития псориатического артрита важное место занимает полиморфизм генов цитокинов.

В связи с чем, цель настоящей работы состояла в оценке ассоциации полиморфных маркеров некоторых генов иммунной системы — противовоспалительных цитокинов *IL4* (C-590T) и *IL10* (C-597A) с развитием псориатического артрита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований послужили образцы ДНК от 79 больных псориазом в среднем возрасте 43 года (42 женщины, 37 мужчин), у 51 больного из общей группы был диагностирован ПА. Все больные обследованы в прогрессирующую стадию течения заболевания. При постановке диагноза «псориаз» использованы классические клинические критерии: наличие феноменов псориатической триады («стеаринового пятна», «терминальной пленки», «точечного кровотечения»), возникновение изоморфной реакции Кебнера, периферический рост элементов (яркий венчик эритемы). Контрольную группу составили относительно здоровые доноры ($n = 52$), сопоставимые по полу и возрасту с больными. Все обследованные являлись европеоидами в трех поколениях, жителями г. Красноярск.

Геномная ДНК выделялась из периферической венозной крови с помощью набора «Silica» (ООО «Лаборатория Медиген», Россия). Участки промоторных регионов генов амплифицировали с использованием пары специфичных праймеров, используя ПЦР. Реакционная смесь, объемом 20 мкл, содержала 0,25 нг ДНК, 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,25 мМ каждого из dNTP, 1 – 2 е.а. Taq-полимеразы («Сибэнзим», Россия), в стандартном буфере, поставляемом производителем фермента. Затем продукты амплификации подвергались гидролизу специфичной эндонуклеазой рестрикции (табл. 1). Затем фрагменты ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете после электрофоретического разделения в 2% агарозных гелях, окрашенных этидий бромидом.

Обработку результатов генетических исследований осуществляли с использованием критерия

отношения шансов OR с расчетом 95% доверительного интервала (CI). Распределение генотипов по полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди — Вайнберга (РХВ) с помощью критерия χ^2 и точного теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота распределения генотипов и аллелей исследованных полиморфных локусов *IL4* (C-590T) и *IL10* (C-597A), полученная нами у здоровых доноров и больных псориазом жителей г. Красноярск, в целом характерна для европеоидных популяций [4]. Анализ полиморфизма C-590T промоторного участка гена *IL4* показал преобладание частоты гомозиготного варианта СС, частота мутантного варианта ТТ была минимальной в группе здоровых (1,9 %) и более распространена у больных псориазом (7,6 % в общей группе, 10,7 % в группе ПС) (табл. 2). При анализе распределения частот генотипов гена *IL10* показано преобладание генотипа СС, генотип АА не встречался у здоровых доноров, тогда как его частота в группе ПС составила 7,2 % (3,8 % в общей группе больных). Тем не менее, различия частот генотипов исследуемых генов цитокинов между группой больных псориазом и здоровыми донорами, жителями г. Красноярск, были статистически недостоверны.

В результате анализа частот генотипов и отдельных аллельных вариантов, нами обнаружена ассоциация полиморфного маркера C-590T гена *IL4*, расположенного в промоторной области, с псориатическим артритом (ПА) ($p = 0,03$) (табл. 2). В группе с артритом частоты генотипов отличались от группы больных без изменений в костно-суставной системе (ПС) в сторону увеличения частоты гомозиготного варианта СС за счет уменьшения частоты генотипов СТ и ТТ. Частота генотипа СС у больных ПА почти вдвое превышает частоту этого варианта у больных ПС за счет того, что частоты СТ и ТТ в группе больных без артропатологии значительно выше, чем в группе ПА. Сравнение частот аллелей показало положительную взаимосвязь аллельного варианта C-590 *IL4* с псориатическим артритом — его частота у больных ПА 0,83, у больных без артрита 0,66 ($p = 0,01$; OR 2,57; CI (1,13 – 5,88)).

Исследование распределения генотипов полиморфного маркера C-597A гена *IL10*, также расположенного в промоторной зоне, среди больных псориазом и псориатическим артритом, не показало

Таблица 1

Характеристики исследованных полиморфизмов

Ген	Полиморфизм ¹	Структура праймеров	Температура отжига праймеров, °C	Фермент рестрикции	Продукты гидролиза, п. н.		Литература
					Аллель «дикого» типа	Мутантный аллель	
<i>IL4</i>	C-590T	5'cacctaaacttgggagaacatggt3' 5'gttgtaatgcagtcctcctg3'	60	Bme 181 ²	194;23	217	10, 11
<i>IL10</i> ³	C-597A	5'atccaagacaacactactaa-3' 5'taaatatcctcaaggtcc-3'	58	Rsa I 4 ²	306; 232; 42	240;232; 66; 42	13

Примечание: 1 – первым указан аллель «дикого» типа; 2 – производство «Сибэнзим», Новосибирск; 3 – продукт амплификации состоит из 587 bp.

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов у больных псориазом, псориатическим артритом и здоровых доноров

Ген	Полиморфизм	Генотип	Группы								p
			Доноры (1)		Псориаз (2)		ПА (3)		ПС (4)		
			п	%	п	%	п	%	п	%	
IL4	C-590T	CC	31	59,6	49	62,0	37	72,6	12	42,9	p _{1,2} = 0,28 p _{3,4} = 0,03 p _{1,3} = 0,12 p _{1,4} = 0,13
		CT	20	38,5	24	30,4	11	21,6	13	46,4	
		TT	1	1,9	6	7,6	3	5,8	3	10,7	
		T	22	0,21	36	0,23	17	0,17	19	0,34	
IL10	C-597A	CC	38	73,1	46	58,2	30	58,8	16	57,1	p _{1,2} = 0,12 p _{3,4} = 0,51 p _{1,3} = 0,22 p _{1,4} = 0,08
		CA	14	29,9	30	38,0	20	39,2	10	35,7	
		AA	0	0	3	3,8	1	2,0	2	7,2	
		A	14	0,13	36	0,23	22	0,22	14	0,25	

Примечание: n – абсолютное число наблюдаемых генотипов и аллелей; p – уровень значимости, полученный с помощью критерия χ^2 и точного теста Фишера.

ло статистически достоверной ассоциации с заболеванием. Тем не менее, тенденция к взаимосвязи аллельного варианта существует – частота варианта A-597 IL10 у больных псориазом значительно выше, чем у здоровых доноров ($p = 0,06$; OR 1,9; CI (0,93-4,03)).

При анализе распределения полиморфизмов IL4 (C-590T) и IL10 (C-597A) в исследуемых группах ПА и ПС отдельно среди мужчин и женщин показаны статистически недостоверные отличия в частотах генотипов и аллельных вариантов указанных генов противовоспалительных цитокинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные по распределению двух полиморфных маркеров генов противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 среди европеоидного населения г. Красноярск отражают закономерности, характерные для европеоидного населения в целом. Аллели «дикого» типа C-590 IL4 и C-597 IL10 преобладают в группах здоровых доноров и больных псориазом, независимо от тяжести заболевания и проявления косто-суставной патологии. Мутантные генотипы TT-590 и AA-597 практически не встречаются в группе здоровых доноров в отличие от группы больных ПА. Популяционный анализ полиморфизма генов лежит в основе исследований генетических факторов предрасположенности к развитию заболеваний, в том числе аутоиммунных, связанных с дисфункцией иммунной системы [4, 8].

Анализ ассоциаций полиморфизма генов-кандидатов с изучаемой болезнью или патологическими признаками позволяет установить их патогенетическую роль и, таким образом, «картировать» заболевание. В настоящее время изучение полиморфных вариантов протеинов цитокиновой сети применяется главным образом для исследования их ассоциаций с патологией. Важность такого изучения может быть обоснована поиском потенциальных маркеров восприимчивости, тяжести

течения, и особенностей клиники заболеваний. Также это зачастую приводит к более глубокому пониманию этиологии и патогенеза заболеваний человека и разработке более эффективной терапии или улучшения существующих методов профилактики заболевания [12].

Полученные в данной работе результаты говорят об ассоциации полиморфизма промоторного региона IL4 (C-590T) с псориатическим артритом. Интерлейкин 4 (IL-4), цитокин Th2, является главным фактором регуляции пролиферативного ответа В-лимфоцитов и регулирует переключение изотипов иммуноглобулинов в них, индуцируя экспрессию IgG и IgE, его часто называют критическим цитокином воспаления. IL-4 выступает также как фактор роста Т-лимфоцитов и тучных клеток и является ключевым сигналом дифференцировки CD4+ Т-клеток в хелперы типа 2. Известно, что изучаемая нами точечная замена ассоциирована с уровнем продукции IL-4, одного из основных цитокинов, участвующих в развитии иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях. Точечная замена в положении – 590 обуславливает повышенную по сравнению с аллельным вариантом C-590 активность промотора, и, как результат этого, увеличенную экспрессию IL-4 и продукцию интерлейкина [9]. Полученные нами данные показывают, что аллельный вариант C-590 IL4 достоверно чаще встречается среди больных псориатическим артритом по сравнению с больными псориазом без артропатологии. Это предполагает, что носители аллеля C-590 могут иметь повышенный риск развития более тяжелой формы псориаза по сравнению с носителями другого аллеля.

Изучение полиморфизма гена интерлейкина 10 (IL-10), располагающегося на первой хромосоме, представляет особый интерес в связи с тем, этот цитокин играет основную роль в регуляции воспалительного и иммунного ответов, являясь продуктом Th2 клеток. IL-10 ингибирует синтез ряда цитокинов, продуцируемых Th1, таких как

IFN γ , IL-2, TNF α , а также IL-1, IL-6 и TNF α . Установлено, что присутствие аллельного варианта-592A ассоциировано с уменьшением продукции IL-10 [14]. Результаты проведенной работы показали, что генотип AA-597 не распространен у здоровых доноров, тогда как среди больных псориазом встречается с частотой 3,8 %. Таким образом, существует тенденция к взаимосвязи аллельного варианта A-597 IL10 с ПС. И, при увеличении выборок исследуемых, возможно, ассоциация будет сильнее.

Резюмируя полученные результаты, можно заключить, что полиморфные гены цитокинов являются важными генами-кандидатами такого мультифакториального заболевания, как псориаз и псориатический артрит. Определение генотипа больного, наряду с исследованием уровня экспрессии соответствующего гена, может сформировать суммарный прогностический критерий развития более тяжелой формы заболевания, в результате чего профилактические меры и выбор лечения будут наиболее эффективными для предотвращения инвалидизации населения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляев Г.М., Рыжко П.П. Псориаз. Псориатическая артропатия: этиология, патогенез, диагностика, лечение, профилактика. — М.: МЕД-пресс-информ, 2005. — 272 с.
2. Галимова Э.С. Молекулярно-генетические основы предрасположенности к псориазу // Генетика. — 2008. — Т. 44, № 5. — С. 594—605.
3. Довжанский С.И. Генетические и иммунные факторы в патогенезе псориаза // Рос. журн. кожных и венерических болезней. — 2006. — № 1. — С. 14—19.
4. Коненков В.И., Смольникова М.В.. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов // Мед. иммунология. — 2003. — Т. 5, № 1—2. — С. 11—28.

5. Кундер Е.В. Роль цитокинов в развитии системного и локального воспаления при псориатическом артрите // Цитокины и воспаление. — 2010. — Т. 9, № 1. — С. 25—28.

6. Лига А.Б., Ухина Т.В., Владимирова Е.В. Некоторые аспекты этиологии и патогенеза псориаза и поиск новых лекарственных соединений для его терапии // Клинич. дерматология и венерология. — 2008. — № 6. — С. 15—19.

7. Молочков В.А., Бадокин В.В., Альбанова В.И., Волнухин В.А. Псориаз и псориатический артрит. — М., 2007. — 304 с.

8. Пирузян А.А. Молекулярная генетика псориаза // Вестн. РАМН. — 2006. — № 3. — С. 33—43.

9. Borish L., Mascali J.J., Klennert M. SSC polymorphisms in interleukin genes // Hum. Mol. Genet. — 1994. — Vol. 3. — P. 1710.

10. Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lessonlie P. IL-1 β , IL-1 receptor antagonist, IL-4, and IL-10 gene polymorphisms // Arthr Rheum. — 1999. — Vol. 42, N 6. — P. 1093—1100.

11. Choi E., Lee H.J., Yoo T., Chanock S. A common haplotype of interleukin-4 gene IL4 is associated with severe respiratory syncytial virus disease in Korean children // The Journal of Infectious Diseases. — 2002. — Vol. 186. — P. 1207—1211.

12. Fresno M., Kopf M., Rivas L. Cytokines and infectious disease // Imm Today. — 1997. — Vol. 18, N 2. — P. 56—58.

13. Mok C.C., Lanchbury J.S., Chan D.W., Lau C.S. IL-10 promoter polymorphism in Southern Chinese patients with SLE // Arthritis Rheumatism. — 1998. — Vol. 41, N 6. — P. 1090—1095.

14. Turner D.M., Williams D.M., Sankaran D. An investigation of polymorphism in the IL-10 gene promoter // Eur. J. Immunogenet. — 1997. — Vol. 24, N 1. — P. 1—8.

15. Valdimarsson H. The genetic basis of psoriasis // Clin. Dermatol. — 2007. — Vol. 25, N 6. — P. 563—567.

Сведения об авторах

Смольникова Марина Викторовна — ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, кандидат биологических наук (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел. раб.: 89831520137; e-mail: smarinv@mail.ru)

Смирнова Светлана Витальевна — заместитель директора по научной работе ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (660100, г. Красноярск, ул. Чкалова, д. 41, кв. 117; тел. раб.: 83912280681; e-mail: svetvita@mail.ru)

А.В. Смык, Т.Я. Абрамова, И.Г. Соловьева, В.М. Непомнящих, С.В. Труфакин, В.С. Кожевников

ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН С РАЗЛИЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АСИММЕТРИЕЙ МОЗГА

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

На основании анализа собственных и литературных данных обосновывается взаимосвязь психофизиологических и иммунологических параметров у здоровых людей и у больных бронхиальной астмой. Главный акцент делается на выяснении роли функциональной асимметрии мозга, как базового феномена, определяющего особенности психической деятельности, а также вегетативной и иммунологической активности.

Ключевые слова: бронхиальная астма, функциональная асимметрия мозга, вегетативная нервная система, нейроиимунология

PSYCHOPHYSIOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA AND IN HEALTHY MEN WITH DIFFERENT FUNCTIONAL ASYMMETRY OF THE HEMISPHERES OF THE BRAIN

A.V. Smyk, T.Ya. Abramova, I.G. Solovjeva, V.M. Nepomnyashchikh, V.S. Trufakin, V.S. Kozhevnikov

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

On the basis of the analysis of own and literary data, proved the interaction psychophysiologic and immunologic parameters in healthy people and in patients with bronchial asthma. The main accent was made on the investigation of the role of the functional asymmetry of a brain, as the base phenomenon defining features of mental, vegetative and immunologic activity.

Key words: bronchial asthma, functional asymmetry of a brain, vegetative nervous system, neuroimmunology

Бронхиальная астма является тяжелой патологией, вызывающей хроническое воспаление дыхательных путей, в котором принимают участие многие клетки и клеточные элементы [3]. Формирование патологии связывают с изменением функций Т-клеточного звена иммунной системы, характеризующимся преимущественной активацией Th2 [9, 13]. Кроме того, в связи с прогрессированием заболевания и ослаблением барьерной функции эпителия бронхов не исключено присоединение инфекционного поражения, под влиянием которого иммунные процессы в бронхах могут приобретать черты Th1-зависимой патологии [11]. Известно, что у больных бронхиальной астмой большинство Т-клеток в дыхательных путях несут маркер CD45RO, ассоциированный с Т-клетками памяти, и содержание CD4⁺CD45RO⁺ клеток повышено в периферической крови, что характерно при обострении как для атопической, так и для неатопической формы астмы. По данным Global Initiative for Asthma [3], в развитии обострений бронхиальной астмы играет роль эмоциональный стресс, а, по мнению некоторых авторов, больные бронхиальной астмой характеризуются наличием целого спектра личностных нарушений [6, 8]. С позиции нейроиимунологии, варианты иммунологической картины бронхиальной астмы могут быть обусловлены характером функциональной межполушарной асимметрии, являющейся базовым феноменом, определяющим особенности психической деятельности, вегетативной и иммунологической активности.

Целью настоящей работы являлось исследование психофизиологических, нейровегетативных и иммунологических параметров здоровых и больных бронхиальной астмой женщин с различной функциональной межполушарной асимметрией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нейрофизиологическими, психологическими и иммунологическими методами было обследовано 79 женщин, больных бронхиальной астмой (инфекционно-зависимый и смешанный варианты), в возрасте от 20 до 60 лет (средний возраст — 43,19 ± 1,2) и 32 женщины аналогичного возраста (средний возраст — 45,75 ± 1,1), не имеющих острых воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваний. Определение функциональной межполушарной асимметрии по четырем парным функциям (двум моторным и двум сенсорным) проводилось с помощью опросного метода и функциональных проб [5]. Все обследованные делились на 3 группы. В группу 1 «правшей» были отнесены лица, праволатеральные по 4 парным функциям. Группа 2 включала «амбидекстров» с одним латерализованным слева или симметричным признаком. Группа 3 состояла из «амбидекстров» с двумя и более латерализованными слева или симметричными признаками [1]. Определение уровня активности отделов вегетативной нервной системы проводилось методом оценки вариабельности сердечного ритма [2, 7, 14]. Для тестирования «общих способностей» использовался краткий

ориентировочный тест (КОТ) — адаптированный тест Вандерлика. Указанное обследование позволяет в баллах определить «общие умственные способности» или «способности к обучению». Для определения параметров кратковременной памяти и реминисценции памяти использовался метод 10 слов [1]. Для тестирования типологических особенностей нервной системы использовалась экспертная психологическая программа группы авторов под руководством профессора Б.Я. Первомайского (1992). Программа позволяет определить силу, подвижность и инертность возбудительных и тормозных процессов, а также активность первой и второй сигнальных систем с учетом искренности и адекватности самооценки и числовым выражением полученных показателей.

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови проводилось методом проточной цитофлюориметрии (FACS Calibur, фирма Becton Dickinson, США) с моноклональными антителами против CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺; CD19⁺; HLA-DR⁺ фирм «МедБиоСпектр» и «Сорбент» (Москва). Содержание CD45RO⁺ и CD45RA⁺ Т-лимфоцитов определяли методом проточной цитофлюориметрии с использованием антител и согласно инструкции производителя (Becton Dickinson, USA). Относительное количество цитокин-продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ клеток определяли методом трехцветной проточной цитометрии с добавлением моноклональных антител к внутриклеточным цитокинам IFN γ и IL-4. Методом проточной цитофлюориметрии также определялся фагоцитоз частиц латекса, меченых ФИТЦ, гранулоцитами и моноцитами. Клеточные эффекторские функции определяли в тесте гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) по интенсивности продукции фактора торможения миграции и фактора торможения расщепления в ответ на митогенную стимуляцию (ФГА) мононуклеаров (МНК) *in vitro* [4]. Определение фаз клеточного цикла и апоптоза в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов проводили на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы CellQuest^{Pro} (Becton Dickinson, США). Относительное содержание клеток с гипердиплоидным (клетки в S/M фазах клеточного цикла) и с гиподиплоидным (апоптотические клетки) набором ДНК определяли по степени флуоресценции внутриядерного красителя 7-ADD.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Величины выражали в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, а m — стандартная ошибка. Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли U критерием Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По характеру функциональной межполушарной асимметрии здоровые женщины распределились следующим образом: 63,9 % составили «правши» (группа 1), 30,2 % — «амбидекстры» с одним латерализованным слева или симметричным

признаком (группа 2), а 5,9% — группу 3 «амбидекстров» с двумя и более латерализованными слева или симметричными признаками. Распределение по функциональной межполушарной асимметрии среди женщин, больных бронхиальной астмой, было таким: 51,1%; 31,9%; 17,0% соответственно в первой, второй и третьей группах. Несмотря на тенденцию к увеличению числа пациентов в группе 3, достоверных различий по характеру распределения функциональной межполушарной асимметрии между группами больных и здоровых женщин установлено не было. Группы здоровых и больных бронхиальной астмой женщин с различной функциональной межполушарной асимметрией не различались по возрасту, а группы пациентов были сопоставимы по варианту, степени тяжести и длительности течения бронхиальной астмы.

В группе женщин-«правшей», больных бронхиальной астмой (табл. 1), относительно аналогичной группы здоровых женщин, в покое установлено снижение активности парасимпатического отдела вегетативной нервной системы, при нагрузке на симпатический отдел не выявлено различий в активности отделов, а при дыхательной нагрузке определено повышение высокочастотной составляющей кардиоритмограммы (HF). Дисбаланс активности отделов вегетативной нервной системы в данной группе больных сопровождался снижением силы и подвижности возбудительных и увеличением инертности тормозных процессов в нервной системе, а также снижением показателей, характеризующих когнитивные функции. Для данной группы пациентов также был характерен дисбаланс основных звеньев иммунной системы: снижение показателей не только фагоцитарного, но и Т-клеточного звеньев, и количественная активация В-клеток.

При сравнении групп больных бронхиальной астмой с различной функциональной межполушарной асимметрией между собой было выявлено, что первая группа пациентов характеризовалась более низкими показателями содержания CD4⁺ лимфоцитов ($26,3 \pm 10,2$ против $39,5 \pm 5,7$, $p = 0,059$, группы 1 и 2 соответственно). При этом относительный дефицит был сопряжен с достоверным снижением содержания CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов (потенциально — Т-клеток памяти) ($12,0 \pm 2,4$ против $25,5 \pm 7,3$ %, $p = 0,01$, группы 1 и 2 соответственно; $12,0 \pm 2,4$ против $23,5 \pm 6,6$ %, $p = 0,02$, группы 1 и 3 соответственно). Выявленная недостаточность CD4⁺ лимфоцитов не сопровождалась повышением пролиферативной активности в данной популяции, о чем свидетельствовало снижение содержания указанных клеток, находившихся в S/M фазе клеточного цикла ($3,9 \pm 0,5$ % против $7,6 \pm 2,1$ %, $p = 0,02$, группы 1 и 2 соответственно). Кроме того, было установлено снижение содержания низкодифференцированных CD4⁺IFN γ ⁺/IL4⁺ лимфоцитов (на уровне выраженной тенденции), что может свидетельствовать о нарушении дифференцировки данной Т-клеточной субпопуляции в первой группе больных бронхиальной астмой. При этом не выявлено особенностей клинических про-

Таблица 1

Психофизиологические, нейровегетативные и иммунологические параметры больных БА и здоровых женщин группы 1 («правши»)

Психофизиологические параметры	Здоровые	Больные БА	P-level
Сила нервных процессов, о.е.	78,87 ± 1,4	72,77 ± 1,5	0,004
Сила возбуждения, о.е.	73,34 ± 1,5	69,06 ± 1,7	0,065
Подвижность возбуждения, о.е.	75,98 ± 1,9	66,52 ± 1,9	0,001
Инертность торможения, о.е.	52,85 ± 1,7	59,52 ± 2,1	0,014
«Общие способности» по КОТ, о.е.	21,55 ± 0,8	17,56 ± 0,6	0,001
Кратковременная память, %	85,11 ± 2,1	75,08 ± 2,4	0,002
Реминисценция памяти, %	74,58 ± 2,6	65,54 ± 3,3	0,029
Нейровегетативные параметры	Здоровые	Больные БА	P-level
SDNN в покое, мс	68,21 ± 8,6	33,62 ± 2,9	0,01
RMSSD в покое, мс	69,04 ± 11,1	28,67 ± 4,8	0,02
HF при дыхательной нагрузке, мс ²	1059,3 ± 410,2	3006,7 ± 940,1	0,029
Иммунологические параметры	Здоровые	Больные БА	P-level
CD3 ⁺ , %	65,29 ± 1,0	58,85 ± 1,2	0,001
CD4 ⁺ , %	40,38 ± 0,8	35,04 ± 1,4	0,001
CD19 ⁺ , %	12,96 ± 0,7	19,66 ± 1,1	0,001
Фагоцитоз гранулоцитарный, %	69,47 ± 1,1	57,51 ± 2,2	0,001
Фагоцитоз моноцитарный, %	59,27 ± 1,2	50,75 ± 1,9	0,001

Примечание: М ± m, U-критерий Манна – Уитни. Приведены показатели, по которым были установлены статистически значимые различия между группами. КОТ – краткий ориентировочный тест. SDNN – стандартное отклонение NN интервалов – квадратный корень из разброса NN. NN – интервал RR между двумя нормальными кардиоциклами. RR – интервал между характерными точками текущего и предыдущего кардиоцикла. RMSSD – квадратный корень средних квадратов разницы между смежными NN интервалами. HF (high frequency) – высокочастотные колебания, сопряжённые с дыханием и отражающие модулирующее влияние парасимпатического отдела нервной системы на пейсмекерную активность синусового узла.

явлений болезни для данной группы относительно других групп больных.

В группе больных бронхиальной астмой женщин-«амбидекстров» с одним латерализованным слева признаком (группа 2) относительно аналогичной группы здоровых женщин установлено снижение активности парасимпатического отдела и выраженная тенденция к снижению активности симпатического отдела вегетативной нервной системы в покое (табл. 2). Не выявлено различий в активности отделов относительно здоровых при ментальной нагрузке и только при дыхательной нагрузке определено повышение высокочастотной (парасимпатической) составляющей ритмограммы (HF), что практически не различается с показателями и состоянием активности вегетативной нервной системы больных женщин-«правшей». Во второй группе больных также были снижены когнитивные функции, сила и подвижность нервных процессов, но, в отличие от группы правшей, во второй группе снижалась сила тормозных, а не возбуждающих процессов. Следует отметить, что со стороны иммунной системы, помимо патологического увеличения содержания В-клеток и выраженного снижения фагоцитоза, установлена активация эффекторных функций Т-клеточного звена иммунной системы (ПЭФ_{фра}). Кроме того, во второй группе пациентов определено повышение содержания CD4⁺

клеток, находящихся в S/M фазе клеточного цикла (что свидетельствует об активации пролиферативного процесса данной клеточной субпопуляции), и выраженная тенденция к повышению апоптоза CD8⁺ лимфоцитов (0,42 ± 0,10 против 0,87 ± 0,28 %, $p = 0,07$, группы 1 и 2 соответственно). Клинической особенностью пациенток данной группы было наличие выраженной одышки.

В группе больных бронхиальной астмой женщин-«амбидекстров» с двумя и более латерализованными слева признаками (группа 3) обращало на себя внимание выраженное снижение (относительно аналогичной группы здоровых) активности симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы по временным и спектральным параметрам в покое и при нагрузках на отделы (табл. 3). При ментальной нагрузке для группы больных характерна централизация управления сердечным ритмом (ИН). Обращает на себя внимание менее выраженный диапазон изменений активности отделов вегетативной нервной системы при нагрузках по сравнению со здоровыми женщинами аналогичной группы. Кроме того, в группе 3 повышение активности первой сигнальной системы сопровождалось выраженной тенденцией к активации второй сигнальной системы. Показатели «общих способностей» пациенток были снижены по сравнению с аналогичной группой здоровых,

Таблица 2

Психофизиологические, нейровегетативные и иммунологические параметры больных БА и здоровых женщин группы 2 («амбидекстры» с доминантностью правого полушария по одной из четырёх парных функций)

Психофизиологические параметры	Здоровые	Больные БА	P-level
Сила нервных процессов, о.е.	78,15 ± 2,2	69,37 ± 2,0	0,004
Сила торможения, о.е.	71,96 ± 2,2	65,30 ± 2,1	0,031
Подвижность возбуждения, о.е.	77,27 ± 2,4	63,83 ± 2,5	0,001
«Общие способности» по КОТ, о.е.	20,08 ± 0,8	16,40 ± 0,7	0,001
Кратковременная память, %	88,73 ± 2,6	70,23 ± 2,9	0,001
Реминисценция памяти, %	77,81 ± 4,5	56,30 ± 3,9	0,001
Нейровегетативные параметры	Здоровые	Больные БА	P-level
SDNN в покое, мс	57,39 ± 8,6	28,58 ± 2,9	0,02
RMSSD в покое, мс	48,91 ± 10,2	20,83 ± 3,5	0,059
LF в покое, мс ²	836,10 ± 201,8	301,65 ± 85,7	0,072
HF при дыхательной нагрузке, мс ²	756,99 ± 213,3	3270,9 ± 1259,7	0,012
Иммунологические параметры	Здоровые	Больные БА	P-level
CD19 ⁺ , %	11,31 ± 1,02	18,70 ± 1,1	0,001
Фагоцитоз гранулоцитарный, %	65,54 ± 2,5	58,97 ± 2,2	0,053
ПЭФ фга, у.е.	3,34 ± 0,4	7,54 ± 1,3	0,053

Примечание: М ± m, U-критерий Манна – Уитни. Приведены показатели, по которым были установлены статистически значимые различия между группами. TP – (total power) тотальная мощность спектра. LF (low frequency) – низкочастотные колебания, обусловленные периодически возникающими всплесками симпатической активности и колебаниями ритма артериального давления, реализуемого через барорефлекторные механизмы.

в то время как по показателям памяти группы не различались. Иммунная система пациентов данной группы характеризовалась увеличением содержания В-клеток и HLA-DR⁺-моноцитов при снижении показателей фагоцитоза. В Т-клеточном звене иммунной системы больных бронхиальной астмой было выявлено относительное снижение содержания CD8⁺ клеток (25,3 ± 2,08 против 15,0 ± 1,4 %, $p = 0,024$, группы 1 и 3 соответственно). Данный дефицит сопровождался снижением количества «наивных» CD8⁺CD45RA⁺ лимфоцитов (18,9 ± 1,5 против 10,4 ± 2,0 %, $p = 0,02$, группы 1 и 3 соответственно). При этом имелась выраженная тенденция к повышению дифференцированных CD8⁺IFN γ ⁺ клеток (28,9 ± 6,5 против 51,2 ± 7,6 %, $p = 0,07$, группы 1 и 3 соответственно). Клинической особенностью 3 группы больных являлась относительно меньшая выраженность одышки.

Общеизвестна роль вегетативной нервной системы в проявлении аллергии и преобладающее влияние парасимпатического отдела в возникновении бронхоспазма при бронхиальной астме [11]. Известно также, что симпатический и парасимпатический отделы вегетативной нервной системы находятся в постоянном динамическом взаимодействии. При функциональном рассогласовании данных отделов, когда их активация не ведет к достижению приспособительного результата, принято говорить о внутрисистемной и/или межсистемной дезинтеграции. В нашем исследовании установлено снижение активности парасимпатического отдела вегетативной нервной системы в состоянии покоя у женщин-«правшей», больных бронхиальной

астмой. Указанный дефицит активности парасимпатического отдела компенсировался при нагрузке на дыхательную систему. Тем не менее, этот ответ на функциональную нагрузку значимо превышал параметры, характерные для здоровых лиц, что, с одной стороны, свидетельствует о наличии адаптационного потенциала у данного (трофического) отдела вегетативной нервной системы, а с другой – о наличии дисбаланса в функционировании вегетативной нервной системы у больных 1 группы. По мнению ряда исследователей, левое полушарие мозга, доминантное у пациентов этой группы, в норме осуществляет свои регулирующие функции именно через парасимпатический отдел вегетативной нервной системы [15].

Известно, что ацетилхолин – медиатор парасимпатического отдела вегетативной нервной системы – обладает зависящим от исходного уровня пролиферации модулирующим действием на пролиферативный ответ Т-клеток [12]. Возможно, с нарушением функционирования парасимпатического отдела связаны снижение содержания, нарушение процессов пролиферации и дифференцировки CD4⁺-клеток, обуславливающие дисбаланс Т-клеточного звена иммунной системы у пациентов первой группы.

В нашем исследовании больные бронхиальной астмой 1 и 2 групп характеризовались односторонними изменениями нейровегетативных параметров. В то же время, во второй (на уровне тенденции), как и в третьей (достоверно), группах пациентов было определено снижение активности симпатического отдела вегетативной нервной си-

Таблица 3

Психофизиологические, нейровегетативные и иммунологические параметры больных БА и здоровых женщин группы 3 («амбидекстры» с доминантностью правого полушария по двум и более из четырех парных функций)

Психофизиологические параметры	Здоровые	Больные БА	P-level
Активность I сигнальной системы, о.е.	55,20 ± 3,6	76,00 ± 2,2	0,001
Активность II сигнальной системы, о.е.	58,00 ± 5,6	67,87 ± 2,4	0,075
«Общие способности» по КОТ, о.е.	26,40 ± 0,9	17,94 ± 1,3	0,002
Нейровегетативные параметры	Здоровые	Больные БА	P-level
TP в покое, мс ²	3097,30 ± 938,2	1336,40 ± 310,7	0,034
LF в покое, мс ²	805,75 ± 236,4	260,51 ± 73,2	0,01
TP при ментальной нагрузке, мс ²	4791,80 ± 1652,7	1417,40 ± 341,9	0,011
VLF при ментальной нагрузке, мс ²	2241,75 ± 611,86	682,50 ± 204,6	0,008
LF при ментальной нагрузке, мс ²	1912,50 ± 921,5	409,08 ± 105,5	0,022
ИН при ментальной нагрузке, о.е.	67,95 ± 24,4	251,07 ± 41,3	0,02
VLF при дыхательной нагрузке, мс ²	1478,30 ± 584,5	498,40 ± 121,1	0,026
LF при дыхательной нагрузке, мс ²	4915,50 ± 1244,8	389,80 ± 103,8	0,001
Иммунологические параметры	Здоровые	Больные БА	P-level
CD19 ⁺ , %	11,00 ± 1,6	19,06 ± 1,8	0,027
Фагоцитоз гранулоцитарный, %	69,00 ± 3,9	55,31 ± 3,1	0,037
HLA-DR ⁺ -экспрессия (моноциты), %	87,80 ± 2,5	92,12 ± 0,6	0,022

Примечание: М ± m, U-критерий Манна – Уитни. Приведены показатели, по которым были установлены статистически значимые различия между группами. VLF – очень низкочастотная составляющая спектра (0,0033–0,04 Гц), характеризующая уровень основного обмена, терморегуляции, эрготропных функций, активность гуморально-метаболических влияний на ритм. ИН – индекс напряжения, вычисляемый по формуле $ИН = АМо / 2BP \times Мо$. Мо – мода – диапазон значений наиболее часто встречающихся R-R интервалов (сек.). АМо – амплитуда моды – число кардиоинтервалов, соответствующих значению моды (%). BP – вариационный размах – степень изменчивости кардиоинтервалов – при строго стационарных процессах по своей физиологической значимости не отличается от среднеквадратического отклонения.

стемы. Известно, что глюкокортикоиды, уровень которых связан с активностью симпатического отдела, влияют на направление дифференцировки Т-хелперов в Th2 лимфоциты [11]. Ни в одной из групп больных бронхиальной астмой женщин нами не было установлено повышения активности симпатического отдела вегетативной нервной системы ни в покое, ни при нагрузке на симпатический отдел. Возможно, дефицит активности симпатoadrenalовой системы обуславливает то, что в данном исследовании нам не удалось выявить известные по литературе особенности течения заболевания по Th2 типу у больных бронхиальной астмой женщин.

Следует отметить, что вторая группа пациентов занимала промежуточное положение по параметрам когнитивной сферы, характеру нарушений вегетативного обеспечения и изменений типологических особенностей нервной системы, и обладала некоторыми чертами сходства с первой и третьей группами больных. В иммунной системе пациентов второй группы наблюдалось повышение пролиферации CD4⁺-клеток и тенденция к повышению апоптоза CD8⁺-лимфоцитов. Возможно, с указанным дисбалансом Т-клеточного звена связаны худшие клинические характеристики второй группы пациентов по сравнению с третьей группой. Выявленное нами повышение эффекторных функций лимфоцитов во второй группе пациентов, определя-

емое по ответу Т-клеток на поликлональный активатор (фитогемагглютинин), может быть обусловлено тем, что в данном исследовании анализировались параметры больных с инфекционно-зависимым и смешанным вариантами бронхиальной астмы.

Третья группа больных характеризовалась тотальным снижением активности отделов вегетативной нервной системы, которое было сопряжено с неадекватным ответом на функциональные нагрузки и переходом управления ритмом на надсегментарный уровень при симпатической нагрузке. Тем не менее, для данной группы была свойственна одновременная активация обеих сигнальных систем мозга. Так, нами была установлена прямая корреляционная связь между первой и второй сигнальными системами в общей группе здоровых женщин, а в группе больных подобная зависимость была характерна только для группы 3 – повышение активности первой сигнальной системы сопровождалось выраженной тенденцией к повышению активности второй сигнальной системы. Известно, что одной из закономерностей взаимодействия сигнальных систем является иррадиация возбуждения [8]. Совместное повышение активности обеих сигнальных систем мозга свидетельствует об их синхронном функционировании у пациентов группы 3. Установленные особенности психофизиологических, нейровегетативных и иммунологических параметров были

сопряжены с менее выраженными клиническими проявлениями астмы — в частности, больные данной группы характеризовались менее выраженной одышкой относительно второй группы больных. Возможно, менее выраженная симптоматика заболевания в 3 группе была также связана с отсутствием функциональных нарушений CD8⁺ клеток на уровне процессов пролиферации и дифференцировки (несмотря на снижение их содержания).

Личностные особенности — снижение когнитивных функций и дисбаланс возбудительных и тормозных процессов в нервной системе — были свойственны всем группам больных бронхиальной астмой женщин, но выражены в разной степени и, по-видимому, детерминированы особенностями функциональной межполушарной асимметрии. Что касается состояния основных звеньев иммунной системы, то обнаруженные у больных изменения соответствовали литературным данным в основном, а именно: для всех групп больных характерна активация гуморального звена и подавление функции фагоцитов [10]. Важным результатом работы явилось установление того факта, что больные с контралатеральной доминантностью полушарий головного мозга имели противоположные нарушения в основных Т-клеточных субпопуляциях.

Таким образом, характер взаимосвязанных изменений психологических, вегетативных и иммунологических параметров у женщин, больных бронхиальной астмой, свидетельствует о взаимодействии между нервной и иммунной системами при данной патологии, а также о разнородности заболевания, обусловленной функциональной межполушарной асимметрией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Т.Я. Характеристика иммунной системы у здоровых людей с разными показателями высшей нервной деятельности: дис. ... д-ра мед. наук. — Новосибирск, 2004. — 245 с.
2. Баевский Р.М., Берсенева А.П. Оценка адаптационных возможностей организма и риска развития заболеваний. — М., 1997. — 127 с.

3. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы // под ред. А.Г. Чучалина. — М., 2007. — 120 с.

4. Кожевников В.С. Современная методология иммунодиагностики // Актуальные вопросы клинической иммунологии и аллергологии. — Барнаул, 1998. — С. 23 — 30.

5. Леутин В.П., Николаева Е.И. Психофизиологические механизмы адаптации и функциональная асимметрия мозга. Новосибирск: Наука, 1988. — 190 с.

6. Малкина-Пых И.Г. Психосоматика: справ. практ. психолога. — М., 2005. — 141 с.

7. Рябыкина Г.В., Соболев А.В. Вариабельность ритма сердца. — М.: Стар'ко, 1998. — 200 с.

8. Сандомирский М.Е. Психосоматика и телесная психотерапия: практ. рук. — М., 2005. — 76 с.

9. Чернушенко Е.Ф. Иммунология бронхиальной астмы // Украин. пульмон. журн. — 2000. — № 2. — С. 19 — 21.

10. Шапорова Н.А. Стероидрезистентная бронхиальная астма: особенности иммунологического статуса // Мед. иммунология. — 2004. — Т. 6, № 1 — 2. — С. 75 — 82.

11. Ярилин А.А. Иммунология. — М., 2010. — 752 с.

12. Elenkov I.J., Wilder R.L., Chrousos G.P., Vizi E.S. The sympathetic nerve — an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system // Pharmacological Reviews. — 2000. — Vol. 52, N 4. — P. 595 — 638.

13. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its implications for health and disease // Altern. Med. Rev. — 2003. — Vol. 8, N 3. — P. 223 — 246.

14. Task Force European Society of cardiology and the North American Society of pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use // Circulation. — 1996. — Vol. 93. — P. 1043 — 1065.

15. Wittling W., Block A., Genzel S. Hemisphere asymmetry in parasympathetic control of the heart // Neuropsychol. — 1998. — Vol. 36, N 5. — P. 461 — 468.

Сведения об авторах

Смык Анна Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел. (383) 222-06-72; e-mail: anna-v-smuk@mail.ru)

Соловьева Ирина Геннадьевна — старший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Непомнящих Вера Макаровна — заведующая отделением аллергологии Клиники иммунопатологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Труфакин Сергей Валерьевич — заведующий отделением лучевой диагностики Клиники иммунопатологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук

Кожевников Владимир Сергеевич — заведующий лабораторией клинической иммунопатологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Абрамова Татьяна Яковлевна — ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук

С.Ю. Терещенко, Л.В. Лаптева

СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (ПНЖК) В МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ (АД) РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)

В настоящее время существует гипотеза о наличии врожденного нарушения обмена полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), играющего роль в патогенезе atopического дерматита. Постулируется дефицит функции дельта-6-десатуразы, что приводит к недостаточному содержанию в клеточных мембранах производных линолевой кислоты (гамма-линоленовой (ГЛК), дигомолиноленовой и арахидоновой кислот). Кроме того, высказывается мнение о дефиците ω 3-ПНЖК при atopических болезнях.

Изучен состав жирных кислот эритроцитов у детей с АД. Получено снижение 14:0, 16:1 ω 7, 18:1 ω 9 и 18:3 ω 6 (ГЛК) кислот в мембранах эритроцитов у детей. Выявлена связь уровня ГЛК с тяжестью АД. Полное отсутствие ГЛК в мембранах выявлено у 83 % детей с тяжелым АД, у 60 % с легким АД и у 41 % здоровых детей, $p_{1-3} = 0,033$

Предположено, что снижение ГЛК в клеточных мембранах может быть целью терапевтического вмешательства у детей с АД. В то же время, наше исследование не нашло никаких свидетельств дефицита ω 3-ПНЖК у детей с АД.

Ключевые слова: дети, atopия, жирные кислоты, эритроциты

THE CONTENT OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (PUFAS) IN MEMBRANES OF ERYTHROCYTES IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS (AD) OF VARYING SEVERITY

S.Yu. Tereshchenko, L.V. Lapteva

State Medical Scientific Institute for Northern Problems of Siberian Division of Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russia

Currently, there is a hypothesis about the presence of congenital metabolic disorders of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which plays a role in the pathogenesis of atopic dermatitis. It is postulated deficit of delta-function 6-desaturase, which leads to a lack of content in the cell membranes of derivatives of linoleic acid (gamma-linolenic acid (GLA) and arachidonic acid digomolinolenovoy). In addition, it is suggested a deficit of ω 3-PUFA in atopic diseases.

The composition of fatty acids of red blood cells in children with AD. Obtained by reduction of 14:0, 16:1 ω 7, 18:1 ω 9 and 18:3 ω 6 (GLA) acids in erythrocyte membranes in children. The relationship between the level of GLA to the severity of AD. The complete absence of HCA in the membranes was detected in 83 % of children with severe AD, 60 % with mild AD and 41 % of healthy children, $p_{1-3} = 0,033$

It is suggested that the decrease in GLA in cell membranes may be the target of therapeutic intervention in children with AD. At the same time, our study found no evidence of ω 3-PUFA deficiency in children with AD.

Key words: children, atop, fatty acids, erythrocytes

Установлено, что пищевой дефицит ПНЖК у человека (грудных детей с несбалансированным вскармливанием и взрослых с мальабсорбцией жиров) приводит к формированию изменений кожи, идентичных ранее описанным для животных (крыс и морских свинок) — формирование сухости, чешуйчатости, покраснению и экзематизации кожи [3, 4].

Поскольку поражение кожи при дефиците ПНЖК очень напоминают таковые при atopическом дерматите (АД), мультифакториальный патогенез этого заболевания вполне может включать дефект обмена жирных кислот. Эта гипотеза нашла свое подтверждение в многочисленных исследованиях (особенно после внедрения метода газо-жидкостной хроматографии), подтвердивших, что при АД в плазме крови и клеточных мембранах снижены концентрации метаболитов линолевой кислоты ω 6-ряда: гамма-линоленовой

(18:3 ω 6) кислоты (ГЛК), дигомо-линоленовой, арахидоновой, докозопентаеновой кислот, при этом, концентрация самой линолевой кислоты была несколько повышена. [9]. Такие изменения позволили предположить, что при АД имеется снижение активности дельта-6-десатуразы — фермента превращающего линолеовую кислоту в вышеперечисленные ω 6-ПНЖК, в том числе в ГЛК. Исследования спектра ПНЖК в пуповинной крови позволили высказать гипотезу о первичном наследуемом характере снижения активности дельта-6-десатуразы [11].

Попытки использования ПНЖК в лечении АД известны с 30 — 40 годов прошлого века. Более поздние исследования, проводившиеся в основном с начала 80-х годов, связаны с использованием масла примулы, содержащего 72 % линолевой кислоты и 9 % ГЛК [11].

Некоторыми исследователями предполагается вероятность положительного эффекта от использования ω 3-ПНЖК при различных atopических заболеваниях. [15]. Идея заключается в использовании замещения арахидоновой кислоты в мембране жирными кислотами ряда ω 3, блокирования ими метаболизма арахидоновой кислоты, синтеза из ω 3-ПНЖК противовоспалительных факторов и их собственных иммуномодулирующих свойств [12]. Интересно в этой связи мнение P.N. Black и S. Sharpe, которые прямо связывают рост заболеваемости бронхиальной астмой с повышенным потреблением в развитых странах ω 6-ПНЖК (растительных масел, маргарина) и приводят данные о распространенности астмы в определенных регионах и социальных классах, имеющих соответствующие пищевые предпочтения [2]. S. Farchi с соавт. также связывают рост распространенности респираторной аллергии (бронхиальной астмы и ринита) у детей с повышенным потреблением ω 6-ПНЖК [5]. Напротив, употребление повышенного количества рыбных продуктов, богатых ω 3-ПНЖК, снижает риск возникновения астмы у детей. Как показал анкетный анализ употребления более чем 200 пищевых ингредиентов у 574 респондентов, ни один вид пищевых продуктов, кроме рыбных, не выявил ни протективного, ни провоцирующего эффекта на развитие БА у детей [10]. Результаты недавнего крупного эпидемиологического исследования ISAAC показали положительную корреляцию между пищевым потреблением растительных ПНЖК и распространенностью астмы, ринита и АД у детей [4, 7, 8]. Одновременно, была показана отрицательная корреляция распространенности этих atopических болезней у детей с употреблением рыбных продуктов. У взрослых лиц была показана прямая ассоциация между большим пищевым употреблением растительных ω 6-ПНЖК (маргарина), мононенасыщенных жирных кислот (олеиновой) и частотой встречаемости atopии и поллиноза, но не АД [14].

Цель исследования: изучить спектр жирных кислот в мембранах эритроцитов у детей с atopическим дерматитом различной степенью тяжести.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано абсолютное (мг/л) содержание жирных кислот в мембранах эритроцитов у 22 детей с АД и у 22 детей без каких-либо atopических заболеваний на момент обследования и в анамнезе, включая АД грудного ребенка. Тяжесть клинических проявлений АД оценивали с использованием SCORAD-индекса [13]. Контрольная группа формировалась с использованием дизайна с подбором пар (paired design) по полу и возрасту.

Исследование проводилось в день забора крови, одновременно для проб основной и контрольной групп. Взятую натощак венозную кровь центрифугированием разделяли на плазму и эритроцитарную массу. Определяли содержание

жирных кислот в эритроцитарной массе в мг/л. Экстракцию липидов проводили согласно общепринятому методу Фолча. Анализ метиловых эфиров ЖК проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором (GCD Plus, «Hewlett-Packard», США) Условия анализа подробно изложены в работе M.A. Gladyshev et al [6].

Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде медианы и интерквартильного интервала Me(LQ-UQ), где Me — медиана, LQ — 25% процентиль, UQ — 75% процентиль, качественных — в виде процентной доли и ее 95% доверительного интервала. Статистическую значимость различий при сравнении количественных данных анализировали с помощью критерия Манна — Уитни (U), качественных данных — двустороннего точного критерия Фишера. Для оценки силы связи между признаками использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о содержании жирных кислот в мембранах эритроцитов у обследованных нами детей представлены в таблице 1. В таблице 2 представлено содержание некоторых жирных кислот в эритроцитах в зависимости от тяжести АД (медиана SCORAD-индекса в нашей выборке составила 21 балл).

В мембранах эритроцитов у детей с АД выявлено снижение миристиновой (14:0), пальмитолеиновой (16:1 ω 7), олеиновой (18:1 ω 9), докозатетраеновой (22:4 ω 6) и γ -линоленовой (18:3 ω 6) кислот. Однако только для ГЛК в мембранах эритроцитов нами выявлена связь с тяжестью АД в виде прогрессирующего снижения. Так, полное отсутствие ГЛК в плазматических мембранах выявлено у 83 % детей с тяжелым АД (SCORAD-index > 21), у 60 % с легким АД (SCORAD-index < 21) и только у 41 % здоровых детей. Только в подгруппе детей с тяжелым АД в мембранах эритроцитов найдено снижение содержания докозатетраеновой (22:4 ω 6) кислоты и отношения арахидоновая/эйкозопентаеновая (20:4 ω 6/20:5 ω 3) кислот. Тенденция к снижению отношения 20:4 ω 6/20:5 ω 3 кислот была ранее показана нами для детей с АД, в отличие от детей с бронхиальной астмой и поллинозом, у которых это отношение достоверно повышалось [1]. Кроме того, в этом же исследовании мы показали достоверное снижение ГЛК у здоровых детей, имевших АД в грудном возрасте, в отличие от детей, не имевших кожных аллергических проявлений в анамнезе. Подобный характер изменений ГЛК высоковероятно свидетельствует о первичном, наследуемом характере обмена ω 6-ПНЖК у детей с АД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы предполагаем, что связанное с тяжестью болезни снижение ГЛК в клеточных мембранах может быть целью терапевтического вмешательства

Таблица 1

Содержание жирных кислот в мембранах эритроцитов у детей основной и контрольной групп (мг/л)

Наименование кислоты	Мембраны эритроцитов		
	Контроль (n = 21)	Дети с АД (n = 22)	p
Нонановая (9:0)	0 (0–17)	0,08 (0–0,23)	
Каприновая (10:0)	0 (0–0,33)	0,16 (0,03–0,29)	
Лауриновая (12:0)	0,79 (0,42–1,22)	0,54 (0,29–0,86)	
Изомиристиновая (i14:0)	0 (0–0)	0 (0–0)	
Миристиновая (14:0)	5,69 (4,99–7,57)	4,19 (2,54–6,13)	0,043
Миристолеиновая (14:1)	0 (0–0,19)	0 (0–0)	
Изопентадекановая (i15:0)			
Антеизопентадекановая (ai15:0)			
Пентадекановая (15:0)	2,85 (1,97–3,94)	1,97 (1,27–3,59)	
Пентадеценная (15:1)			
Изопальмитиновая (i16:0)	0 (0–0,26)	0 (0–0)	
Пальмитиновая (16:0)	246,57 (197,88–314,44)	227,12 (165,11–259,72)	
Пальмитолеиновая (16:1ω7)	7,39 (4,22–9,42)	4,7 (3,15–6,54)	0,049
Изогептадекановая (i17:0)	0 (0–0,62)	0 (0–0,97)	
Антеизогептадекановая (ai17:0)	0 (0–0,49)	0 (0–0,56)	
Маргариновая (17:0)	4,19 (3,67–5,56)	4,17 (3,31–5,49)	
Гептадеценная (17:1)			
Стеариновая (18:0)	165,07 (112,19–194,41)	170,66 (120,76–200,66)	
Олеиновая (18:1ω9)	108,11 (93,97–121,08)	88,99 (76,37–101,2)	0,002
Линолевая (18:2ω6)	131,03 (113,79–191,62)	121,97 (80,79–150,25)	
γ-Линоленовая (18:3ω6)	4,64 (0–12,96)	0 (0–7,92)	
α-Линоленовая (18:3ω3)			
Эйкозановая (20:0)	7,95 (5,98–10,35)	7,76 (5,95–9,44)	
Нонановая (9:0)	0(0–17)	0,08 (0–0,23)	
Эйкозеновая (20:1ω9)			
Эйкозациеновая (20:2ω6)	4,16 (3,17–5,03)	3,68 (3,07–4,84)	
Дигомолиноленовая (20:3ω6)	13,56 (11,01–15,46)	12,47 (9,87–14,53)	
Арахидоновая (20:4ω6)	107,83 (85,57–121,56)	94,26 (58,67–126,36)	
Эйкозапентаеновая (20:5ω3)	4,66 (2,96–5,67)	3,25 (2,47–5,79)	
Бегеновая (22:0)	33,41 (25,81–44,66)	33,22 (26,64–43,3)	
Докозатетраеновая (22:4ω3)	3,68 (2,98–5,85)	3,96 (1,78–5,03)	
Докозатетраеновая (22:4ω6)	33,58 (25,09–36,35)	30,15 (21,32–39,48)	
Докозапентаеновая (22:5ω3)	14,31 (11,58–18,78)	12,99 (9,68–16,55)	
Докозагексаеновая (22:6ω3)	39,67 (27,41–51,18)	34,93 (22,4–42,11)	
Лигноцериновая (24:0)	70,81 (48,61–111,82)	67,29 (50,49–78,73)	
Нервоновая (24:1)	49,23 (37,92–62,44)	53,05 (39,92–61,89)	

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между основной и контрольной группами.

ства у детей с АД. В то же время, наше исследование не нашло никаких свидетельств недостаточного содержания ω3-ПНЖК в эритроцитарных мембранах у детей с АД. Вероятно, дефицит ω3-ПНЖК либо избыток ω6-ПНЖК играет значительно большую роль в формировании респираторных атопических заболеваний (бронхиальной

астмы и аллергического ринита) и меньшую в формировании АД. Кроме того, возможно, что патогенетическое значение при атопических болезнях имеет изменение отношения ω3/ω6 жирных кислот только в определенных клеточных линиях, например лимфоцитах и эффекторных клетках аллергического воспаления.

Таблица 2

Содержание жирных кислот в мембране эритроцитов в зависимости от тяжести клинических проявлений АД (мг/л)

Наименование кислоты	Контроль (n = 22)	Легкий АД, SCORAD-индекс <21 (n = 10)	Тяжелый АД, SCORAD-индекс >21 (n = 12)	p
	1	2	3	
Мембраны эритроцитов				
Миристиновая (14:0)	5,70 (4,98–7,51)	3,53 (2,05–6,68)	4,46 (3,13–7,11)	(1–2) 0,05
Пальмитолеиновая (16:1)	7,39 (4,22–9,42)	4,15 (3,31–5,34)	5,54 (3,02–7,19)	(1–2) 0,04
Олеиновая (18:1ω9)	108,11 (93,97–121,08)	88,99 (71,97–95,08)	90,71 (79,61–108,08)	(1–2) 0,01 (1–3) 0,02
γ-линоленовая (18:3ω6)	4,63 (0–12,96)	0 (0–9,75)	0 (0–0)	(1–3) 0,08
Эйкозеновая (20:1ω9)	не обнаружено			
Докозатетраеновая (22:4ω6)	33,58 (25,09–36,35)	34,87 (30,83–39,88)	24,11 (16,55–34,47)	(2–3) 0,05
Нервоновая (24:1)	49,23 (37,92–62,44)	53,61 (47,29–59,55)	46,97 (34,88–65,72)	
Отношение 20:4ω6/20:5ω3	26,47 (21,64–35,07)	27,03 (21,15–44,91)	19,82 (14,83–26,42)	(2–3) 0,02
% детей с полным отсутствием γ-линоленовой кислоты (18:3ω6)	41 (23–62) %	60 (31–83) %	83 (55–95) %	(1–3) 0,03

Примечание: p – уровень статистической значимости различий между группами сравнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Терещенко С.Ю. Клинико-патогенетическая роль структурной организации плазматических мембран при атопических заболеваниях у детей: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Красноярск, 2002. – 44 с.
2. Black P.N., Sharpe S. Dietary fat and asthma: is there a connection? // Eur. Respir. J. – 1997. – Vol. 10, N 1. – P. 6–12.
3. Duchén K, Björkstén B. Polyunsaturated n-3 fatty acids and the development of atopic disease // Lipids. – 2001. – Vol. 36, N 9. – P. 1033–1042.
4. Ellwood P., Asher M.I., Björkstén B. Diet and asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema symptom prevalence: an ecological analysis of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) data. ISAAC Phase One Study Group // Eur. Respir. J. – 2001. – Vol. 17, N 3. – P. 436–443.
5. Farchi S., Forastiere F., Agabiti N. Dietary factors associated with wheezing and allergic rhinitis in children // Eur. Respir. J. – 2003. – Vol. 22, N 5. – P. 772–780.
6. Gladyshev M., Emelianova A., Kalachova G. Gut content analysis of Gammarus lacustris from Siberian lake using biochemical and biophysical methods // Hydrobiologia. – 2000. – Vol. 431. – P. 155–163.
7. Gool C.J., Thijs C., Henquet C.J., Houwelingen A.C. et al. Gamma-linolenic acid supplementation for prophylaxis of atopic dermatitis – a randomized controlled trial in infants at high familial risk // Am. J. Clin. Nutr. – 2003. – Vol. 77, N 4. – P. 943–951.
8. Gool C.J., Zeegers M.P., Thijs C. Oral essential fatty acid supplementation in atopic dermatitis: a meta-analysis of placebo-controlled trials // Br. J. Dermatol. – 2004. – Vol. 150, N 4. – P. 728–740.
9. Hansen A.E., Haggard M.E., Boelsche A.N. Essential fatty acids in infant nutrition. III. Clinical manifestations of linoleic acid deficiency // J. Nutr. – 1958. – Vol. 66, N 4. – P. 565–576.
10. Hodge L., Salome C.M., Peat J.K. Consumption of oily fish and childhood asthma risk // Med. J. Aust. – 1996. – Vol. 164, N 3. – P. 137–140.
11. Horrobin D.F. Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema // Am. J. Clin. Nutr. – 2000. – Vol. 71, N 1. – P. 367–372.
12. Prescott S.L., Calder P.C. N-3 polyunsaturated fatty acids and allergic disease // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2004. – Vol. 7, N 2. – P. 123–129.
13. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis // Dermatology. – 1993. – Vol. 186, N 1. – P. 23–31.
14. Trak-Fellermeier M.A., Brasche S., Winkler G. Food and fatty acid intake and atopic disease in adults // Eur. Respir. J. – 2004. – Vol. 23, N 4. – P. 575–582.
15. Yen C.H., Dai Y.S., Yang Y.H. Linoleic acid metabolite levels and transepidermal water loss in children with atopic dermatitis // Ann Allergy Asthma Immunol. – 2008. – Vol. 100, N 1. – P. 66–73.

Сведения об авторах

Терещенко Сергей Юрьевич – руководитель клинического отделения соматической патологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел.: 89135371361, тел. (факс): 8-391-228-06-83)

Лаптева Людмила Владимировна – ведущий научный сотрудник лаборатории психического здоровья и социальной адаптации ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН, кандидат медицинских наук (660001, г. Красноярск, ул. Пролетарская, 1-41; тел.: 89130306096, тел. (факс): 8-391-228-06-83; email: prale@list.ru; impn@impn.ru)

О.С. Тютин¹, С.В. Смирнова¹, М.В. Смольникова¹, Н.А. Ильенкова²

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ КОНТРОЛЯ НАД ЗАБОЛЕВАНИЕМ У ДЕТЕЙ

¹ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)

² Государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск)

Формирование определенного фенотипа atopической бронхальной астмы связано с взаимодействием факторов внешней среды и особенностями эндогенной конституции. Проведен анализ особенностей иммунологического статуса, цитокиновой регуляции межклеточных взаимодействий в совокупности с факторами внешней среды. Выявлены предикторы неконтролируемого течения atopической бронхальной астмы у детей.

Ключевые слова: дети, бронхальная астма, цитокиновая регуляция, иммунитет

CLINICAL IMMUNOLOGICAL PECULIARITIES OF ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA DEPENDING FROM THE LEVEL OF CONTROL OVER THE DISEASE IN CHILDREN

O.S. Tyutina¹, S.V. Smirnova¹, M.V. Smolnikova¹, N.A. Ilyenkova²

¹ Research Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk

² Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk

The formation of definite phenotype in atopic bronchial asthma is associated with interaction between environment factors and peculiarities of endogenous constitution. We have carried out the analysis of peculiarities of immunological status, cytokine regulation of cellular interactions collectively with environment factors. We have revealed the predictors of non-controllable course of atopic bronchial asthma in children.

Key words: children, bronchial asthma, cytokine regulation, immunity

Бронхальная астма (БА) является тяжелым хроническим заболеванием дыхательных путей и представляет собой серьезную проблему для здравоохранения во всех странах мира. БА поражает людей всех возрастов, может носить тяжелый характер и подчас приводит к летальному исходу [3]. Для БА любой степени тяжести целью терапии является достижение контроля над болезнью. Термин контроль над заболеванием подразумевает не только исчезновение клинических проявлений, но и уменьшение уровней лабораторных маркеров воспаления и патофизиологических признаков [1, 2]. Факторы, влияющие на уровень контроля над течением atopической бронхальной астмы (АБА) можно условно подразделить на внутренние, прежде всего особенности патогенетических механизмов, происходящих на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях и внешние — контакты с причинно-значимыми аллергенами, объем терапии, стрессы и др. [4]. Выявление предикторов неконтролируемого течения бронхальной астмы крайне важно для своевременного установления должного диспансерного наблюдения над больным, выбора объема терапии, предотвращения осложнений.

Цель исследования: изучить клиничко-анамнестические признаки, особенности показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета, системный цитокиновый профиль у детей с atopической бронхальной астмой в зависимости от уровня контроля над заболеванием. Выявить клиничко-анамнестические, лабораторные предикторы неконтролируемого течения болезни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами изучения являлись дети, с ранее установленным диагнозом: тяжелая/среднетяжелая atopическая бронхальная астма с различным уровнем контроля над заболеванием ($n = 100$). Контрольную группу составили практически здоровые дети ($n = 20$) сопоставимые по полу и возрасту (табл. 1). Диагноз, степень тяжести, уровень контроля над заболеванием устанавливались в соответствии с рекомендациями, изложенными в докладе рабочей группы GINA (Global Initiative for Asthma, updated 2007) [3]. Перед включением больного ребенка в исследование проводилось начальное общеклиническое обследование, включающее оценку выраженности клинических симптомов заболевания за последние 3 месяца. Для комплексного изучения уровня контроля над заболеванием дети вместе с родителями отвечали на вопросы теста по контролю над астмой (АСТ). Результат теста в группе контролируемого течения составил $22,45 \pm 2,6$ балла, в группе неконтролируемого течения заболевания $14,81 \pm 3,05$ балла ($p < 0,001$).

Функциональные методы исследования включали в себя определение показателей функции внешнего дыхания — спирометрия, пикфлоуметрический тест на обратимость бронхальной обструкции. Лабораторное исследование состояло из специфического аллергологического обследования (сбор аллергологического анамнеза, кожные тесты, определение уровня общего и специфического IgE), иммунологических методов исследования (оценка показателей клеточного и гуморального

Таблица 1

Половозрастной состав исследуемых групп

Наименование группы	Кол-во (n)	Пол		Возраст, годы Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)
		мальчики	девочки	
Контролируемое течение АБА (группа 1)	50	38	12	12,5 (6–17)
Неконтролируемое течение АБА (группа 2)	50	34	16	13,1 (6–17)
Контрольная группа (группа 3)	20	11	9	14,8 (10–16)

звеньев иммунитета, концентрации цитокинов в сыворотке крови).

Общими критериями включения детей больных АБА являлись:

1. Возраст 7–18 лет.
2. Ранее установленный диагноз atopическая бронхиальная астма, среднетяжелое/тяжелое течение.

3. Отсутствие ОРВИ, других острых заболеваний на момент исследования.

4. Комбинированная базисная терапия в среднетерапевтических/высоких дозах в течение последних 3 месяцев.

Критерии включения в контрольную группу (практически здоровые дети):

1. Возраст 7–18 лет.
2. Отсутствие аллергических заболеваний (бронхиальная астма, atopический дерматит, аллергический ринит, полиноз, лекарственная и пищевая аллергия) в личном и семейном анамнезе.
3. Отсутствие острых заболеваний на момент исследования.
4. Уровень общего IgE менее 100 МЕ/мл

По результатам клинического обследования сформированы 2 группы – с контролируемым течением АБА ($n = 50$) и с неконтролируемым течением болезни ($n = 50$). Средний возраст детей в выборке составил $12,1 \pm 3,92$ года, группы были сопоставимы по полу и возрасту. Средний стаж болезни в 1-й группе составил $10,9 \pm 1,1$ года, а во 2-й группе составил $11,8 \pm 4,28$ года.

После включения в группу, согласно разработанным критериям, выполнялось исследование показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета, определение системной концентрации цитокинов. Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая утром натощак из локтевой вены. Определение показателей клеточного звена иммунитета проводилось методом флюоресцентной микроскопии с использованием моноклональных антител к поверхностным рецепторам (cluster of differentiation) – CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺. Также обязательно проводился развернутый анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, определением абсолютного числа клеток.

Концентрация цитокинов в сыворотке крови, определение гуморального звена иммунитета (IgA, IgM, IgG, IgE) определялась путем твердофазного иммуноферментного анализа с помощью

тест-систем ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск. Метод твердофазного ИФА основан на принципе «сендвича». Специфическими реагентами являются антитела к интерлейкинам, иммуноглобулинам человека, сорбированные на поверхности лунок полистирольного планшета, конъюгат поликлональных антител к интерлейкинам с биотином.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием прикладных программ «Statistica 8.0», достоверность различий уровней цитокинов в сыворотке крови определялась по непараметрическому критерию Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке бытовых условий выявлено, что 32 % детей в группе неконтролируемого течения АБА проживали в частных домах с печным отоплением, в 34 % случаев отмечено наличие избыточной сырости в доме, присутствие плесени. Эти показатели в группе контролируемого течения болезни были ниже и составили 26 и 28 % соответственно ($p < 0,01$). Пассивному курению подвержены 56 % детей в группе неконтролируемого течения болезни и 48 % детей в случае частично контролируемого течения ($p < 0,05$).

При анализе социального статуса семей выявлено, что 46 % детей 2-й группы живут в неполных семьях (воспитываются матерью, отцом, опекуном), этот показатель в 1 группе составил 26 % ($p < 0,01$).

Проведена оценка наличия коморбидных заболеваний. У всех больных группы с отсутствием контроля над заболеванием отмечалось наличие персистирующего круглогодичного аллергического ринита, в 76 % – atopического дерматита, в 16 % – сезонного риноконъюнктивита, в 4 % – эпизоды крапивницы. В группе контролируемого течения АБА выявлено наличие в 96 % случаев – персистирующего аллергического ринита, в 32 % – сезонного риноконъюнктивита, в 12 % случаев – эпизодов острой крапивницы.

Отягощенный аллергологический анамнез по восходящей линии отмечен у всех детей первой группы обследуемых – в 100 % случаев родственники страдают аллергическими заболеваниями. При этом в 78 % отмечалось заболевание бронхиальной астмой, в 25 % случаев – atopическим дерматитом, в 50 % – аллергическим ринитом, в

36 % — сезонным риноконъюнктивитом, в 20 % отмечались сочетанные проявления аллергии. Во 2 группе больных отягощенный аллергологический анамнез определен в 94 %. Выявлено наличие следующих аллергических заболеваний у родственников: в 46 % — бронхиальная астма, в 16 % — атопический дерматит, в 16 % — сезонный риноконъюнктивит.

Изучение параметров иммунного статуса показало особенности иммунореактивности в зависимости от уровня контроля над заболеванием (табл. 2). В группе с отсутствием контроля над заболеванием по сравнению с контрольной группой выявлено статистически значимое снижение общего количества лимфоцитов, зрелых Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺, снижение показателей иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺). Однако уровень CD8⁺-лимфоцитов оказался достоверно выше.

Анализ гуморального звена иммунной системы показал достоверное снижение уровня IgA в обеих группах больных АБА в сравнении с практически здоровыми детьми. В группе неконтролируемого течения заболевания обнаружено достоверное увеличение концентрации IgG. Концентрация общего IgE статистически значимо выше в группе с отсутствием контроля над заболеванием (табл. 3).

Анализ цитокинового спектра выявил статистически значимое увеличение концентрации Th2- цитокинов (IL-4, IL-10) в группе отсутствия контроля над заболеванием в сравнении с группой контролируемого течения болезни. В обеих группах больных концентрация указанных цитокинов статистически достоверно выше, чем в контрольной группе. В группах детей, больных АБА, показано достоверное увеличение продукции цитокинов Th1-профиля (IL-2, TNFα) (табл. 4).

Таблица 2

Оценка параметров клеточного звена иммунной системы при АБА с различным уровнем контроля над заболеванием

Показатели	Контролируемое течение (n = 30)	Неконтролируемое течение (n = 32)	Здоровые (n = 20)	p
Лимфоциты, %	36,16 ± 11,6	30,4 ± 6,7	35,69 ± 5,186	$p_{1,2} = 0,023$ $p_{1,3} = 0,086$ $p_{2,3} = 0,032$ $p_{\text{межгр}} = 0,09$
CD3 ⁺ , %, Т-лимф	51,28 ± 29,4	59,3 ± 9,3	65,7 ± 8,207	$p_{1,2} = 0,056$ $p_{1,3} = 0,025$ $p_{2,3} = 0,028$ $p_{\text{межгр}} = 0,051$
CD3 ⁺ , кл/мкл	1467 ± 258,02	837,04 ± 3,85	1307 ± 605,3	$p_{1,2} = 0,014$ $p_{1,3} = 0,022$ $p_{2,3} = 0,0014$ $p_{\text{межгр}} = 0,0079$
CD4 ⁺ , %, Тх	20,6 ± 12,6	25,1 ± 0,03	37,3 ± 5,9	$p_{1,2} = 0,007$ $p_{1,3} = 0,0022$ $p_{2,3} = 0,00046$ $p_{\text{межгр}} = 0,003$
CD8 ⁺ , %, Тс	38,4 ± 9,7	36,1 ± 7,6	25,5 ± 4,9	$p_{1,2} = 0,038$ $p_{1,3} = 0,048$ $p_{2,3} = 0,00023$ $p_{\text{межгр}} = 0,006$
ИРИ, Тх/Тс	0,66 ± 0,24	0,75 ± 0,4	1,44 ± 0,34	$p_{1,2} = 0,087$ $p_{1,3} = 0,0006$ $p_{2,3} = 0,0046$ $p_{\text{межгр}} = 0,0001$

Таблица 3

Показатели гуморального звена иммунитета при АБА с различным уровнем контроля над заболеванием

Показатели	Контролируемое течение (n = 30)	Неконтролируемое течение (n = 32)	Здоровые (n = 20)	p
IgA (г/л)	1,39 ± 0,67	1,78 ± 0,99	1,98 ± 1,96	$p_{1,2} = 0,075$ $p_{1,3} = 0,48$ $p_{2,3} = 0,036$ $p_{\text{межгр}} = 0,04$
IgM (г/л)	1,18 ± 0,19	1,12 ± 0,2	1,27 ± 1,03	$p_{1,2} = 0,117$ $p_{1,3} = 0,42$ $p_{2,3} = 0,36$ $p_{\text{межгр}} = 0,12$
IgG (г/л)	14,22 ± 4,046	13,72 ± 5,1	11,57 ± 5,2	$p_{1,2} = 0,113$ $p_{1,3} = 0,06$ $p_{2,3} = 0,11$ $p_{\text{межгр}} = 0,062$
IgE (г/л)	227,95 ± 24,617	359,6 ± 31,2	71,56 ± 13,4	$p_{1,2} = 0,057$ $p_{1,3} < 0,001$ $p_{2,3} < 0,001$ $p_{\text{межгр}} = 0,032$

Таблица 4

Концентрация цитокинов в сыворотке крови при АБА с различным уровнем контроля над заболеванием

Наименование группы	IL-2 (пг/мл) Me (Q ₂₅ –Q ₇₅)	IL-4 (пг/мл) Me (Q ₂₅ –Q ₇₅)	IL-10 (пг/мл) Me (Q ₂₅ –Q ₇₅)	TNF α (пг/мл) Me (Q ₂₅ –Q ₇₅)
Контролируемое течение БА (группа 1) (n = 32)	30,62 (4,4–156,3)	8,09 (0,98–51,0)	38,29 (9,35–186,7)	21,52 (5,29–66,5)
Неконтролируемое течение БА (группа 2) (n = 30)	26,28 (5,7–146,1)	9,23 (0,97–33)	41,16 (8,26–182)	39,40 (4,84–297,4)
Здоровые (n = 20)	5,2 (2,44–7,20)	2,45 (0,84–4,99)	15,89 (6,74–27,83)	6,63 (2,58–11,87)
<i>p</i>	<i>p</i> _{1,2} = 0,818 <i>p</i> _{1,2} < 0,001 <i>p</i> _{2,3} < 0,001	<i>p</i> _{1,2} = 0,005 <i>p</i> _{1,3} = 0,0019 <i>p</i> _{2,3} < 0,001	<i>p</i> _{1,2} = 0,428 <i>p</i> _{1,3} < 0,001 <i>p</i> _{2,3} < 0,001	<i>p</i> _{1,2} = 0,001 <i>p</i> _{1,3} < 0,001 <i>p</i> _{2,3} < 0,001

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клинико-анамнестическими предикторами неконтролируемого течения тяжелого течения бронхиальной астмы могут быть: отягощенный аллергологический анамнез, неблагоприятные бытовые условия, пассивное курение.

Показатели иммунного статуса в группе с неконтролируемым течением АБА характеризуются дефицитом Т-лимфоцитов, снижением уровней клеток с фенотипом CD4⁺, уменьшением показателей CD4⁺/CD8⁺. Изменения значений гуморального звена связаны с дисиммуноглобулинемией за счет недостатка продукции IgA, и гиперпродукции IgG, IgE.

Выявлены изменения в уровнях системной концентрации цитокинов. Характер этих изменений позволяет предположить, что совместная активация как Th1-, так и Th2-лимфоцитов, что подтверждается высокими концентрациями проду-

цируемых цитокинов (TNF α , IL-4), может служить прогностическим признаком неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Лаврова О.В., Федосеев Г.Б. Некоторые молекулярно-генетические аспекты этиопатогенеза атопической бронхиальной астмы // Мед. генетика. — 2008. — Т. 7, № 10. — С. 3–13.
2. Горячкина Л.А., Кашкина К.П. Клиническая аллергология и иммунология. — М.: Миклош, 2009. — 432 с.
3. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (пересмотр 2007 г.) // Под ред. Чучалина А.Г. — М.: Издательский дом «Атмосфера», 2008. — 108 с.
4. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — СПб.: Фолиант, 2008. — 552 с.

Сведения об авторах

Тютин Ольга Сергеевна – аспирант ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН (тел.: 89130498351; e-mail: olya_tyutina@mail.ru)

Смирнова Светлана Витальевна – заместитель директора по научной работе ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (660100, г. Красноярск, ул. Чкалова, д. 41, кв. 117; тел. раб.: 8 391 228 06 81; e-mail: svetvita@mail.ru)

Ильenkova Наталья Анатольевна – заведующий кафедрой детских болезней с курсом ПО ГОУ ВПО КрасГМУ имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава, доктор медицинских наук, профессор (г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. раб.: 8 391 220 04 62; e-mail: ilenkova1@mail.ru)

Смольникова Марина Викторовна – ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, кандидат биологических наук (e-mail: smarinva@ya.ru)

Н.А. Хонина ¹, Н.В. Селедцова ², М.А. Тихонова ¹, Т.В. Овсянникова ², Е.Р. Черных ¹

СОДЕРЖАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ЭНДОМЕТРИАЛЬНОЙ ТКАНИ В ДИНАМИКЕ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА

¹ НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

² Центр новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

В работе исследовано содержание CD4⁺CD25^{+/high} и CD4⁺CD25⁺CD127⁺ регуляторных Т-клеток в периферической, менструальной крови и эндометриальной ткани в разные фазы менструального цикла. Показано, что в фазу средней секреции регистрируется увеличение числа регуляторных Т-клеток, при этом в периферической циркуляции возрастает количество CD4⁺CD25^{+/high} клеток, а в эндометриальной ткани нарастает число CD4⁺CD25⁺CD127⁺ клеток.

Ключевые слова: регуляторные CD4⁺CD25⁺CD127⁺ Т-клетки, репродукция, гормоны, менструальный цикл

CONTENTS OF REGULATORY T-CELLS IN PERIPHERAL BLOOD AND ENDOMETRIAL TISSUE IN DYNAMIC OF MENSTRUAL CYCLE

N.A. Khonina, N.V. Seledtsova, M.A. Tikhonova, T.V. Ovsyannikova, E.R. Chernykh

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

Center of New Medical Technologies of Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAMS, Novosibirsk

The maintenance of CD4⁺CD25^{+/high} and CD4⁺CD25⁺CD127⁺ – regulatory T-cells in a peripheral, menstrual blood and an endometrial tissue in different phases of a menstrual cycle is investigated. It is shown that in a phase of average secretion the number of regulatory T-cells is increased. Thus quantity of CD4⁺CD25^{+/high} increased in peripheral circulation, and in an endometrial tissue number of CD4⁺CD25⁺CD127⁺ cells grew.

Key words: regulatory CD4⁺CD25⁺CD127⁺ T-cells, reproduction, hormone, menstrual cycle

По современным представлениям одним из важных условий наступления и сохранения беременности является индукция иммунологической толерантности к аллоантигенам эмбриона [2, 3]. В этом аспекте особое значение отводится регуляторным Т-клеткам, которые представляют собой гетерогенную популяцию клеток, которые участвуют в поддержании периферической толерантности к собственным антигенам, ингибируют ответ на аллоантигены, а также подавляют воспалительную реакцию [8, 15]. Недавно проведенные исследования показали важную роль Т-рег для физиологического течения беременности, что связано с их способностью контролировать Т-клетки, распознающие аллоантигены плода, и ингибировать активацию НК-клеток [3]. В частности, было показано, что физиологическая беременность сопровождается возрастанием численности Т-рег, а осложненное течение беременности (угроза выкидыша) ассоциировано со снижением их количества в циркуляции и децидуальной ткани [12, 15].

Экспрессия рецептора к IL-2 (CD25) является маркером не только естественных регуляторных Т-клеток, но также активированных Т-лимфоцитов, что затрудняет идентификацию естественных Т-рег. Раннее предположение, что экспрессия транскрипционного фактора FoxP3 характерна только для Т-рег, впоследствии также не подтвердилось. В последние годы появились данные, показывающие, что низкая экспрессия рецептора IL-7 (CD127) с коэкспрессией CD25 характерна только для регуля-

торных Т-клеток, что позволяет дифференцировать их от активированных Т-лимфоцитов [6, 11, 13].

Наряду с супрессорной перестройкой иммунитета на системном уровне, наиболее сложные изменения в перивуляторный период происходят в эндометрии. Так, известно, что рецептивность эндометрия повышается в период «открытия имплантационного окна», который соответствует фазе средней секреции менструального цикла. При этом период имплантационной компетентности достигается за счет сложных взаимодействий молекул клеточной адгезии, цитокинов и иммунокомпетентных клеток в эндометрии [1]. Известно, что продукция репродуктивных гормонов значительно меняется в динамике менструального цикла. Вероятно, содержание Т-рег также находится под контролем репродуктивных гормонов, о чем свидетельствуют данные Arruvito с соавторами, которые выявили значимые изменения в содержании циркулирующих CD4⁺CD25⁺ Т-рег в динамике менструального цикла [4].

Вместе с тем сравнительные исследования содержания CD4⁺CD25⁺CD127⁺ Т-рег в периферической циркуляции и эндометриальной ткани в зависимости от фазы менструального цикла в современной литературе отсутствуют. Целью работы явилось исследование регуляторных Т-клеток в эндометрии, менструальной и периферической крови, что позволит оценить в динамике состояние системного и локального иммунитета у женщин в различные фазы цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 17 женщин в возрасте от 23 до 39 лет ($29,8 \pm 0,8$) с регулярным менструальным циклом. У 9 из 17 женщин были роды в анамнезе, у 3 пациенток — медицинские аборт, у 1 женщины — замершая беременность, у 1 женщины — искусственное прерывание беременности, у 3 женщин беременностей не было. На момент исследования женщины не имели острых воспалительных заболеваний любых локализаций. Все манипуляции осуществляли с информированного согласия пациентов. Факт овуляции оценивался с помощью динамической фолликулометрии.

Иммунологическое обследование проводили дважды — в фолликулярную фазу (2–4-й день) и фазу средней секреции (5–7-й день после овуляции) менструального цикла. Для исследования у женщин забирали венозную кровь, менструальную кровь с помощью стерильного шприца и биоптат эндометриальной ткани, который получали путем аспирации с помощью внутриматочного зонда «Пайпель» (на 5–7-й день после овуляции). Биоптаты помещали в холодный физиологический раствор, затем механически измельчали и фильтровали через стальное сито. Затем выделяли мононуклеарные клетки (МНК) в градиенте плотности фиколла-верографина. Количественное содержание регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^+CD127^-$) оценивали методом проточной цитометрии с использованием коктейля антител (Becton Dickinson, США) с применением программы Cell Quest. В соответствии с инструкцией производителя в число $CD4^+CD25^+CD127^-$ клеток включались как $CD127^{low}CD25^{+}/^{high}$, так и $CD127^{low}CD25^{intermediate}$ субпопуляции. По данным разработчиков метода количественной оценки Т-рег дополнительное исследование экспрессии $CD127$ помимо $CD25$ увеличивает выявляемость $CD25^{intermediate}$ Т-рег. Вследствие этого может быть более чем двукратное увеличение определяемых Т-рег ($CD4^+CD25^+CD127^-$), тогда как при обычном исследовании $CD25^{intermediate}$ Т-клетки из определения элиминируются. Таким образом, выявляемое нами большее относительное количество

$CD4^+CD25^+CD127^-$ по сравнению с $CD4^+CD25^+$ связано с особенностями метода и распределения $CD4^+CD25^+CD127^-$ клеток в отдельном регионе.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы «STATISTICA 6.0». Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе было проведено сравнительное исследование субпопуляций регуляторных Т-клеток в менструальной и периферической крови в фолликулярной фазе менструального цикла в группе женщин (рис. 1). Как видно из рисунка 1а, в менструальной крови по сравнению с периферической кровью регистрировалась тенденция к более низкому относительному содержанию $CD4^+CD25^+$ клеток ($3,0 \pm 0,8$ vs $4,8 \pm 1,2$ %) и $CD4^+CD25^+CD127^-$ -клеток ($7,7 \pm 1,0$ vs $8,2 \pm 1,0$ %). Более значимые различия регистрировались при исследовании количества $CD4^+$ -клеток с высоким уровнем экспрессии $CD25$ -антигена ($CD4^+CD25^{high}$), обладающих наибольшей супрессорной активностью. Так, содержание $CD4^+CD25^{high}$ клеток в менструальной крови было в среднем в 2,5 раза меньше, чем в периферической крови ($0,4 \pm 0,2$ vs $1,0 \pm 0,1$ %, $p < 0,05$). В обзоре литературы отсутствуют какие-либо данные, характеризующие содержание Т-рег в менструальной и периферической крови у женщин в зависимости от фазы менструального цикла. Поэтому полученные нами данные впервые демонстрируют, что в фолликулярной фазе менструального цикла содержание Т-рег преобладает в периферической крови относительно менструальной крови, что в большей степени характерно для $CD4^+CD25^{high}$ популяции Т-рег.

На следующем этапе оценивали распределение Т-рег в периферической циркуляции и эндометриальной ткани в фазе средней секреции менструального цикла в группе женщин. Как следует из рисунка 1б, в эндометрии по сравнению с периферической кровью содержится досто-

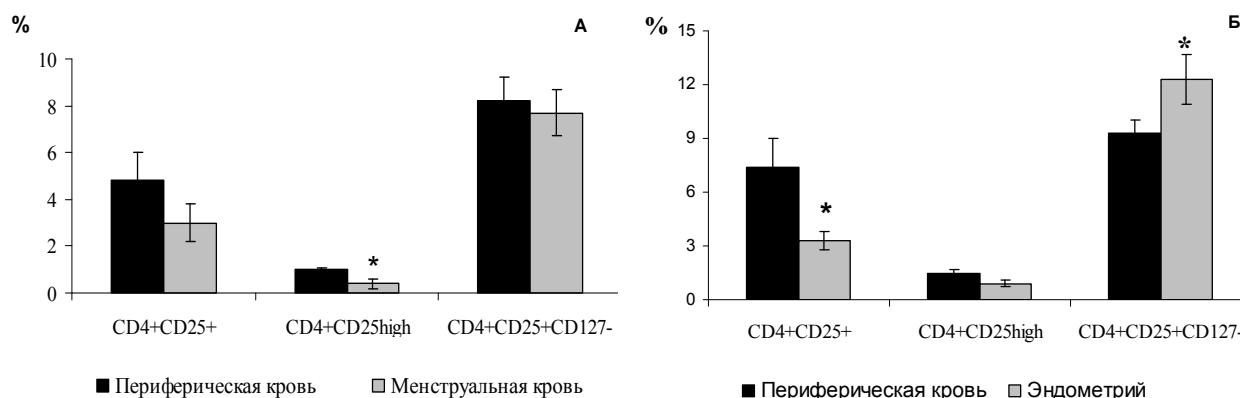


Рис. 1. Сравнительный анализ содержания регуляторных Т-клеток в менструальной, периферической крови и эндометрии в фолликулярную фазу (А) и фазу средней секреции (Б) менструального цикла. * — $P_U < 0,05$ — достоверность различий между содержанием регуляторных Т-клеток в периферической крови и менструальной крови/эндометрии.

верно меньшее количество $CD4^+CD25^+$ Т-клеток ($3,3 \pm 0,5$ vs $7,4 \pm 1,6$ %, $P < 0,01$) на фоне преобладания $CD4^+CD25^+CD127^-$ -клеток ($12,3 \pm 1,4$ vs $9,3 \pm 0,7$ %, $P < 0,05$). Различия в количестве $CD4^+CD25^{high}$ клеток выявлялись в виде тенденции и также свидетельствовали о снижении их содержания в эндометрии ($0,9 \pm 0,2$ vs $1,5 \pm 0,2$ %). Таким образом, в фазе средней секреции менструального цикла, по-видимому, происходит перераспределение регуляторных клеток в сторону преобладания в эндометрии $CD4^+CD25^+CD127^-$ — Т-рег и уменьшения количества клеток, экспрессирующих $CD25^+$ антиген. Сопоставляя полученные результаты с данными литературы, следует отметить, что у женщин генерация $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Т-рег в периферической крови регистрируется в течение поздней фолликулярной фазы менструального цикла, что коррелирует с пиком эстрадиола, и снижается в лютеиновую фазу [4]. Мы, в свою очередь, показали, что в лютеиновую фазу происходит перераспределение Т-рег в сторону преобладания в эндометрии $CD4^+CD25^+CD127^-$ -клеток. Как известно, в лютеиновую фазу возрастает концентрация прогестерона, продуцируемого желтым телом при овуляторном менструальном цикле, что, теоретически, должно способствовать преобладанию Th2 — ответа и генерации регуляторных Т-клеток. Учитывая, что у всех женщин, включенных в исследование, регистрировался по данным фолликулометрии овуляторный цикл, динамика содержания Т-рег может в большей степени зависеть от уровня репродуктивных гормонов, в частности прогестерона. Об этом свидетельствуют данные о способности прогестерона повышать содержание $CD4^+CD25^+$ клеток и продукцию IL-10 [7].

К настоящему времени механизмы индукции толерантности к эмбриону, опосредуемые Т-рег, изучены недостаточно. Ключевым моментом в формировании толерантности может быть индукция экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) дендритными клетками, которая запускается Т-рег. Не менее важным условием для имплантации эмбриона является участие Т-рег в подавлении пролиферации аллоантигенреактивных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, усилении продукции иммуносупрессорных цитокинов — IL-10 и TGF- β , а также экспрессии CTLA-4 [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить важность проведения дальнейших исследований роли Т-рег в репродуктивном процессе не только с целью получения новых теоретических данных, так и в практических целях. Так, недавно было показано, что аллоиммунизация лимфоцитами партнера может способствовать увеличению содержания $CD4^+CD25^{high}$ в периферической крови у женщин со спонтанными абортными неясной этиологии [9]. Кроме того, работы *in vitro* по влиянию иммуноглобулина на генерацию Т-рег показали значительное увеличение экспрессии mPNC TGF- β , IL-10 и FOXP3 [10]. В

одном из исследований была продемонстрирована способность аналога витамина Д (TX527) непосредственно усиливать супрессорные свойства $CD4^+CD25^+CD127^-$ -клеток [5]. Таким образом, дальнейшее исследование гормонально-опосредованной регуляции Т-рег может способствовать не только более полному пониманию иммунных механизмов патогенеза заболеваний репродуктивного тракта, но и в ближайшем будущем может являться предпосылкой эффективной коррекции выявленных изменений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ольховская М.А. Биомаркеры «имплантационного окна» // Проблемы репродукции. — 2007. — № 1. — С. 72 — 77.
2. Хонина Н.А., Тихонова М.А., Дзуцева И.Б., Пасман Н.М. и др. Иммунные дисфункции у женщин с бесплодием неясного генеза и метод их коррекции // Мед. иммунология. — 2010. — Т. 12, № 6. — С. 511 — 520.
3. Aluvihare V. R., Kallikourdis M., Betz A.G. Regulatory T-cells mediate maternal tolerance to the fetus // Nature Immunology. — 2004. — N 5. — P. 266 — 271.
4. Arruvito L., Sanz M., Banham A.H., Fainboim L. Expansion of $CD4^+CD25^+$ and $FOXP3^+$ regulatory T-cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction // J. Immunol. — 2007. — Vol. 178. — P. 2572 — 2578.
5. Baeke F., Korf H., Overbergh L., Verstuyf A. et al. The vitamin D analog, TX527, promotes a human $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ regulatory T cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammation // J. Immunol. — 2011. — Vol. 186, N 1. — P. 132 — 142.
6. Bayer A.L., Lee J.Y., de la Barrera A., Surh C.D. et al. A function for IL-7R for $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells // J. Immunol. — 2008. — Vol. 181, N 1. — P. 225 — 234.
7. Guanping Mao, Junpeng Wang, Youmin Kang, Ping Tai et al. Progesterone Increases Systemic and Local Uterine Proportions of $CD4^+CD25^+$ Treg Cells during Midterm Pregnancy in Mice // Endocrinology. — 2010. — Vol. 151. — P. 5477 — 5488.
8. Gueri L.R., Prins J.R., Robertson S.A. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? // Human Reprod. Update. — 2009. — Vol. 1. — P. 1 — 19.
9. Hui Yang, Lihua Qui, Wen Di, Aiming Zhao et al. Proportional change of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients // Fertil. Steril. — 2009. — Vol. 92. — P. 301 — 305.
10. Kessel A., Ammuri H., Peri R., Pavlotzky E.R. et al. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function // J. Immunol. — 2007. — Vol. 179, N 8. — P. 5571 — 5575.
11. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human $CD4^+$ Treg cells // J. Exp. Med. — 2006. — Vol. 203, N 7. — P. 1701 — 1711.

12. Mei S., Tan J., Chen H., Chen Y. et al. Changes of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients // Fertil. Steril. — 2010. — Vol. 94, N 6. — P. 2244 — 2247.

13. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J. Zunders J. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells // J. Exp. Med. — 2006. — Vol. 203, N 7. — P. 1693 — 1700.

14. Trabanelli S., Ocadlikova D., Evangelisti C., Parisi S. et al. Induction of regulatory T cells by dendritic cells through indoleamine 2,3-dioxygenase: a potent mechanism of acquired peripheral tolerance // Curr. Med. Chem. — 2011. — Vol. 18, N 15. — P. 2234 — 2239.

15. Winger E.E., Reed J.L. Foxp3⁺CD25⁺ low circulating CD4⁺ T-regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure // Am. J. Reprod. Immunol. — 2011. — Vol. 66, N 4. — P. 320 — 328.

Сведения об авторах

Хонина Наталья Алексеевна — ведущий научный сотрудник ФБГУ НИИКИ СО РАМН, доктор медицинских наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, НИИКИ; e-mail: nkhopina@mail.ru)

Селедцова Наталья Владимировна — научный сотрудник ЦНМТ ИХБФМ СО РАН, кандидат медицинских наук

Овсянникова Татьяна Викторовна — руководитель Центра репродуктивного здоровья АНО «ЦНМТ в Академгородке», доктор медицинских наук

Тихонова Марина Александровна — ведущий научный сотрудник ФБГУ НИИКИ СО РАМН, кандидат биологических наук

Черных Елена Рэмовна — заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, заместитель директора НИИКИ СО РАМН, чл.-корр. СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)

Е.Д. Целых, Г.П. Евсеева, В.К. Козлов, М.В. Ефименко, Н.С. Токарева, О.Ю. Горбатова

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПОДРОСТКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОСОБЕННОСТЕЙ ПИТАНИЯ

Хабаровский филиал «ДНЦ ФПД СО РАМН» – НИИ охраны материнства и детства (Хабаровск)
Дальневосточный государственный гуманитарный университет (Хабаровск)

Анализ показателей цитокинового статуса у подростков коренного и пришлого населения Хабаровского края выявил различия в их содержании в зависимости от условий питания, количественного и качественного состава суточного рациона питания. Установлены этнические особенности содержания цитокинов профиля, связанные, в первую очередь, с содержанием интерферонов. Достоверно более высокая концентрация цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4 и TNF- α и INF- α выявлена в сыворотке периферической крови подростков, являющихся воспитанниками интерната, в этнических группах, в сравнении с подростками, проживающими в условиях семьи. Определены корреляционные зависимости между содержанием белков, жиров, углеводов, витамина С в рационах питания и показателями цитокинов.

Ключевые слова: подростки, питание, иммунитет

CHANGE OF INDICATORS CYTOKINE PROFILE IN ADOLESCENTS DEPENDING ON THE CHARACTERISTICS OF FOOD

E.D. Tselykh, G.P. Evseyeva, V.K. Kozlov, M.V. Efimenko, N.C. Tokareva, O.Yu. Gorbatoва

Khabarovsk Branch of FSC PPR SB RAMS – Scientific research institute of Mother and Child Care,
Khabarovsk
Far Eastern State Humanitarian University, Khabarovsk

The analysis of cytokine status indicators in adolescents indigenous and migrant populations Khabarovsk Territory has revealed differences in their content depending on the power of quantitative and qualitative composition of the daily diet. Established ethnic characteristics cytokine profile associated primarily with the content of interferon's. Significantly higher concentration of cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4 and TNF- α and INF- α was detected in peripheral blood serum of adolescents who are inmates of the orphanage, in both ethnic groups, compared with adolescents living in a family environment. Correlations were defined between the content of proteins, fats, carbohydrates, vitamin C in diet and indicators of cytokines.

Key words: adolescents, nutrition, immunity

Основная роль питания состоит в трофическом, пластическом и энергетическом поддержании функциональной активности организма и, в том числе, иммунной системы.

Представляет интерес мнение об эволюционном единстве функций питания и иммунитета, в том числе о нестойком изменении иммунного ответа организма в течение периода времени, сопоставимого со временем существования короткоживущего пула лимфоцитов при однократном воздействии пищевых факторов [3]; стимуляции белками пищи синтеза поликлональных иммуноглобулинов (IgA и IgM) в Пейеровых бляшках при нормальном физиологическом состоянии [13]; выраженное стимулирующее влияние пептидов, в результате расщепления белка в процессе его утилизации, для презентации антигена Т-лимфоцитам [6]. Влияние питания на клетки состоит в изменении свойств плазматической мембраны и активации мембранных ферментов [4, 8], изменении экспрессии генов цитокинов и иммуноглобулинов и регуляции апоптоза [11]. Именно на уровне рецепторов и их сигнальных путей реализуется влияние пищевых веществ на клетки иммунной системы, что в дальнейшем проявляется уже на уровне межклеточных взаимодействий и в целом на развитии иммунного ответа [6]. Снижение энергетической ценности

рациона или содержания основных нутриентов может привести к обеднению массы лимфоидных органов и функциональным нарушениям в иммунной системе [13]. Ингибируется синтез цитокинов Th2 клетками, синтез антител и антигензависимых неспецифических Ig, что обуславливает супрессию общего и локального иммунного ответа на бактериальные антигены. При снижении уровня белка на 3 % в рационе мышей, инфицирование организма нематодами сопровождается низким ответом эозинофилов, снижением пролиферации лимфоцитов слизистой желудка в ответ на антигены, снижением синтеза IL-4 и INF- γ ; снижается синтез IL-2, ослабляются кооперативные взаимодействия между лимфоцитами, замедляется пролиферация клеток, уменьшается общее число Т-лимфоцитов и процент Т-хелперов [10].

В жировой ткани (ЖТ) экспрессируются некоторые цитокины (TNF- α), концентрация которых положительно коррелирует с массой ЖТ и инсулинорезистентностью [14]. Эффекты IL-6, по принципу обратной связи, связаны с тормозящим влиянием на адипогенез, оказывая воздействие на метаболические процессы в печени, подавляя в ней чувствительность рецепторов инсулина, влияя на углеводный и жировой обмен [7, 11, 12]. В то же время, при понижении потребления пищи, масса

жировых клеток снижается, а в адипоцитах экспрессируются рецепторы ряда цитокинов (TNF- α , IL-6) [8].

Все основные компоненты пищи, а именно, белки, жиры, углеводы, микроэлементы, витамины, в той или иной степени проявляют иммуномодулирующую активность, оказывая влияние на все звенья иммунного ответа. На каждое звено иммунного ответа одновременно воздействуют несколько пищевых факторов, что позволяет говорить не о влиянии отдельных компонентов, а об иммуномодулирующем действии питания [1, 3].

Резкое ограничение уровня белка в рационе повышает чувствительность к инфекции. Ингибируется синтез цитокинов Th2 клетками, синтез антител и антиген-зависимых неспецифических Ig, что обуславливает супрессию общего и локального иммунного ответа на бактериальные антигены. При снижении уровня белка в рационе мышей до 3 %, инфицирование организма нематодами сопровождается низким ответом эозинофилов, снижением пролиферации лимфоцитов, снижением синтеза IL-4 и IFN- γ [9].

В предыдущих наших исследованиях установлено, что у детей коренного населения имеет место дефицит содержания белков [2, 5]. Вследствие этого актуальным было исследование влияния дефицита нутриентов на содержание цитокинов, являющихся белковыми молекулами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В зимний период времени проведено комплексное обследование практически здоровых подростков, проживающих в Нанайском, Хабаровском районах и г. Хабаровске Хабаровского края. Из них к коренному населению (нанайцы, орочи) отнесен 81 ребенок, к пришлому — 92. В качестве группы сравнения представлены данные группы учащихся г. Хабаровска ($n = 63$). Средний возраст составил $14,36 \pm 0,13$ года.

Анализ суточного рациона подростков ($n = 80$) проводился на основании данных организованного (столовая школы-интерната) и индивидуального типа фактического питания (в условиях семьи). Биохимический анализ микро-, макронутриентного состава суточного рациона (белки, жиры, углеводы, аскорбиновая кислота и калорийность) проведен с помощью биохимических арбитражных методов: белка по методу Къельдаля, жиров по методу Сокслета, углеводов — вычитанием из общей массы сухого остатка найденных в блюде или рационе белка, жира и минеральных веществ, общего количества минеральных веществ (зола) путем умножения массы блюда на соответствующий коэффициент, расчет калорийности (Ванханен В.Д. и др., 1987; Методические указания..., 1986), аскорбиновой кислоты — «йодатным методом» (Исследование качества..., 1993).

Оценка состояния структурно-функциональных показателей проведена с использованием антропометрических методов исследования (соматометрические, соматоскопические), в том

числе, по толщине жировых складок (d_{1-7} , мм) методом калиперометрии. С использованием расчетных методов определены: дефицит массы тела, абсолютное и относительное количество жира, площадь поверхности тела по формуле Изааксона, крепость телосложения по индексу Пинье.

Определено содержание: общего белка в сыворотке крови (СК) и моче (набор реагентов «TOTAL PROTEIN» серии «VITAL DIAGNOSTICS SPb»); креатинина в СК и моче («Эколаб-Креатинин-Яффе-1»); мочевины в СК и моче уреазным/фенол-гипохлоритным колориметрическим методом («URIA-2» серии «VITAL DIAGNOSTICS SPb»); мочевой кислоты в СК («Ольвекс Диагностикум»), в моче — энзиматическим методом («URIC ACID-2» серии «Витал-Европа»); общих липидов в СК («ЭКОлаб-Общие липиды»); общего холестерина в СК ферментативным методом («НОВОХОЛ» серии «БЕКТОР БЕСТ»); триглицеридов в СК энзиматическим методом («Ольвекс Диагностикум»); молочной кислоты в СК энзиматическим методом («Ольвекс Диагностикум»); глюкозы в СК и моче энзиматическим методом («Глюкоза-04/14/34-VITAL» серии «VITAL DIAGNOSTICS SPb»).

Содержание цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , INF- α , IFN- γ в СК определено иммуноферментным анализом на автоматическом фотометре для микропланшетов, с использованием коммерческих наборов реагентов ProCon («Протеиновый контур», 2006).

Статистическая обработка данных проведена с использованием электронных таблиц Excel 97 и программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексное исследование фактического суточного рациона подростков, проживающих в условиях организованного и индивидуального питания, выявило, что содержание макро-, микронутриентов (белки, жиры, углеводы, аскорбиновая кислота) суточных рационов фактического питания подростков достоверно отличается от нормативных показателей.

Дефицит белков в суточном рационе фактического питания составил от 33,9 до 59,6 % от нижней границы возрастной нормы. Близкое к оптимальному, количество белка определено только в рационе питания подростков, проживающих в школе-интернате. Содержание жиров соответствовало 30,2-49,7 %, от рекомендованного. Выявлен дефицит в содержании углеводов, более выраженный в условиях индивидуального питания, где количество нутриента в 2,2 раза ниже, чем нижняя граница возрастной нормы.

В нашем исследовании средние показатели массы тела подростков 13 — 17 лет, проживающих в условиях в условиях индивидуального и организованного питания, составили $49,1 \pm 0,6$ кг и $52,3 \pm 0,5$ кг соответственно.

Средняя концентрация (Me, 25 — 75Q) цитокинов (пкг/мл) у подростков коренного и пришлого населения Хабаровского края с дефицитными

Таблица 1

Средняя концентрация (Me, 25-75Q) цитокинов (пкг/мл) у подростков коренного и пришлого населения Хабаровского края

Цитокины	Группы обследованных подростков			
	подростки с организованным питанием		подростки с индивидуальным питанием	
	коренные n = 49	пришлые n = 93	коренные n = 32	пришлые n = 62
IL-1 β	512,92 (228,5–801,4) ***	448,63 (312,6–674,2) ***	733,54 (455,3–988,8) ***▲	251,38 (72,2–427,8) ***
IL-2	192,9 (50,9–243,7) ●●●	250,17 (159,2–354,4) ●●●	1617,13 (948,2–2065,3)	1374,1 (622,6–1996,7)
IL-4	71,54 (41,8–101,4) *▲●●●	139,22 (98,3–184,5) ***	678,84 (355,5–934,4) ***▲	217,05 (32,4–401,6) ***
IL-6	151,92 (75,6–236,5) ***●●●	156,02 (64,0–232,3) ***	14,21 (4,9–25,9) ▲▲▲	205,65 (78,7–308,2) **
TNF- α	46,39 (29,4–59,4) ▲▲▲	180,93 (78,6–261,1) ***●●●	98,24 (46,9–155,2) ▲▲▲	2,62 (0,4–4,02)
INF- γ	0 ▲▲▲	24,80 (9,23–44,1) ●●●	0,18 (0,4–0,44) ▲▲▲	5,06 (1,23–7,29) (3,22–
IFN- α	16,42 (14,6–31,0) ●●●	18,09 (5,54–33,6) ●●●	2,15 (0,28–4,43) *	2,66 (1,04–4,22) *

Примечание: достоверность различий с нормативными показателями: при $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***); между подростками коренного и пришлого населения, с соответствующим типом питания: $p \leq 0,05$ (▲); $p \leq 0,01$ (▲▲); $p \leq 0,001$ (▲▲▲); между подростками одной этнической группы, с разным типом питания: $p \leq 0,05$ (●); $p \leq 0,01$ (●●); $p \leq 0,001$ (●●●).

показателями нутриентов в условиях организованного и индивидуального рациона фактического питания представлены в таблице 1.

Исследование содержания цитокинов не выявили различий в содержании IL-1 β в группах с организованным и индивидуальным питанием.

Определялись очень высокие концентрации IL-2B в условиях индивидуального питания, у коренных и пришлых, которые в 8,4 и 5,5 раза соответственно превышали показатели у подростков с организованным питанием ($p < 0,001$).

Данные, полученные при исследовании IL-4, выявили повышенный его уровень у этнических подростков, находящихся на индивидуальном питании, который почти в 10 раз превышал уровень IL-4 у подростков-нанайцев, находящихся на организованном питании ($p < 0,001$) и в 3 раза — показатели у подростков пришлого населения с индивидуальным питанием ($p < 0,001$).

Результаты исследования уровня IL-6 выявили на уровне нормы только у подростков коренного населения с индивидуальным питанием ($p < 0,001$). Во всех других группах обследованных подростков его значения превышали показатели нормы.

Выявлены достоверные различия в содержании TNF- α у подростков коренного и пришлого населения с индивидуальным рационом питания, где этот показатель у подростков-нанайцев достоверно выше ($p < 0,001$), чем у подростков пришлого населения. Можно отметить тенденцию к повышению концентрации TNF- α в группе пришлых подростков. В целом, найдены достоверные отличия

между соответствующими этническими группами с разным типом питания. У подростков коренного населения концентрация TNF- α выше в условиях индивидуального питания, а у пришлых, наоборот, в условиях организованного питания.

Концентрация INF- α определялась в пределах от 0 до 63,24 пкг/мл, и в среднем, не имела достоверных различий между этническими группами и соответствовала нормативным показателям.

У подростков коренного и пришлого населения Хабаровского края концентрация INF- γ была определена в пределах от 0 до 96,04 пкг/мл, соответствовала нормативным показателям и имела достоверные различия между этническими группами: в сыворотке крови у подростков коренной национальности он практически не обнаруживался. В то же время у подростков пришлого населения содержание INF- γ зависело от типа питания: у подростков с организованным питанием его уровень был в 4 раза выше ($p < 0,001$).

Изучение корреляционных взаимосвязей позволило выявить достоверные, средней и сильной зависимости между содержанием цитокинов и показателями нутриентов.

У подростков коренного населения, в условиях индивидуального питания определены достоверные взаимозависимости между белковой недостаточностью и повышенными концентрациями IL-1 β ($r = 0,38$), IL-4 ($r = 0,77$), IL-6 ($r = 0,85$) и TNF- α ($r = 0,81$) и сниженным содержанием INF- α ($r = 0,55$) и INF- γ ($r = 0,55$) в СК. Практически такие же результаты получены для подростков

этой же этнической группы с организованным питанием.

У подростков пришлого населения с белковым дефицитом коррелирует высокая концентрация IL-6 ($r = 0,41$) и TNF- α ($r = 0,51$) в СК.

С недостаточностью жиров в фактическом рационе питания у подростков коренного населения достоверно зависели инверсионные, по отношению к нормативу, высокие концентрации практически всех исследуемых цитокинов: IL-1 β ($r = 0,36$), IL-2 ($r = 0,55$), IL-4 ($r = 0,78$), IL-6 ($r = 0,37$), TNF- α ($r = 0,81$), и сниженные показатели INF- α ($r = 0,55$) и INF- γ . У подростков пришлого населения достоверных взаимосвязей параметров цитокинового профиля и жиров фактического суточного рациона питания не найдено.

Углеводный дефицит также сказывается на содержании цитокинов. У подростков коренных национальностей определены достоверные взаимосвязи дефицита углеводов и повышенной концентрации IL-6 ($r = 0,49$), TNF- α ($r = 0,36$) в СК, у пришлых — с повышенной концентрацией IL-1 β ($r = 0,47$), TNF- α ($r = 0,41$).

В условиях индивидуального фактического питания у подростков пришлого населения определены достоверные (от слабой до сильной) корреляционные связи повышенной концентрации TNF- α в СК с дефицитным состоянием белков ($r = 0,81$), жиров ($r = 0,81$), углеводов ($r = 0,36$) и аскорбиновой кислоты ($r = 0,40$), а у подростков пришлого населения того же типа питания, определены достоверные корреляционные связи TNF- α с дефицитным состоянием белков ($r = 0,51$) и углеводов ($r = 0,41$) суточного рациона.

Получены корреляционные взаимосвязи между высокой концентрацией IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 и TNF- α , сниженной концентрацией интерферонов и инверсионными изменениями константных показателей СК и мочи, соматометрическими и соматоскопическими и показателями сердечно-сосудистой системы, в большей степени сформированные в единую систему у подростков коренного населения, за счет значительного количества корреляционных связей и перевеса значений в сторону сильных связей. Повышенные содержания основных про- и противовоспалительных цитокинов позволяет говорить об активации воспалительных реакций и иммунных процессов у подростков, проживающих в условиях неполной хронической субстратно-энергетической недостаточности (НХСЭН).

Таким образом, у подростков коренного и пришлого населения Хабаровского края, НХСЭН, сопровождающаяся формированием инверсионных биохимических показателей, адекватных белковому, жировому и углеводному обменным процессам, ведет к системному усилению действия цитокинов, формирующих преиммунный и иммунный ответ, усилению синтеза глобулинов острой фазы, увеличению их концентрации в СК.

Интерпретация данных моделей позволяет достоверно определить, например, что чем больше концентрация цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 и

TNF- α) в СК, тем меньше значение средней жировой складки, больше дефицит массы тела, слабее крепость телосложения и меньше абсолютное и относительное содержание жировой ткани и т.д. Модель влияния нутриентов фактического рациона питания многослойна и позволяет решать многие неизвестные вопросы по взаимосвязи с морфофункциональными показателями организма подростков с НХСЭН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов А.Г., Савченко А.А., Смирнова С.В. Принципы иммунометаболического питания при заболеваниях внутренних органов // Питание в профилактике социально-значимых заболеваний: материалы симп. — Красноярск, 2009. — С. 24 — 29.
2. Козлов В.К., Целых Е.Д. Особенности некоторых биохимических показателей при учете фактического питания в оценке состояния здоровья детей-подростков коренного (нанайцы) и пришлого населения Приамурья // Дальневост. мед. журн. — 2009. — № 1. — С. 63 — 64.
3. Мартынова Е.А., Морозов И.А. Питание и иммунитет, роль питания в поддержании функциональной активности иммунной системы и развитии полноценного иммунного ответа // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2001. — Прил. № 14. — Т. XI, № 4. — С. 28 — 38.
4. Медведева И.В., Дороднева Е.Ф., Шоломов И.Ф. Изменения клеточных мембран под воздействием факторов питания. Клинические и популяционные аспекты // Известия Челябин. науч. центра. — Челябинск. — 2001. — Вып. 3 (12). — С. 95 — 100.
5. Целых Е.Д., Козлов В.К., Веремчук Л.В. Интегральный показатель функционального отклика организма у подростков Хабаровского края в условиях неполной хронической субстратно-энергетической недостаточности (недоедание) // Вопр. питания. — 2009. — № 6. — С. 28 — 32.
6. Asero R., Mistrello G., Roncarolo D. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2001. — Vol. 124, N 1 — 3. — P. 67 — 69.
7. Duarte I., Vinderola G., Rits B. Immunomodulatory capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation // Immunobiology. — 2006. — Vol. 211, N 5. — P. 341 — 350.
8. Fruhbeck G., Gomez-Ambrosi J., Muruzabal F. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. — 2001. — Vol. 280, N 6. — P. 827 — 847.
9. Ing R., Su Z., Scott M. Suppressed T helper 2 immunity and prolonged survival of a nematode parasite in protein — malnourished mice // Proc. Nat. Acad. Sci. — 2000. — Vol. 97, N 13. — P. 7078 — 7083.
10. Kew S., Wells S., Yagoob P. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness // J. Nutr. — 1999. — Vol. 129, N 8. — P. 1524 — 1531.

11. Shimoda M., Inoue Y., Azuma N. Local antibody response in Peyer's patches to the orally administered dietary protein antigen // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1999. — Vol. 63, N 12. — P. 2123–2129.

12. Rotter V., Nagaev I., Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, over-expressed in human fat cells from insulin-resistant subjects // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, N 46. — P. 45777–45784.

13. Rui L., Aguirre V., Kim J.K. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 107, N 2. — P. 181–189.

14. Shimoda M., Inoue Y., Azuma N. Local antibody response in Peyer's patches to the orally administered dietary protein antigen // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1999. — Vol. 63, N 12. — P. 2123–2129.

15. Schling P., Schafer T. Human adipose tissue cells keep tight control on the angiotensin II levels in their vicinity // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277, N 50. — P. 443.

Сведения об авторах

Целых Екатерина Дмитриевна – старший научный сотрудник директор Хабаровского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства, доктор биологических наук, профессор кафедры биологии и географии Дальневосточного государственного гуманитарного университета

Евсеева Галина Петровна – ученый секретарь, руководитель группы медицинской экологии Хабаровского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства, доктор медицинских наук (680022, г. Хабаровск, ул. Воронежская, 49, корп. 1; тел.: (4212) 98-05-91, сот. тел.: 8-914-7711301, факс: 73-78-56; e-mail: iomid@yandex.ru; evseewa @ yandex.ru)

Козлов Владимир Кириллович – директор Хабаровского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАМН

Ефименко Марина Викторовна – старший научный сотрудник Хабаровского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства, к.м.н.

Токарева Наталья Сергеевна – очный аспирант

Горбатова Оксана Юрьевна – студентка 4-го курса ДВГГУ

С.Г. Шагарова ¹, С.В. Смирнова ¹, Л.В. Зенкина ²**ОСОБЕННОСТИ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ И МЕТАБОЛИЗМА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПАТОГЕНЕЗА БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**¹ НИИ медицинских Севера СО РАМН (Красноярск)² Сибирский клинический центр ФМБА (Красноярск)

Цель данного исследования — выявить особенности иммунитета и метаболизма лимфоцитов в зависимости от клинко-патогенетического варианта бронхиальной астмы.

Независимо от клинко-патогенетического варианта бронхиальной астмой для больных характерно повышение содержания лейкоцитов и общих иммуноглобулинов классов G, E. В группе больных atopической бронхиальной астмой увеличена концентрация CD4⁺-лимфоцитов, а при астматической триаде повышено содержание HLA-DR⁺-клеток. Активация иммунной системы у больных бронхиальной астмой обеспечивается соответствующей перестройкой метаболизма лимфоцитов — основных эффекторов иммунитета: независимо от клинко-патогенетического варианта, снижена интенсивность реакций цикла трикарбоновых кислот за счет ключевого и вспомогательного ферментов при интенсификации малат-аспартатного шунта, что характеризует повышение уровня энергетических процессов. Кроме того при псевдоатопии в лимфоцитах крови больных цикл трикарбоновых кислот обеднен субстратно — снижено образование α-кетоглутарата из глутамата, а обратный синтез аминокислоты повышен, что характеризует активирование аминокислотного синтеза. Также в лимфоцитах крови больных астматической триадой уменьшена активность антиоксидантного фермента глутатионредуктазы.

Ключевые слова: бронхиальная астма, патогенез, иммунитет, метаболизм лимфоцитов

THE PECULIARITIES OF THE IMMUNOREACTIVITY AND BLOOD LYMPHOCYTES METABOLISM DEPENDING ON THE BRONCHIAL ASTHMA PATHOGENESISS.G. Shagarova ¹, S.V. Smirnova ¹, L.V. Zenkina ²¹ Research institute of medical problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk² Siberian Clinical Center of Federal Medicobiological Agency, Krasnoyarsk

The aim of the study was to found the peculiarities of immunity and lymphocytes metabolism depending on the clinico-pathogenetic variants of bronchial asthma.

It is found increased the leukocyte content and concentration of immunoglobulin classes G, E in both group atopical and. In the group of atopical asthma patients increased the CD4⁺-lymphocytes concentration and in asthmatic triad patients increased HLA-DR⁺-cells content. Activation of the immune system in patients with bronchial asthma is provided by appropriate adjustment of lymphocytes metabolism - the general effectors of immunity. It is reduced the intensity of the reactions of the citric acid cycle through the key and auxiliary enzymes for the intensification of malate-aspartate shunt, which characterizes the increase in energy processes in lymphocyte of patients with atopical and pseudoatopical bronchial asthma. In addition, the citric acid cycle is substrate deficiency-reduced the α-ketoglutarate formation of glutamic acid, and the reverse synthesis of amino acids increased, which characterizes the amino acid synthesis activation in blood lymphocytes of pseudoatopical patients. Also in the blood lymphocytes of asthmatic triad patients reduced activity of antioxidant enzyme glutathione reductase.

Key world: bronchial asthma, pathogenesis, immunity, lymphocyte metabolism

Бронхиальная астма (БА) — весьма распространенное заболевание, до 10 % населения отдельных стран страдают этим заболеванием, среди хронической патологии она является одной из самых частых [10, 13]. Одной из причин низкой эффективности лечения является недостаточная дифференциальная диагностика заболевания, ведь наряду с истинной аллергической формой — atopической БА (АБА), встречаются и псевдоаллергическая форма — астматическая триада (АТ). В основе развития АТ, в отличие от АБА, лежит неиммунный механизм запуска — нарушение метаболизма арахидоновой кислоты вследствие чего запускается каскад аллергических медиаторов. Следовательно, клиническая картина, развившаяся при истинной аллергической и псевдоаллергической реакциях, будет сходной в результате единых механизмов патохимической и патофизиологической стадий аллергии, т.е. будет наблюдаться характерное хроническое воспаление

дыхательных путей [3, 6, 9, 11]. Таким образом, различия особенностей иммунореактивности при различных клинко-патогенетических вариантах БА, прежде всего, состоят в степени участия иммунной системы в патогенезе.

Активный воспалительный процесс при БА, сопровождающийся спектром биологически активных веществ, отражается и на обладающих богатым рецепторным аппаратом лимфоцитах периферической крови. В результате такого воздействия на лимфоциты, изменяется уровень их функциональных возможностей. Вместе с тем, реализация регуляторных воздействий и формирование ответных реакций происходит именно на уровне метаболической системы клеток [8].

Таким образом, наряду с изучением состояния иммунитета, исследование метаболических параметров лимфоцитов крови позволит полнее охарактеризовать особенности иммунопатогенеза АБА и АТ.

В связи с этим, цель работы — выявить особенности иммунитета и метаболизма лимфоцитов в зависимости от клинико-патогенетического варианта БА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены пациенты в возрасте от 18 до 60 лет, страдающие бронхиальной астмой средней степени тяжести в период обострения. Выделены следующие группы: АБА ($n = 27$), АТ ($n = 26$) и группа контроля ($n = 100$). Перед проведением исследования у всех было получено информированное согласие.

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови исследовали методом флуоресцентной микроскопии с использованием моноклональных антител к поверхностным рецепторам CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, HLA-DR. Рассчитывали индекс дифференцировки (соотношение $CD4^+/CD8^+$). Концентрацию общих иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) сыворотки крови определяли методом радиальной иммунодиффузии по G. Mancini (1965) с помощью стандартных антииммуноглобулиновых сывороток, IgE — иммуноферментным методом. Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) в сыворотке крови оценивали турбидиметрическим методом.

Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах проводили биoluminesцентными методами [7]. Определяли активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), НАД- и НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой малатдегидрогеназы (МДГ и НАДНМДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ и НАДФНГДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДНГДГ), НАД- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ) и глутатионредуктазы (ГР). Активность дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток ($1Е = 1$ мкмоль/мин) [1].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0» (StatSoft, USA). Нормальность распределений проверялась методом Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей ($Q1 - Q3$). Статистическую значимость различий независимых групп оценивали с помощью критериев Краскела — Уоллиса (H) и Манна — Уитни (U) с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группах больных АБА и АТ выявлены как общие изменения состояния иммунитета и метаболизма лимфоцитов, так и специфические для каждого клинико-патогенетического варианта заболевания.

Общими изменениями в обеих группах больных АБА и АТ относительно контроля являются

повышение концентрации лейкоцитов, а также со стороны гуморального иммунитета — содержание общих IgG и IgE (табл. 1 и 2). Причем концентрация IgG выше в группе больных АТ по сравнению с атопиками, а уровень IgE у больных АБА значительно превышает показатель группы псевдоаллергии. Также необходимо подчеркнуть, что, несмотря на увеличенное содержание в сыворотке у больных АТ реактина IgE, его медиана не превышает верхней границы референсного диапазона.

Также выявлены специфические особенности иммунореактивности у больных в зависимости от клинико-патогенетического варианта БА. Так у больных атопиков повышено содержание общих лимфоцитов за счет Т-фракции, которое в свою очередь, определяется Т-хелперной субпопуляцией и снижена концентрация общего IgM (табл. 1 и 2). Снижение количества иммуноглобулинов этого типа, по-видимому, является компенсаторным в условиях превалирования переключения В-лимфоцитов на синтез реактинов. В группе больных АТ характерной особенностью является только повышение абсолютной концентрации HLA-DR⁺-клеток (табл. 1).

Следовательно, для больных БА, независимо от клинико-патогенетического варианта, характерна общая активация иммунитета и повышенный синтез иммуноглобулинов. Очевидно, что у больных АБА увеличена концентрация реактинов IgE и IgG (за счет подкласса IgG₄), обеспечивающих атопический тип гиперчувствительности [4, 12]. Повышение концентрации CD4⁺-лимфоцитов, вероятно, за счет Т-хелперов 2-го типа, обеспечивает превалирование Th2-иммунного ответа, характерного для атопического механизма [2, 15]. В группе больных АТ повышение концентрации общих иммуноглобулинов, с одной стороны, может объясняться смешанными механизмами: наряду с нарушением метаболизма арахидоновой кислоты, возможна и выработка аллерген-специфических антител [9]. А с другой стороны высокий уровень IgG, возможно, отражает сопутствующую или присоединившуюся инфекцию на фоне воспаления бронхов. Для группы АТ также характерно повышение числа поздне-активированных Т-лимфоцитов, подтверждающих активирование иммунитета.

Активация клеток иммунной системы, в том числе и при воспалении у больных БА, обеспечивается их метаболизмом, характеристика изменений которого проведена с помощью оценки активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Обнаружены общие особенности метаболизма лимфоцитов крови относительно контроля в независимости от клинико-патогенетического варианта БА: снижение активности МДГ, НАДФИЦДГ при повышении — НАДНМДГ (табл. 3). Кроме этого найдены характерные особенности метаболизма лимфоцитов крови больных АТ: уменьшение активности НАДГДГ, ГР и увеличение уровня НАДНГДГ (табл. 3).

Следовательно, в лимфоцитах больных БА обеих групп, независимо от клинико-патогенетического варианта, снижена интенсивность реакций цик-

ла трикарбоновых кислот за счет ключевого и вспомогательного ферментов. Причем, по-видимому, более подавлен конечный этап цикла (МДГ), так

как лимитирующий фермент (НАДИЦДГ) всего процесса не меняет активность, хотя некоторая заторможенность начального этапа отражается сни-

Таблица 1

Показатели клеточного иммунитета больных АБА и АТ (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль (n = 100)		Больные БА			
			АБА (n = 27)		АТ (n = 26)	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	5,50	4,80–6,90	6,50	5,030–8,30	6,72	5,15–9,25
			$p_1 = 0,014$		$p_1 = 0,020$	
Лимфоциты (%)	37,0	31,0–41,0	41,0	38,0–47,0	38,0	27,05–43,0
			$p_1 = 0,0041$			
Лимфоциты (10 ⁹ /л)	2,09	1,70–2,64	2,67	2,25–3,33	2,72	1,71–3,38
			$p_1 = 0,001$			
CD3 ⁺ (%)	67,0	59,0–72,0	67,0	61,0–71,0	63,0	54,5–72,5
CD3 ⁺ (10 ⁹ /л)	1,43	1,11–1,65	1,65	1,47–2,26	1,53	1,05–2,04
			$p_1 = 0,004$			
CD4 ⁺ (%)	38,0	34,0–40,0	39,0	32,0–44,0	32,0	30,0–41,5
CD4 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,82	0,61–1,00	0,98	0,80–1,27	0,75	0,61–1,23
			$p_1 = 0,009$			
CD8 ⁺ (%)	30,0	21,0–33,0	26,0	24,0–31,0	23,0	21,0–30,0
CD8 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,60	0,42–0,78	0,68	0,56–0,94	0,47	0,36–0,82
CD16 ⁺ (%)	16,5	12,0–22,0	17,0	14,0–22,0	20,0	13,0–27,0
CD16 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,38	0,26–0,51	0,43	0,27–0,77	0,43	0,32–0,78
CD19 ⁺ (%)	12,0	9,0–15,0	10,0	8,0–13,0	11,0	8,0–15,0
CD19 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,25	0,18–0,34	0,30	0,20–0,36	0,28	0,17–0,38
HLA-DR ⁺ (%)	18,0	14,0–21,0	18,0	15,0–21,0	20,0	16,0–31,0
HLA-DR ⁺ (10 ⁹ /л)	0,37	0,28–0,46	0,46	0,34–0,68	0,52	0,42–0,67
					$p_1 = 0,006$	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,33	1,15–1,67	11,44	1,13–1,85	1,48	1,28–1,75

Примечание: здесь и далее: p_1 – различия с контрольной группой; p_2 – различия между группами больных АБА и АТ.

Таблица 2

Показатели гуморального иммунитета больных АБА и АТ (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль (n = 100)		Больные БА			
			АБА (n = 27)		АТ (n = 26)	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Ig A, г/л	1,46	1,04–2,36	1,42	0,61–3,57	1,21	0,83–2,83
Ig M, г/л	1,46	0,99–1,58	0,90	0,64–1,33	0,99	0,79–1,40
			$p_1 = 0,003$			
Ig G, г/л	5,79	4,94–8,60	11,64	8,67–13,00	19,34	12,19–25,63
			$p_1 = 0,002$		$p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,017$	
IgE, ME	17,41	5,76–42,37	319,36	170,00–580,00	54,5	33,0–170,0
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,004$	
ЦИК, о.е.	5,0	3,0–6,0	6,0	5,0–9,0	5,0	4,0–12,0

Таблица 3

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови больных АБА и АТ (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль (n = 100)		Больные БА			
			АБА (n = 27)		АТ (n = 26)	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Г6ФДГ	3,84	0,47–16,00	12,26	2,30–25,22	3,40	0,85–17,19
Г3ФДГ	0,32	0,01–2,71	0,01	0,01–4,57	0,01	0,01–0,19
ЛДГ	29,50	2,36–122,40	16,26	5,80–51,99	8,38	2,89–39,00
МДГ	25,00	8,46–65,90	0,01	0,01–13,44	0,01	0,01–1,80
НАДФМДГ	6,15	0,02–41,50	5,09	2,27–11,19	4,55	2,30–13,83
НАДФГДГ	0,05	0,01–2,46	0,01	0,01–0,60	0,01	0,01–0,68
НАДГДГ	1,76	0,01–30,59	2,81	0,01–10,54	0,01	0,01–1,15
НАДИЦДГ	5,36	0,09–44,22	19,78	0,20–57,00	0,01	0,01–17,60
НАДФИЦДГ	18,22	4,40–75,96	1,58	0,06–10,87	1,05	0,19–3,51
НАДНЛДГ	8,25	0,01–47,91	15,46	0,01–146,57	47,22	0,01–186,96
НАДНМДГ	31,98	0,43–102,88	152,13	34,32–399,65	235,92	96,16–379,03
ГР	13,08	3,80–54,22	9,81	0,01–30,49	1,25	0,01–24,31
НАДНГДГ	8,10	0,01–42,83	38,06	0,01–117,18	118,18	25,01–174,47
НАДФНГДГ	50,09	10,53–113,06	48,45	10,48–83,41	44,94	44,60–70,96

жением активности вспомогательного фермента (НАДФИЦДГ). В тоже время в лимфоцитах больных БА более активен малат-аспартатный шунт, активность ключевого фермента (НАДНМДГ) которого повышена, что отражает активный обмен коферментами между компартментами и, следовательно, характеризует повышение интенсивности энергетических процессов [14].

При этом в лимфоцитах больных АТ цикл трикарбоновых кислот еще и обеднен субстратно — снижено образование α -кетоглутарата из глутамата, а обратный синтез аминокислоты повышен, что характеризует активирование аминокислотного и, соответственно, белкового синтеза [1]. Также при псевдоатопии в лимфоцитах крови уменьшение активности антиоксидантного фермента ГР отражает как снижение антиоксидантного потенциала, так и пролиферативной способности клеток [5].

Необходимо отметить, что в группе больных АТ по сравнению с АБА в лимфоцитах активирован малат-аспартатный шунт, отражающий более интенсивный окислительно-восстановительный обмен.

Увеличенное образование энергии необходимо для активного аминокислотного и белкового синтеза биологически активных веществ лимфоцитами при псевдоатопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у больных АБА увеличение концентрация реактивных иммуноглобулинов и CD4⁺-лимфоцитов, обеспечивающих атопический механизм гиперчувствительности, со стороны метаболизма лимфоцитов сопровождается интенсификацией энергетических процессов, однако при подавлении реакций цикла трикарбоновых кислот. При АТ активация иммунной системы, выражающаяся в повышении доли активированных Т-лимфоцитов, увеличении концентрации общих иммуноглобулинов классов G и E, сопровождается также интенсификацией окислительно-восстановительных процессов и аминокислотного обмена при подавлении цикла трикарбоновых кислот и глутатионового звена антиоксидантной защиты в лимфоцитах крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1998. — 704 с.
2. Ильина Н.И. Эпидемия аллергии — в чем причины? // Рос. аллергол. журн. — 2004. — № 1. — С. 37–41.
3. Козлов В.А., Борисов А.Г., Смирнова С.В., Савченко А.А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: рук. для врачей. — Новосибирск: Наука, 2009. — 274 с.
4. Конищева А.Ю., Самойликов П.А., Штерншис Ю.А., Гервазиева В.Б. Определение IgG-антител к тканевым антигенам у больных аллергическими заболеваниями // Аллергология и иммунология. — 2009. — Т. 10, № 1. — С. 17–22.
5. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона // Успехи современной биологии. — 1990. — Т. 110, Вып. 4. — С. 20–23.
6. Пыцкий В.И. Некоторые дискуссионные проблемы аллергологии. II. Взгляд на бронхиальную астму и атопию // Рос. аллергол. журн. — 2006. — № 6. — С. 42–58.
7. Савченко А.А. Биolumинесцентное определение активности НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ лимфоцитов // Лаб. дело. — 1991. — № 11. — С. 22–25.
8. Савченко А.А., Смирнова С.В., Борисов А.Г. Содержание АТФ и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах при иммунодефицит-ассоциированных заболеваниях у пришлых жителей Эвенкии // Бюл. СО РАМН. — 2010. — Т. 30, № 3. — С. 33–38.
9. Смирнова С.В. Аллергия и псевдоаллергия (к вопросам распространенности, этиологии, патогенеза, дифференциальной диагностики и терапии). — Красноярск: Гротеск, 1997. — 220 с.
10. Чучалин А.Г., Медников Б.Л., Белевский А.С. Бронхиальная астма: рук. для врачей России (Формулярная система) // Пульмонология. — 1999. — Прил. 99. — С. 3–32.
11. Buc M., Dzurilla M., Vrlík M., Bucova M. Immunopathogenesis of bronchial asthma // Arch. Immunol. Ther. Exp. — 2009. — Vol. 57, N 5. — P. 331–344.
12. Oxelius V.A. Immunoglobulin constant heavy G subclass chain genes in asthma and allergy // Immunol. Res. — 2008. — Vol. 40, N 2. — P. 179–191.
13. Ronchetti R., Jesenak M., Rennerova Z. Relationship between atopic asthma and the population prevalence rates for asthma or atopy in children: atopic and nonatopic asthma in epidemiology // Allergy Asthma Proc. — 2009. — Vol. 30, N 1. — P. 55–63.
14. Spriet L.L., Howlett R.A., Heigenhauser G.J. An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise // Med. Sci. Sports Exerc. — 2000. — Vol. 32, N 4. — P. 756–763.
15. Vercelli D. Mechanisms of the hygiene hypothesis — molecular and otherwise // Curr. Opin. Immunol. — 2006. — Vol. 18, N 6. — P. 733–737.

Сведения об авторах

Шагарова Светлана Геннадьевна — ученый секретарь, доктор биологических наук 1ФГБУ «НИИМПС» СО РАМН, г. Красноярск (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел.: (391) 2126040; e-mail: shagarovas@bk.ru)

Смирнова Светлана Витальевна — заместитель директора по научной работе ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (660100, г. Красноярск, ул. Чкалова, д. 41, кв. 117; тел. раб.: 8 391 228 06 81; e-mail: svetvita@mail.ru)

Зенкина Лариса Владиславовна — аллерголог-иммунолог ФГБУ Сибирский клинический центр ФМБА, г. Красноярск, кандидат медицинских наук

А.О. Шаравии, С.В. Смирнова

МИКОПЛАЗМОЗ, ХЛАМИДИОЗ И БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА С ПОЗИЦИЙ ЭТНОГЕНЕЗА

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)
Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
(Красноярск)

В статье представлены данные по частоте встречаемости микоплазмоза и хламидиоза среди больных разными патогенетическими формами бронхиальной астмы (БА) городов Красноярск и Кызыла, в зависимости от этнической принадлежности. Обсуждаются вопросы патогенности микоплазм и хламидий в организме в целом. Установлены клинические особенности микоплазмоза и хламидиоза у больных БА: субфебрилитет, навязчивый кашель с гнойной мокротой, одышка и нарушение функции внешнего дыхания (ФВД) смешанного характера.

Ключевые слова: бронхиальная астма, микоплазмоз, хламидиоз, этнические группы

MYCOPLASMOSIS, CHLAMYDIOSIS AND BRONCHIAL ASTHMA FROM ETHNOGENETIC POSITION

A.O. Sharavii, S.V. Smirnova

Research Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk
Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk

Article contains the data on frequency of mycoplasmosis and chlamydiosis of different pathogenic forms of bronchial asthma (BA) in the city of Krasnoyarsk and town of Kyzil in regard to ethnical belonging. The problems of Mycoplasma and Chlamydia pathogenicity as a whole had been discussed. We have determined clinical peculiarities of mycoplasmosis and chlamydiosis in BA: low-grade fever, obtrusive cough with purulent sputum, dyspnea and respiration function (RF) disturbances of mixed character.

Key words: bronchial asthma, mycoplasmosis, chlamydiosis, ethnic groups

Еще древние ученые Гиппократ, Фукидид, Лукреций изучали возбудителей инфекционных болезней [1]. А в современной медицине известны не только тонкости эпидемиологии и микробиологии, но и установлена тесная взаимосвязь между этими науками. Высокая распространенность таких инфекционных заболеваний как микоплазмоз и хламидиоз играют немаловажную роль в развитии бронхиальной астмы (БА). У больных бронхиальной астмой в секретах органов дыхания часто обнаруживаются возбудители рода микоплазм и хламидий [2, 3, 4, 9]. Диагностику микоплазмоза и хламидиоза чаще проводят при лабораторном исследовании клинического материала методами иммуноферментного анализа (ИФА), прямой иммунофлюоресценции (ПИФ), реакции связывания комплемента, а реже — полимеразной цепной реакцией. Для повышения достоверности диагностики необходимо использовать не менее двух методов исследования. В ряде случаев с их помощью можно определить стадию инфекции. У больных БА наличие специфических IgG антител в высоких титрах характерно как для острого хламидиоза, так и для хронического [5, 8]. В связи с мало изученностью БА при инфицировании поставлена цель изучить частоту встречаемости микоплазмоза и хламидиоза среди больных бронхиальной астмой и определить особенности клинического течения БА на их фоне у жителей Восточной Сибири, с учетом этнической принадлежности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 239 человек, в возрасте 17 — 78 лет, $Me = 42,0$ лет, $Q_1 = 27,0$ лет, $Q_3 = 52,0$ лет. В исследование включены больные ($n = 187$), давшие информированное согласие на проведение комплексного исследования, с установленным диагнозом: бронхиальная астма экзогенного, или эндогенного, или смешанного генеза, средней степени тяжести в стадии обострения и практически здоровые люди ($n = 52$). Больных БА составили 68 мужчин, 119 женщин, а группу контроля — 20 мужчин, 32 женщины. Все обследованные разделены на 4 основные группы: больные БА экзогенной, эндогенной, смешанной и практически здоровые люди. Для изучения региональных особенностей частоты встречаемости микоплазмоза и хламидиоза обследованы жители г. Красноярск и г. Кызыла, возраст — $Me = 41,0$ лет, $Q_1 = 24,0$ лет, $Q_3 = 47,5$ года и $Me = 40,0$ лет, $Q_1 = 25,0$ лет, $Q_3 = 45,0$ лет ($p < 0,05$), соответственно. Для изучения этнических особенностей частоты встречаемости микоплазмоза и хламидиоза все обследованные разделены на европеоидов ($n = 159$) и монголоидов ($n = 80$). Использована классификация бронхиальной астмы (МКБ-10), подготовленная ВОЗ в 1992 г. Верификация диагноза проводилась в соответствии с критериями Г.Б. Федосеева и Г.П. Хлопотова (1988).

Проведены анкетный опрос, клинический осмотр. Определены антигены *Mycoplasma*

pneumoniae (*M. pneumoniae*), *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*), *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*), *Chlamydomphila psittaci* (*C. psittaci*), *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) в мазках со слизистой ротоглотки методом ПИФ и антитела к ним из сыворотки крови методом ИФА. Подготовка биологических материалов для исследования проводилась по общепринятым правилам. Принцип ПИФ основан на выявлении светящихся иммунных комплексов с помощью люминесцентного микроскопа. Результат считался положительным, если определялась ярко-зеленая флуоресценция в виде гранул на мембранах эпителиальных клеток. Результат считался отрицательным, если в мазке отсутствовало специфическое свечение при наличии не менее 10 эпителиальных клеток. Принцип ИФА основан на использовании пероксидазы хрена в качестве маркера. Результаты регистрировались спектрофотометром и оценивались только в случае, если среднее значение оптической плотности (ОП) в контрольных образцах: отрицательном $K^- \leq 0,25$ и положительном $K^+ \geq 0,6$. Рассчитывалось критическое значение ОП по формуле:

$$ОП_{\text{крит}} = ОП_{\text{ср}} K^- + 0,25,$$

где $ОП_{\text{ср}} K^-$ — среднее значение ОП отрицательного контрольного образца. Для данного исследования положительным считался результат, если ОП больше $ОП_{\text{крит}} + 0,05$ и титр IgA $\geq 1:10$, IgM $\geq 1:200$ и IgG $\geq 1:10$.

По результатам лабораторного исследования на наличие микоплазм и хламидий с целью изучения клинических особенностей БА на фоне

микоплазмоза и хламидиоза выделены группы больных БА, инфицированных микоплазмами ($n = 92$), хламидиями ($n = 102$), без инфицирования ($n = 47$).

Статистическая обработка полученного материала. Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводился с использованием критерия Шапиро — Уилка. Так как тип распределения отличался от нормального, были использованы непараметрические методы, и меры центральной тенденции представлены в виде медианы Me, меры рассеяния в виде интерквартильного размаха — нижний Q_1 и верхний Q_3 квартили. При проведении сравнения групп по количественному признаку применялся двухвыборочный критерий Колмогорова — Смирнова, а по качественному — Пирсона χ^2 . В данном исследовании принят пороговый уровень значимости $\alpha = 0,05$. Результаты ниже него считались статистически значимыми [5, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установленные нами лабораторные данные по частоте встречаемости микоплазмоза среди больных разными патогенетическими формами БА г. Красноярск и г. Кызыла представлены в таблицах 1 и 2. Показатели таблиц свидетельствуют о высокой частоте встречаемости микоплазмоза среди жителей Восточной Сибири, при этом у больных БА достоверно чаще выявляются, чем у группы контроля.

В зависимости от этнической принадлежности у больных БА выявлена следующая частота встре-

Таблица 1

Частота встречаемости микоплазмоза среди больных БА г. Красноярск

Группы	Методы							
	ПИФ			ИФА				
	n	абс.	%	n	IgA и IgM		IgG	
					абс.	%	абс.	%
БА экзогенная	54	9	16,7	64	3	4,7	9	14,1
БА эндогенная	59	15	25,4	64	10	15,6	18	28,1
БА смешанная	58	11	19,0	70	5	7,1	6	8,6
Контроль	30	1	3,3	60	1	1,7	2	3,3

Таблица 2

Частота встречаемости микоплазмоза среди больных БА г. Кызыла

Группы	Методы							
	ПИФ			ИФА				
	n	абс.	%	n	IgM+IgA		IgG	
					абс.	%	абс.	%
БА экзогенная	32	1	3,1	58	1	1,7	4	6,9
БА эндогенная	33	6	18,2	64	2	3,1	14	21,9
БА смешанная	27	4	14,8	54	2	3,7	8	14,8
Контроль	22	2	9,1	44	2	4,5	4	9,1

чаемости *M. pneumoniae* методами ПИФ и ИФА: европеоидов — 17,4 и 8,5 % IgM, 7,7 % IgG; монголоидов — 19,0 % и 1,7 %, 15,5 %, соответственно. В группах контроля: *M. pneumoniae* не выявлена у европеоидов, тогда как у монголоидов ПИФ — 9,1 %, ИФА — 4,5 % IgG. У больных БА лабораторным методом выявлена следующая частота встречаемости *M. hominis*: европеоидов — ПИФ 20,6 %, ИФА 7,0 % IgA, 21,7 % IgG; монголоидов — 0,0 %, 3,4 %, 20,7 %, соответственно. В группах контроля *M. hominis*: у европеоидов — ПИФ 4,5 %, ИФА 3,3 % IgA, 6,7 % IgG, а у монголоидов — ИФА 9,1 % IgA, 13,6 % IgG.

Частота встречаемости *M. pneumoniae* среди всех обследованных (вне зависимости от этнической принадлежности): ПИФ 16,2 %; ИФА 6,4 % IgM, 10,2 % IgG у больных БА. Частота встречаемости *M. hominis* среди всех обследованных (вне зависимости от этнической принадлежности): ПИФ 19,8 %; ИФА 5,9 % IgA, 21,4 % IgG у больных БА.

При обследовании на инфицированность *C. pneumoniae* и *C. psittaci* больных БА в зависимости от этнической принадлежности выявлена следующая частота встречаемости у: европеоидов — ПИФ 14,5 %, ИФА 3,9 % IgM, 41,9 % IgG; монголоидов — 25,9 %, 10,3 %, 17,2 %, соответственно. В группах контроля *C. pneumoniae* и *C. psittaci* выявлены у европеоидов — ПИФ 6,7 %, ИФА 0,0 % IgM; 23,3 % IgG, а у монголоидов — 27,3 %, 4,5 %, 18,2 %, соответственно. При обследовании на инфицированность *C. trachomatis* больных БА в зависимости от этнической принадлежности выявлена следующая частота встречаемости у: европеоидов — ПИФ 10,8 %, ИФА 3,9 % IgA, 3,1 % IgM, 25,6 % IgG; монголоидов — 19,0 %, 3,4 %, 1,7 %, 19,0 %, соответственно. В группах контроля *C. trachomatis*: у европеоидов — ПИФ 30,0 %, ИФА 0,0 % IgA, 0,0 % IgM, 6,7 % IgG, а у монголоидов — 13,6 %, 0,0 %, 9,1 %, 40,9 %, соответственно.

Частота встречаемости *C. pneumoniae* и *C. psittaci* среди всех обследованных (вне зави-

симости от этнической принадлежности): ПИФ 21,1 %; ИФА 5,9 % IgM, 34,2 % IgG у больных БА, а в группе контроля — 15,4 %; 1,9 %, 21,2 %, соответственно. Частота встречаемости *C. trachomatis* среди всех обследованных (вне зависимости от этнической принадлежности): ПИФ 13,4 %; ИФА 3,7 % IgA, 2,7 % IgM, 24,1 % IgG у больных БА, а в группе контроля — 23,1 %; 0,0 %, 3,8 %, 21,2 %, соответственно.

В результате клинического обследования 109 больным БА поставлен сопутствующий диагноз: хламидиоз, который подтвержден результатами лабораторного исследования на наличие *C. pneumoniae*, *C. psittaci* и *C. trachomatis*. Интересен тот факт, что у всех больных с сопутствующим диагнозом хламидиоз, выявлены положительные результаты на специфические IgG антитела по ИФА (у 64 выявлены IgG к *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, а у 45 — IgG к *C. trachomatis*), которые представлены в таблице 3.

При объективном исследовании установлены следующие клинические особенности бронхиальной астмы на фоне микоплазмоза и хламидиоза: субфебрильная температура тела, которая повышалась до 37,3–37,9 °C (59 % больных), характерен подъем температуры тела к вечеру; кашель (80,8 %) неинтенсивного, но навязчивого характера со скудной слизистой и слизисто-гнойной мокротой; одышка (73,1 %) смешанного характера; характерно сочетание симптомов, таких как субфебрилитет, кашель, одышка. Длительно протекающий бронхообструктивный синдром у больных, инфицированных микоплазмами и хламидиями, сопровождается более стойким нарушением функции внешнего дыхания (ФВД) смешанного характера. Повышение температуры тела ($p = 0,022$), кашель ($p < 0,001$) и одышка смешанного характера ($p < 0,001$) чаще выявлены у больных бронхиальной астмой инфицированных микоплазмами и хламидиями, чем у больных бронхиальной астмой без инфицирования.

Таблица 3

Частота выявляемости хламидий у больных БА

<i>Chlamydia pneumoniae, Chlamydia psittaci</i>				
Методы		n	Выявлено, n	%
ПИФ		123	26	21,1
Клинический осмотр		187	64	34,2
ИФА	IgM	187	11	5,9
	IgG	187	64	34,2
<i>Chlamydia trachomatis</i>				
ПИФ		187	25	13,4
Клинический осмотр		187	45	24,1
ИФА	IgA	187	7	3,7
	IgM	187	5	2,7
	IgG	187	45	24,1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена высокая частота встречаемости микоплазмоза и хламидиоза среди жителей Восточной Сибири, при этом у больных БА эти инфекции чаще выявляются, чем в группе контроля. IgG к *M. hominis* и к *C. trachomatis* одинаково часто выявляются у европеоидов и монголоидов. Диагноз хламидиоза у больных БА, основанный на данных клиники, в 100 % случаев подтвержден результатами определения специфических IgG к *C. pneumoniae*, *C. psittaci* и/или к *C. trachomatis* по ИФА. Установлены следующие этнические особенности: у европеоидов IgM к *M. pneumoniae* выявляются чаще, чем у монголоидов, а у монголоидов IgM к *C. pneumoniae* и к *C. trachomatis*, антигены *C. trachomatis* выявляются чаще, чем у европеоидов. Установлены клинические особенности БА на фоне микоплазмоза и хламидиоза: субфебрильная температура тела, упорный кашель, одышка и нарушение ФВД смешанного характера. Следовательно, больным БА довольно часто должна проводиться целенаправленная этиотропная терапия, направленная на эрадикацию микоплазм и хламидий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузолева Л.С. Сапрозоонозы: вчера, сегодня, завтра // Бюл. СО РАМН. — 2011. — Т. 31, № 4. — С. 64—71.
2. Зайцева О.В., Левшин И.Б., Лаврентьев А.В. Частота встречаемости и особенности течения

бронхиальной астмы у детей, ассоциированной с *Chlamydia pneumoniae* // Педиатрия. — 1999. — № 1. — С. 29—33.

3. Кузьменко Л.Г., Соколов А.А., Капустин И.В. Инфицированность детей с бронхиальной астмой цитомегаловирусом и возбудителями микоплазмоза, пневмоцистоза, хламидиоза // Педиатрия. — 1999. — № 1. — С. 15—20.

4. Овсянников Д.Ю., Кузьменко Л.Г., Назарова Т.И. Бронхиальная астма у детей, ассоциированная с микоплазменной и хламидийной инфекцией // Аллергология и иммунология. — 2004. — Т. 2, № 3. — С. 146—149.

5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: Изд-во Медиа Сфера, 2006. — 312 с.

6. Спичак Т.В., Катосова Л.К. Роль хламидийной инфекции при бронхиальной астме у детей // Педиатрия. — 2009. — Т. 87, № 2. — С. 19—26.

7. Шаравии А.О. Частота встречаемости респираторного хламидиоза и респираторного микоплазмоза среди больных бронхиальной астмой в условиях городов Красноярск и Кызыла: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Красноярск, 2007. — 21 с.

8. Grayston J.T. Epidemiology of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) // Annu. Rev. Med. — 1996. — Vol. 23. — P. 211—212.

9. Webley W.C. Infectious Chlamydia often present in lungs of asthmatic children // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2005. — Vol. 171. — P. 1083—1088.

Сведения об авторах

Шаравии Алевтина Очур-ооловна — старший научный сотрудник ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, кандидат медицинских наук (660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, д. 3г; тел. раб.: + 7 (391) 22-806-81; тел. сот.: 7 923 265 265 3; e-mail:

Смирнова Светлана Витальевна — заместитель директора по научной работе ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (660100, г. Красноярск, ул. Чкалова, д. 41, кв. 117; тел. раб.: 8 391 228 06 81; e-mail: svetvita@mail.ru)

Н.А. Шестакова, В.С. Кожевников

**ВЛИЯНИЕ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ
НА ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА БОЛЬНЫХ РАЗНЫМИ ФОРМАМИ
АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА****НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)
НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)**

В статье приведены результаты терапии активированными аутологичными Т-лимфоцитами больных atopическим дерматитом. Показана безопасность и высокая клиническая эффективность такого подхода в лечении пациентов, как с аллергической, так и с неаллергической формой заболевания. При аллергической форме отмечалась более быстрая положительная динамика, но эффективность терапии в оппозитной группе была выше. Воздействие на клеточное звено иммунной системы при разных формах заболевания также различалось. При аллергической форме наблюдалось повышение числа $CD8^+$ -клеток, при неаллергической — $CD8^+CD25^+$ -клеток и изменения гиперчувствительности замедленного типа.

Ключевые слова: atopический дерматит, регуляторные клетки, Т-клеточная вакцинация, антиэрготипический ответ

**EFFECT OF IMMUNOTHERAPY ACTIVATED T-LYMPHOCYTES ON CELLULAR IMMUNITY
IN DIFFERENT FORMS OF ATOPIC DERMATITIS**

N.A. Shestakova, V.S. Kozhevnikov

**Research Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk
Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk**

The article describes the results of therapy with autologous activated T-lymphocytes in patients with atopic dermatitis. Has been shown high clinical efficacy and safety of this therapy in the treatment of patients with both allergic and nonallergic form of the disease. In the allergic form observed more rapid positive changes, but in the opposite form of the efficiency was higher. Influence on cellular immunity in different forms differed. If the allergic form there was an increase of $CD8^+$ T-cells, in the nonallergic form — increased $CD8^+CD25^+$ T-cells and changes in delayed-type hypersensitivity.

Key words: atopic dermatitis, T-cell vaccination, regulatory cells, anti-ergotypic response

В последние десятилетия во многих странах мира отмечается тенденция к увеличению заболеваемости atopическим дерматитом. Распространенность этой патологии по данным разных авторов составляет 10–20 % населения [4]. Atopический дерматит является многофакторным, генетически детерминированным заболеванием, основу которого составляют иммунологические механизмы, опосредованные IgE- и не IgE-аллергическими реакциями (ЕААС, 2006). В зависимости от общего уровня IgE сыворотки крови различают аллергическую и неаллергическую форму atopического дерматита [12]. Недостаточная эффективность стандартных методов лечения является основанием для поиска новых подходов к терапии данного заболевания.

После получения данных о том, что регуляторные клетки подавляют симптомы аллергических заболеваний за счет снижения активности аллерген-специфических эффекторных клеток, подавления продукции IgE и повышения уровня IgG4 и IgA, а также о снижении активности этих клеток у больных с аллергопатологией [9, 13, 14], возникла идея восстановления функции регуляторных клеток у таких пациентов. Исследователями были охарактеризованы различные группы регуляторных клеток, среди которых выделяли как антиидиотипические, распознающие клоносpezifические детерминанты, так и антиэрготипические клетки,

распознающие маркеры активации (так называемые эрготопы), например, молекулу CD25 [4]. Эти данные позволяют предполагать изменения активности регуляторных клеток в результате индукции антиэрготипического ответа, что даст возможность корректировать дисбаланс с преобладанием Th2-клеток, характерный для atopических заболеваний, и уменьшить клинические проявления аллергии.

Успешная иммунизация, нацеленная на усиление природной антиэрготипической регуляторной сети, была проведена как на экспериментальных моделях [11], так и у человека при заболеваниях, при которых было показано снижение антиэрготипического ответа [5, 7, 15]. Однако ранее применялась иммунизация антиэрготипическими клетками, эрготопами, полноразмерными последовательностями ДНК, кодирующими эти молекулы или антиген-реактивными Т-клетками. Нами для индукции антиэрготипического ответа предложено применение поликлональной Т-клеточной вакцины, т.к. при atopическом дерматите выявить антигенную специфичность клеток, участвующих в патогенезе заболевания, у большинства пациентов не удается.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 29 больных atopическим дерматитом (10 мужчин и 19 женщин) в возрасте от 17 до 49 лет (средний возраст

23 ± 1,3 года), находящихся на лечении в аллергологическом отделении НИИКИ СО РАМН. В зависимости от уровня IgE пациенты были разделены на 2 группы. У больных первой группы уровень IgE находился в пределах нормативных значений, у второй — был повышен. С нормальным уровнем IgE (неаллергическая форма) наблюдалось 6 пациентов (21 %), с повышенным (аллергическая форма) — 23 (79 %). Длительность заболевания колебалась от 7 до 48 лет (средняя длительность заболевания 21 ± 1,3 года). Обследуемые больные характеризовались средней (19 человек — 66 %) и тяжелой степенью тяжести (10 человек — 34 %) заболевания. Значение индекса SCORAD исходно составляло 51 ± 4,2 балла, индекс качества жизни (DLQI) был 9,5 ± 1,5 баллов. Группы были сопоставимы по всем исследуемым параметрам.

Пациентам обеих групп после получения информированного согласия проводилась иммунотерапия активированными аутологичными Т-лимфоцитами. Протокол клинических исследований «Иммунотерапия с использованием аутологичных активированных Т-клеток в лечении больных атопическим дерматитом» утвержден на ученом совете НИИКИ СО РАМН №9 от 29.11.05. Клетки вводили подкожно с кратностью 1 раз в неделю — 4 инъекции, далее 1 раз в месяц, курс терапии состоял из 10 инъекций.

Оценка состояния пациентов в процессе лечения проводилась по клиническим и лабораторным показателям, оценивалось возникновение побочных реакций.

Иммуноцитометрию проводили с помощью проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). Для поверхностного маркирования иммунокомпетентных клеток и определения внутриклеточных цитокинов использовали моноклональные антитела производства Сорбент и МедБиоСпектр, Москва, Россия; BD Biosciences Pharmingen, USA.

Активность эффекторов гиперчувствительности замедленного типа оценивали разработанным в лаборатории иммунопатологии НИИКИ СО РАМН методом [2].

Активированные аутологичные Т-лимфоциты получали из мононуклеаров периферической крови, стимулированных антиCD3 антителами (НПЦ МедБиоСпектр) в присутствии IL-2 (ООО Биотех) согласно разработанному в лаборатории иммунопатологии НИИКИ СО РАМН протоколу [1].

Для статистических исследований использовали пакет программ «Statistica V. 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСЛЕДОВАНИЕ

После 10-дневного культивирования со стимуляторами мы исследовали активированные клетки. В полученной Т-клеточной вакцине, по сравнению с не стимулированными клетками, выявлялось увеличение числа CD8⁺ (с 30,19 ± 1,79 до 60,47 ± 2,72 % ($p < 0,001$)) и снижение CD4⁺-лимфоцитов (с 60,88 ± 1,75 до 34,07 ± 2,56 % ($p < 0,001$)), снижение «дважды отрицательных» Т-клеток (с 5,57 ± 0,93 до

2,35 ± 0,42 % ($p < 0,05$)). Определялось значительное увеличение экспрессии маркеров активации, CD25 и DR, на CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитах, более выраженное в субпопуляции CD8⁺-клеток. Так число CD4⁺CD25⁺-лимфоцитов увеличилось с 17,50 ± 1,48 до 34,67 ± 2,63 % ($p < 0,001$), CD4⁺DR⁺-с 5,69 ± 1,16 до 12,43 ± 2,63 % ($p < 0,001$), CD8⁺CD25⁺-с 2,15 ± 0,27 до 46,49 ± 3,27 % ($p < 0,001$), CD8⁺DR⁺-с 3,59 ± 0,45 до 20,92 ± 3,90 % ($p < 0,001$). Количество CD4⁺-клеток с высокой экспрессией молекулы CD25 снизилось с 2,99 ± 0,45 до 0,76 ± 0,33 % ($p < 0,05$). Таким образом, для индукции антиэрготипического ответа у больных атопическим дерматитом была получена Т-клеточная вакцина, состоящая из активированных CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов с преобладанием последних.

В процессе клеточной терапии возникновение побочных реакций при обеих формах заболевания было отмечено с одинаковой частотой. У 5 пациентов наблюдались местные побочные реакции в виде гиперемии, припухлости, болезненности, образования волдыря, у 11 больных — системные, в виде обострения основного заболевания, кратковременного субфебрилитета или астенического синдрома. Эти реакции быстро купировались назначением антигистаминных препаратов и, при необходимости, топических глюкокортикостероидов.

Сравнение эффективности вакцинации активированными аутологичными Т-клетками при обеих формах заболевания показало, что эффективность терапии у пациентов с неаллергической формой была выше, чем в оппозитной группе. Так у больных с неаллергической формой атопического дерматита в 100 % случаев отмечен положительный эффект от лечения, характеризующийся уменьшением клинических симптомов заболевания более, чем на 50 %. При аллергической форме положительный клинический эффект наблюдался также в большем проценте случаев, более 78 %, однако у 2 пациентов положительная клиническая динамика отсутствовала (табл. 1). При этом достоверное уменьшение симптомов заболевания при неаллергической форме атопического дерматита отмечено только через 6 месяцев терапии. В то время как при аллергической форме уже через месяц от начала введения клеток индекс SCORAD уменьшился в 3,5 раза, качество жизни улучшилось вдвое (рис. 1).

Таблица 1
Клиническая эффективность Т-клеточной вакцинации при аллергической и неаллергической форме атопического дерматита

Клиническая эффективность	формы АД	
	аллергическая (n = 23)	неаллергическая (n = 6)
Более 85 %	11 пациентов (47,83 %)	4 пациента (66,7 %)
50–85 %	7 пациентов (30,43 %)	2 пациента (33,3 %)
Менее 50 %	3 пациента (13,04 %)	—
Отсутствует	2 пациента (8,7 %)	—

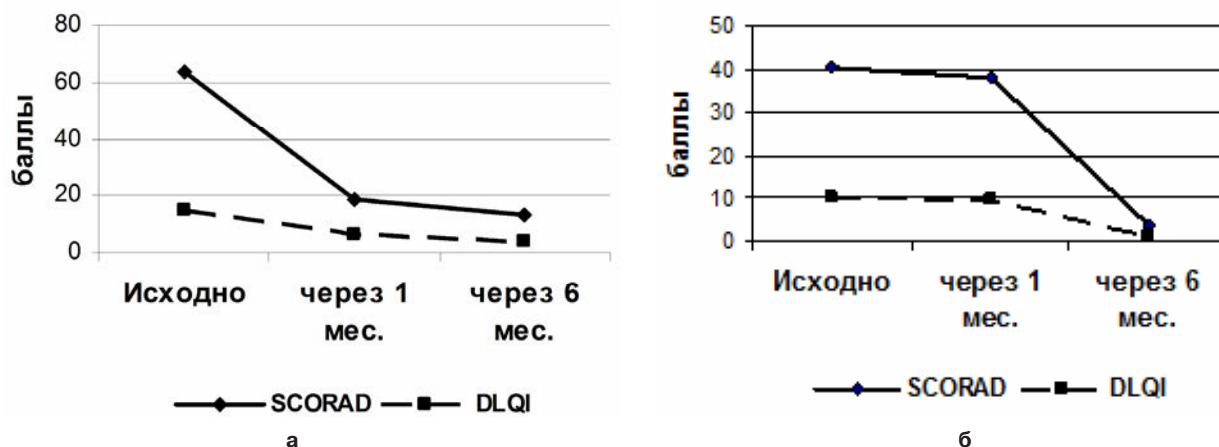


Рис. 1. Динамика индексов SCORAD и DLQI у пациентов с аллергической (а; $n = 23$) и неаллергической (б; $n = 6$) формой atopического дерматита в процессе терапии активированными аутологичными Т-лимфоцитами.

Разные патогенетические механизмы развития аллергической и неаллергической формы atopического дерматита обусловили и разное воздействие активированных аутологичных Т-лимфоцитов на клеточное звено иммунной системы.

При исследовании динамики экспрессии молекул CD25 и DR мы не выявили изменения этих показателей при аллергической форме. Все изменения относились к группе больных с неаллергической формой atopического дерматита. Выявленное снижение числа $CD4^+CD25^-$ Т-лимфоцитов, начиная с третьей недели введения клеток и сохраняющееся весь период лечения у этих больных, вероятно, отражает повышение числа клеток в субпопуляции $CD4^+CD25^+$, заметное также с третьей недели лечения, однако достоверное повышение последних отмечено только через 5 месяцев терапии (табл. 2). Кроме того, показана прямая зависимость содержания $CD4^+CD25^+$ Т-клеток от содержания $CD4^+CD25^{bright}$ -клеток (через 2 недели ($r = 0,83$, $p = 0,04$) и 5 месяцев ($r = 0,83$, $p = 0,04$) терапии), что является подтверждением нарастания числа именно регуляторных клеток в результате вакцинации Т-клетками при этой форме заболевания. У больных с неаллергической формой atopического дерматита в процессе терапии уже через 2 недели после первой инъекции отмечено достоверное

увеличение числа $CD8^+CD25^+$ -клеток, которое оставалось стабильно повышенным в течение всего лечения (табл. 2). Учитывая работы ряда исследователей, показавших, что вакцинация активированными аутологичными Т-клетками приводила к индукции как $CD4^+$, так и $CD8^+$ антиэрготипических регуляторных Т-клеток [5, 11, 15], было сделано предположение, что эти $CD8^+CD25^+$ -клетки являются регуляторными. Функциональное сходство $CD8^+CD25^+$ -клеток с $CD4^+CD25^+$ -регуляторными клетками было выявлено работами L. Cosmi и B. Bienvenu [3, 6].

Таким образом, мы предполагаем, что выраженная клиническая эффективность терапии аутологичными активированными Т-лимфоцитами у пациентов с неаллергической формой atopического дерматита обусловлена нарастанием числа $CD4^+$ - и $CD8^+$ -регуляторных клеток.

Также при неаллергической форме заболевания в результате клеточной терапии выявлено повышение активности лимфоцитов в продукции факторов ингибции миграции, выражающееся в снижении индекса ингибции миграции в реакции гиперчувствительности замедленного типа. Эти изменения наблюдались уже через месяц от начала терапии и сохранялись до конца лечения (рис. 2). Ранее индукция реакции гиперчувствительности

Таблица 2
Изменения экспрессии маркеров активации на $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках в процессе Т-клеточной вакцинации при неаллергической форме atopического дерматита по сравнению с исходным уровнем ($n = 6$)

Показатели	До ТКВ	Через 1 нед.	Через 2 нед.	Через 3 нед.	Через 1 мес.	Через 2 мес.	Через 3 мес.	Через 4 мес.	Через 5 мес.	Через 6 мес.
$CD4^+CD25^-$	$48 \pm 1,3$	$49,5 \pm 5,66$	$38,2 \pm 3,09^*$	$43,9 \pm 4,28$	$37,4 \pm 3,48^*$	$39 \pm 2,62^*$	$34,3 \pm 1,85^*$	$42,2 \pm 2,61$	$35,8 \pm 2,85^*$	$38 \pm 3,41^*$
$CD4^+CD25^+$	$14,9 \pm 0,68$	$12 \pm 1,87$	$18,2 \pm 1,83$	$19,4 \pm 1,89$	$19,5 \pm 2,54$	$18,8 \pm 1,61$	$20,1 \pm 2,25$	$18,6 \pm 2,31$	$21,3 \pm 2,04^*$	$20,3 \pm 2,44$
$CD4^+CD25^{br}$	$1,26 \pm 0,37$	$1,87 \pm 0,33$	$1,5 \pm 0,25$	$1,77 \pm 0,29$	$3,27 \pm 0,72$	$2,56 \pm 0,36$	$2,29 \pm 0,25$	$2,34 \pm 0,45$	$1,44 \pm 0,39$	$1,4 \pm 0,45$
$CD8^+CD25^-$	$36 \pm 0,65$	$34,8 \pm 5,96$	$42,5 \pm 4,16$	$32,3 \pm 3,25$	$36,6 \pm 3,92$	$39,1 \pm 3,69$	$41,3 \pm 4,25$	$36 \pm 3,48$	$37,4 \pm 3,65$	$37 \pm 3,63$
$CD8^+CD25^+$	$1,27 \pm 0,07$	$3,68 \pm 0,68$	$3,13 \pm 0,39^*$	$3,01 \pm 0,26$	$2,68 \pm 0,57^*$	$2,03 \pm 0,48^*$	$3,67 \pm 0,61^*$	$2,34 \pm 0,33^*$	$2,76 \pm 0,43^*$	$3,09 \pm 0,35^*$

Примечание: * – $p < 0,05$.

в результате антиэрготипического ответа была показана в эксперименте [10].

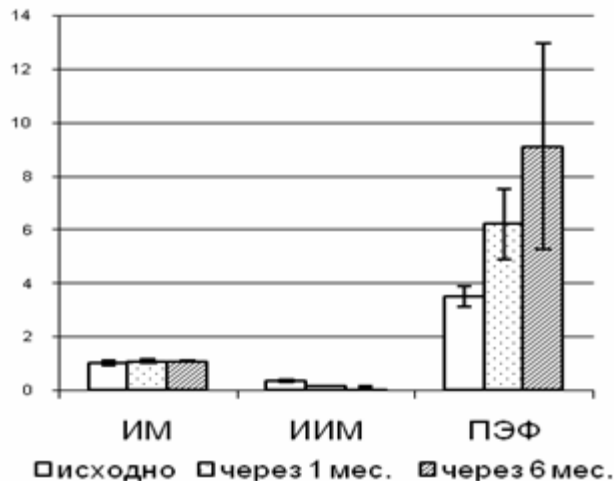


Рис. 2. Изменение реакции гиперчувствительности замедленного типа у больных с неаллергической формой атопического дерматита ($n=6$) в процессе Т-клеточной вакцинации, * – $p < 0,05$.

Изменения в реакции гиперчувствительности замедленного типа в совокупности с увеличением числа клеток, предположительно являющихся антиэрготипическими регуляторными клетками, при неаллергической форме атопического дерматита являются отражением эффекторных функций антиэрготипического ответа.

При аллергической форме заболевания отмечалось иное воздействие на клеточное звено иммунной системы. Было выявлено увеличение общего числа $CD8^+$ -лимфоцитов (с $23 \pm 1,24$ до $26 \pm 1,03$ % ($p < 0,05$)) через 6 месяцев терапии и, соответственно, снижение иммунорегуляторного индекса (с $1,8 \pm 0,14$ до $1,5 \pm 1,11$ ($p < 0,05$)). Мы предположили, что эти клетки являются цитолитическими, т. к. в литературе описано появление в ответ на иммунизацию активированными Т-лимфоцитами антиэрготипических $CD8^+$ -клеток, обладающих цитолитической активностью против активированных аутологичных $CD4^+$ -клеток [5]. Вероятно, эти $CD8^+$ -лимфоциты, ингибируя активированные $CD4^+$ -клетки, активно участвующие в патогенезе аллергической формы атопического дерматита, подавляли реакции гиперчувствительности I типа, играющие важную роль в иммунопатогенезе этой формы, и переключали цитокиновый профиль в сторону Th1-типа, чем и обусловили высокий клинический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при аллергической форме атопического дерматита положительная клиническая динамика от введения аутологичных активированных Т-клеток сопровождалась повышением числа $CD8^+$ -клеток, при неаллергической форме – нарастанием числа $CD8^+CD25^+$ Т-клеток и повышением активности лимфоцитов в продукции

факторов ингибции миграции в реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Авторы выражают благодарность заведующей аллергологическим отделением клиники иммунопатологии В.М. Непомнящих и врачам Д.В. Деминой и М.И. Леоновой, а также научным сотрудникам лаборатории клинической иммунопатологии О.Ю. Корольковой, Н.В. Пронкиной и И.В. Шишковой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кожевников В.С., Баровская Н.А., Королькова О.Ю., Непомнящих В.М. и др. Способ лечения атопического дерматита: пат. 2340348 Рос. Федерация // патентообладатель ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. – заявл. 04.04.2007; опубл. 610.12.2008. – Бюл. 34. – 1 с.
2. Лозовой В.П., Кожевников В.С. Методы оценки клеточных эффекторных функций гиперчувствительности замедленного типа: метод. рек. МЗ СССР. – М., 1990. – 11 с.
3. Bienvenu B., Martin B., Auffray C., Cordier C. et al. Peripheral $CD8^+CD25^+$ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175. – P. 246–253.
4. Cohen I.R., Quintana F.J., Mimran A. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 114. – P. 1227–1232.
5. Correale J., Rojany M., Weiner L.P. Human $CD8^+TCRa/b^+$ and $TCRg/d^+$ cells modulate autologous autoreactive neuroantigen-specific $CD4^+$ T-cells by different mechanisms // J. Neuroimmunol. – 1997. – Vol. 80. – P. 47-64.
6. Cosmi L., Liotta F., Lazzeri E., Francalanci M. et al. Human $CD8^+CD25^+$ thymocytes sharing phenotypic and functional features with $CD4^+CD25^+$ regulatory thymocytes // Blood. – 2003. – Vol. 102. – P. 4107–4114.
7. Huurman V.A., Decochez K., Mathieu C., Cohen I.R. et al. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients // Diabetes Metab. Res. Rev. – 2007. – Vol. 23(4). – P. 269–275.
8. Leung D.Y.M., Boguniewicz M., Howell M.D., Nomura I. et al. New insights into atopic dermatitis // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 113 (5). – P. 651–657.
9. Ling E.M., Smith T., Nguyen X.D., Pridgein C. et al. Relation of $CD4^+CD25^+$ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation in atopic status and expression of allergic disease // Lancet. – 2004. – Vol. 363. – P. 608–615.
10. Lohse A.W., Mor F., Karin N., Cohen I.R. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells // Science. – 1989. – Vol. 244. – P. 820–822.
11. Mimran A., Mor F., Carmi P., Quintana F.J. et al. DNA vaccination with $CD25$ protects rats from adjuvant arthritis and induces an anti-ergotypic response // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 113. – P. 924–932.

12. Novak N., Bieber T., Leung D.Y.M. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis // J. Allergy Clin. Immunol. — 2003. — Vol. 112. — P. 128–139.

13. Robinson D.S., Larché M., Durham R. Treg and allergic disease // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 114 (10). — P. 1389–1397.

14. Shi H.-Z., Qin X.-J. CD4 + CD25 + regulatory T lymphocytes in allergy and asthma // Allergy. — 2005. — Vol. 60. — P. 986–995.

15. Zang Y.C., Hong J., Rivera V.M., Killian J. et al. Preferential recognition of TCR hypervariable regions by human anti-idiotypic T cells induced by T cell vaccination // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164. — P. 4011–4017.

Сведения об авторах

Шестакова Наталья Алексеевна – старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБУ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера СО РАМН, врач аллерголог-иммунолог, кандидат медицинских наук (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел.: 8 (391) 288-52-63; факс: 8 (391) 212-52-63; e-mail:)

Кожевников Владимир Сергеевич – заведующий лабораторией клинической иммунопатологии ФГБУ Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: 8 (383) 228-21-20; факс: 8 (383) 222-70-28)

М.В. Шипунов, Н.М. Старостина, Е.Л. Гельфгат, Е.Р. Черных, А.А. Останин

ИММУННЫЕ ПРЕДИКТОРЫ ФИБРОГЕНЕЗА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Работа посвящена разработке неинвазивных методов диагностики фиброза печени у больных хроническими вирусными гепатитами (ХВГ). При создании диагностической модели использовали множественный, линейный, пошаговый регрессионный анализ биохимических (ПТИ, глюкоза, альбумин, АСТ, ЛДГ) и иммунологических тестов (показатели функциональной активности нейтрофилов и моноцитов, относительное содержание в крови CD8⁺ T-лимфоцитов и CD19⁺ B-клеток), что позволяло рассчитать 2 интегральных индекса фиброза печени (ИИФП-био и ИИФП-имм, соответственно). Показано, что ИИФП-био позволяет, не прибегая к пункционной биопсии печени, прогнозировать соответствующую стадию фиброза у больных ХВГ с диагностической точностью 86–87 %, а в комбинации с ИИФП-имм — на уровне 97,7 %.

Ключевые слова: хронические вирусные гепатиты, стадии фиброза, неинвазивная диагностика

IMMUNE PREDICTORS OF FIBROGENESIS AND THEIR APPLICATION FOR NON-INVASIVE DIAGNOSTICS OF LIVER FIBROSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS

M.V. Shipunov, N.M. Starostina, E.L. Gelfgadt, E.R. Chernykh, A.A. Ostanin

Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

The study was devoted to development of non-invasive methods for diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis (CVH). The stepwise logistic multivariate regression analysis of biochemical (PTI, glucose, albumin, AST, LDH) and immunological parameters (the functional activity of neutrophils and monocytes, the relative content of CD8⁺ T- and CD19⁺ B-cells) was used for the establishment of diagnostic model. Based on the multiple regression analysis we derived a 2 novel Integral Indexes of Liver Fibrosis (ILF-biochem and ILF-immun, respectively). It is shown that ILF-biochem allows, without resorting to liver biopsy, to predict the appropriate stage of fibrosis in CHV patients with diagnostic accuracy of 86–87 %, and in combination with ILF-immun — at 97.7 %.

Key words: chronic virus hepatitis, fibrosis stages, non-invasive diagnostics

Процесс фиброгенеза при хронических вирусных гепатитах (ХВГ) является ответной реакцией организма на повреждение печени, которая инициируется и поддерживается хроническим воспалительным процессом [4]. Ранее традиционным было представление о необратимости фиброза, однако в настоящее время доказана возможность его регресса, особенно, на начальных стадиях фиброзов печени. В то же время фиброз на стадии морфологического цирроза, характеризующийся глубоким изменением архитектоники паренхимы печени, считается необратимым. В связи с огромной ролью фиброза в патогенезе ХВГ, большое значение при ведении пациентов имеет мониторинг фиброзных изменений, что позволяет своевременно начать адекватную комплексную терапию, и предупредить трансформацию фиброза печени в цирроз.

В настоящее время пункционная биопсия печени (ПБП) с последующим морфологическим исследованием биоптата считается «золотым стандартом» определения степени тяжести фиброза [12]. К сожалению, данный метод имеет ряд существенных ограничений [7]. Пункционная биопсия, выполняемая чрезкожным или лапароскопическим путем, является инвазивной методикой с опреде-

ленным процентом осложнений (абдоминальные и торакальные кровотечения, пневмоторакс, ранения желчного пузыря и протоков, перитонит) вплоть до летальных исходов. Вследствие этого ПБП фактически приравнивается к малому оперативному вмешательству на органах брюшной полости. При ПБП существует вероятность так называемой «ошибки попадания», когда биопсийная игла попадает в участок ткани с менее или, наоборот, более выраженными изменениями, чем в целом в печени. Кроме того, информативен только пунктат длиной не менее 10–20 мм, содержащий не менее 7–9 порталных трактов, что не всегда удается достичь при проведении ПБП. В ряде случаев биопсия печени невозможно выполнить, так как имеются противопоказания (кисты, гемангиомы печени, тромбоцитопения, различные нарушения гемостаза, гемофилия, и др.). Существенной проблемой является также необходимость выполнения повторных биопсий для динамической оценки выраженности фиброза в процессе лечения.

Поэтому актуальным является поиск и разработка неинвазивных методов диагностики степени тяжести фиброза печени. Наиболее перспективным направлением в этой области является создание комбинированных шкал или индексов (с оцен-

кой в баллах). В настоящее время разработано несколько таких индексов, которые могут выступать в качестве предикторов наличия и/или степени тяжести фиброза печени [6, 11, 8, 10, 9]. Ранее нами в результате проведения ретроспективного анализа 126 больных ХВГ, которые проходили комплексное обследование, включающее биопсию печени ПБП, и лечение на базе клиники иммунопатологии ИКИ СО РАМН в период 2006 — 2008 гг., был разработан новый способ неинвазивной диагностики фиброза печени [1]. При создании диагностической модели использовали множественный, линейный, пошаговый регрессионный анализ биохимических параметров в группах здоровых доноров крови (F0) и больных ХВГ с F1/2 стадией фиброза, распространенным фиброзом (F3), а также с морфологически документированным циррозом печени (F4/ЦП). В результате было получено уравнение множественной регрессии, которое позволяло на основе 5 биохимических показателей (ПТИ, глюкоза, альбумин, АСТ, ЛДГ) рассчитать интегральный индекс фиброза печени (ИИФП). Диагностическая точность разработанной модели была проверена на «экзаменационном» массиве 84 больных ХВГ (F1/2 — $n = 42$; F3 — $n = 19$; F4 — $n = 23$), и было показано, что значения ИИФП в установленных интервалах позволяют прогнозировать соответствующую стадию фиброза (F1/2 vs F3 vs F4) с диагностической точностью 86 % [2].

Тем не менее, как и любые другие методы исследования, предложенный нами способ не позволял полностью исключить диагностические ошибки. Так, в нашем исследовании они составили 14 %, т.е. у 12 из 84 больных ХВГ стадия фиброза, определенная с помощью ИИФП, не согласовывалась с заключением морфогистологического исследования биоптата, взятого в качестве «золотого» стандарта диагностики. При этом ложноположительные (гипердиагностика) и ложноотрицательные (гиподиагностика) результаты были получены у 5 и 7 больных, соответственно.

Поэтому представлялось важным ответить на вопрос, можно ли, используя аналогичные принципы дискриминантного анализа, разработать дополнительный метод «второго уровня», который бы позволил более четко диагностировать начальные и продвинутое стадии фиброза печени (F1 против F2/3) в тех случаях, когда результаты ИИФП вызывают сомнения? Следует отметить, что диагностика фиброза печени в терминальной F4 стадии, как правило, не вызывает больших затруднений, поскольку врач сталкивается с яркой клинической манифестацией цирроза печени. В клинической практике наибольшие трудности и, вместе с тем, принципиальное значение для выбора лечебной тактики имеет своевременная и точная диагностика F1 (начальной) или F2/3 (продвинутой) стадии фиброза печени. Так, на начальных стадиях, когда не страдает архитектура органа, вовремя начатая противовирусная терапия позволяет остановить репликацию вируса и, в отдельных случаях, добиться обратного развития (регресса) фибротического

процесса. В то же время, агрессивная противовирусная терапия на продвинутых стадиях фиброза может негативно сказаться на состоянии больного, тогда как адекватная антифибротическая терапия может предупредить дальнейшую прогрессию фиброгенеза и возможную трансформацию в F4/ЦП с развитием печеночной недостаточности и портальной гипертензии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период 2009 — 2011 гг. были организованы и проведены проспективные, лонгитудинальные исследования с целью валидации разработанного нами метода неинвазивной диагностики степени тяжести фиброза печени у больных ХВГ [10]. В исследование были включены 199 больных ХВГ: 139 мужчин и 60 женщин, в возрасте от 18 до 66 лет (средний возраст 38 лет). Преобладающее большинство больных были инфицированы вирусом гепатита С в изолированной форме (140/199, 70,5 %). Моноинфекция вирусом гепатита В была выявлена у 36 больных, что составило 18 %. Смешанные формы вирусной инфекции были диагностированы в оставшихся 11,5 % случаев (23/99). 33 % обследованных больных ХВГ (66/199) характеризовалась наличием клинических проявлений цирроза печени.

Диагноз ХВГ устанавливался на основании клинико-эпидемиологических и биохимических данных, и подтверждался определением маркеров инфицирования методом иммуноферментного анализа (HbsAg, AT HbsAg, AT HBcore Ag, AT HBcore IgM, HbeAg, AT HbeAg IgG, AT HDV, AT HCV, AT HScore IgM) и/или полимеразной цепной реакции (ДНК HBV и РНК HCV в сыворотке крови, мононуклеарных клетках, биоптате печени).

Образцы печеночной ткани для морфологического исследования получали в результате чрезкожной пункционной аппаратной биопсии печени под УЗИ-навигацией. Выраженность фиброза оценивали по шкале METAVIR [5], выделяя следующие стадии: F0 — нет фиброза; F1 — звездчатое расширение портальных трактов без формирования септ; F2 — увеличение портальных трактов с формированием редких септ; F3 — множественные септы без цирроза; F4 — цирроз. По результатам гистологического исследования биоптатов печени F1/2 стадия была выявлена у 104 (52,2 %), F3 и F4 стадии — у 41 (20,6 %) и 54 (27,2 %) больных ХВГ, соответственно.

Все лабораторные исследования проводили при поступлении больного в стационар, т.е. до выполнения пункционной биопсии печени и начала комплексной терапии. Биохимические исследования включали определение 30 показателей, в том числе уровень глюкозы натощак (ммоль/л), протромбиновый индекс (ПТИ, %), альбумин (г/л), тимоловая проба (Ед), общий и прямой билирубин (мкмоль/л), аланинамино-трансаминаза (АЛТ, ммоль/ч*л), аспартатамино-трансаминаза (АСТ, ммоль/ч*л), лактатдегидрогеназа (ЛДГ, Ед/л), щелочная фосфатаза (ЩФ, Ед/л), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП, Ед/л), холестерин (ммоль/л) и др.

Общий анализ периферической крови проводили на гемоанализаторе «НЕМА-Screen 13» (Швейцария-Италия).

Относительное количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR антигены, а также субпопуляционный состав лимфоцитов определяли методом проточной цитофлюориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с помощью моноклональных антител против CD3, CD4, CD8, CD19 («МедБиоСпектр» и «Сорбент», Россия). Функциональную активность фагоцитарных клеток оценивали по показателю активации нейтрофилов (ПАН) и моноцитов (ПАМ), определяемому по продукции перекиси водорода клетками после стимуляции зимозаном. Результат оценивался на многоканальном спектрофотометре (Multiskan MS, Labsystems, Финляндия) по интенсивности окрашивания пробы, которое происходило за счет окисления ортофенилдиамина в процессе катаболизма перекиси водорода.

Концентрацию иммуноглобулинов класса G, M, A в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини с использованием соответствующих диагностических наборов (производства НПЦ «Медицинская иммунология», Москва). Лабораторный скрининг включал также определение сывороточного уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК, усл. ед.)

Все исследования проводили после получения письменного информированного согласия больных и были одобрены решением Локального этического

комитета НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Для математической обработки полученных данных использовали программу STATISTICA 6.0 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные проспективные исследования показали, что результаты неинвазивной диагностики степени тяжести фиброза печени по заявленному способу в 87 % случаев (173/199) совпали с результатами морфологической оценки биоптатов печени (рис. 1), что подтверждает установленную ранее высокую диагностическую точность предлагаемого метода. Из 26 случаев ошибочной диагностики у 5,5 % (11/199) больных были получены ложноотрицательные результаты. В 7,5 % случаев (15/199) были получены ложноположительные результаты. Таким образом, результаты не только ретроспективных [2], но и проведенных проспективных, лонгитудинальных исследований показывают, что разработанный нами способ позволяет, не прибегая к пункционной биопсии печени, эффективно оценивать степень тяжести фиброза у больных ХВГ по величине ИИФП.

Проведенные нами ранее сравнительные исследования показателей иммунного статуса здоровых доноров и больных ХВГ с различной выраженностью фиброза печени позволили выявить четкую сопряженность фиброгенеза с иммунными нарушениями, которые проявляются Т-лимфопенией, активацией гуморального звена

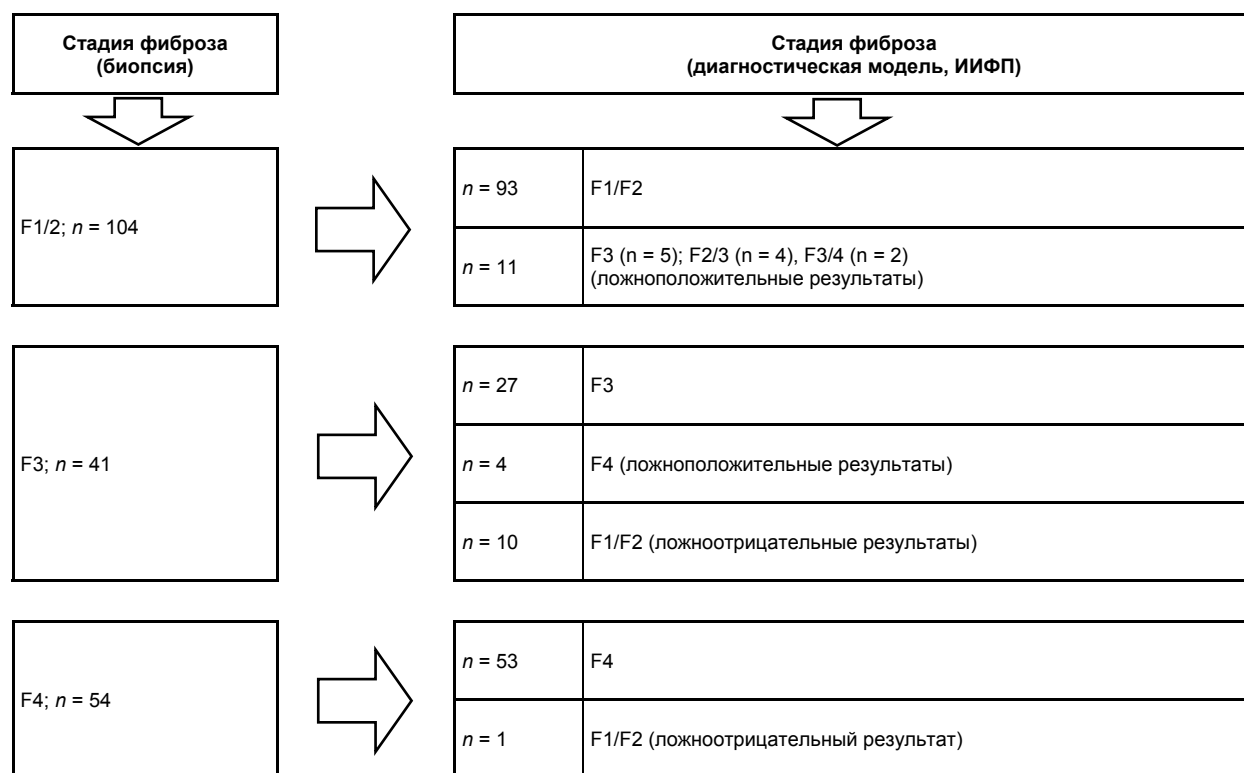


Рис. 1. Эффективность разработанной модели (ИИФП) в диагностике стадии фиброза печени у больных ХВГ (n = 199) по данным проспективных, лонгитудинальных исследований.

иммунитета, нарушением функциональной активности моноцитов/нейтрофилов и сдвигом баланса TIMP-1/MMP-9 в сторону доминирования тканевых ингибиторов металлопротеиназ [2]. При этом корреляционный анализ показал, что прогрессия фиброза сопряжена со снижением относительного количества цитотоксических CD8⁺T-лимфоцитов ($r_s = -0,29$), функциональной активности моноцитов (ПАМ, $r_s = -0,29$) и нейтрофилов (ПАН, $r_s = -0,47$), с увеличением сыровоточного уровня IgM ($r_s = 0,25$), IgA ($r_s = 0,54$), IgG ($r_s = 0,51$), TIMP-1 ($r_s = 0,44$), а также индекса соотношения TIMP-1/MMP-9 ($r_s = 0,54$).

Эти данные свидетельствуют, что отдельные (предпочтительнее относительно простые и доступные) иммунологические тесты могут быть использованы для разработки «второго уровня» неинвазивной диагностики степени тяжести фиброза печени. Исходя из этой задачи, из когорты здоровых доноров и больных ХВГ был сформирован дополнительный «обучающий» массив данных. 50 здоровых доноров крови (35 мужчин и 15 женщин, средний возраст 35 лет) были приняты нами в качестве группы F0 (признаков фиброза — нет). Вторую группу составили 14 больных ХВГ (12 мужчин и 2 женщины, средний возраст 32,5 года) с морфологически документированной начальной F1 фиброзом. В третью группу были включены 92 больных ХВГ (67 мужчин и 25 женщин, средний возраст 34 года), у которых по данным биопсии диагностировались продвинутое F2/3 стадии фиброза.

При дальнейшей работе с данными сформированного «обучающего» массива использовали множественный, линейный, пошаговый регрессионный анализ показателей иммунного статуса с последовательным включением/исключением переменных при уровне порогов вероятностей равно 0,05. В качестве потенциальных регрессантов были проанализированы показатели, которые коррелировали со степенью тяжести фиброза (CD19⁺В-клетки, IgM, IgA, IgG, ПАН, ПАМ, CD8⁺T-лимфоциты). В результате процедуры пошаговой регрессии в модель были включены ПАН, ПАМ, CD8⁺T-лимфоциты и CD19⁺В-клетки. При продолжении анализа с переменными IgM, IgA, IgG F-критерий оказался меньше, чем «F-включить», поэтому они были исключены из модели, как менее значимые.

Итак, в соответствии с процедурой пошаговой регрессии в диагностическую модель было включено 4 иммунологических параметра: показатели активности нейтрофилов и моноцитов (ПАН и ПАМ), относительное содержание в крови CD8⁺T-лимфоцитов и CD19⁺В-клеток. Для каждого из них были получены соответствующие коэффициенты регрессии (патентное «ноу-хау»). В итоге, математическая модель для диагностики F0, F1 и F2/3 стадии фиброза выражается в виде следующего уравнения:

$$\text{ИИФП-имм} = B_0 + (B_1 \times \text{ПАН [усл. ед.]}) + (B_2 \times \text{ПАМ [усл. ед.]}) + (B_3 \times \text{CD8-T-клетки [\%]}) + (B_4 \times \text{CD19-B-клетки [\%]}),$$

где: $B_0 = 6,628824$ (стандартная ошибка), $B_1 - B_4$ — коэффициенты регрессии для соответствующих переменных.

Используя полученное уравнение множественной регрессии, были рассчитаны интегральные индексы фиброза печени с иммунологическими предикторами (ИИФП-имм) индивидуально для всех обследованных лиц из обучающего массива. В подгруппах с F0, F1 и F2/3 стадиями фиброза медианные значения ИИФП-имм составили 5,72 (LQ-UQ 5,10–6,24), 4,26 (3,91–4,57) и 3,32 (2,70–3,70 расч. ед.), соответственно. Кроме того, было установлено, что величина ИИФП-имм обратно коррелировала с гистологической стадией фиброза печени ($r_s = -0,85$; $p < 0,000001$).

Полученные результаты послужили основанием для ROC-анализа операционных характеристик ИИФП-имм с целью определения значимости данного индекса в распознавании начальной (F1) и продвинутых (F2/F3) стадий фиброза, а так же в диагностике наличия и отсутствия фиброза печени (F1 и F0). Для этого были построены 2 характеристические кривые (receiver-operator curve, ROC). Проведенный ROC-анализ показал, что площадь под кривой для ИИФП-имм при распознавании начальной (F1) и продвинутых (F2/F3) стадий фиброза составила 0,90 (95% ДИ 0,66–0,93; $p = 0,0002$). В свою очередь, площадь под ROC-кривой для ИИФП-имм, используемого для диагностики наличия или отсутствия фиброза печени (F1 и F0), составила 0,94 (95% ДИ 0,88–1,0; $p = 0,0001$).

В соответствии с классификацией J.A. Swets [13] площадь под ROC-кривой от 0,5 до 0,7 свидетельствует об относительно невысокой точности диагностического теста. Если площадь под ROC-кривой варьирует от 0,7 до 0,9, то предложенный тест может быть использован в диагностических целях. Площадь под ROC-кривой выше 0,9 характеризует тест, обладающий наиболее высокой диагностической точностью. Поскольку в нашем случае площадь под ROC-кривыми составляла 0,9 и 0,94, это свидетельствует о том, что ИИФП-имм, характеризуется высокой эффективностью как в распознавании начальной (F1) и продвинутых (F2/F3) стадий фиброза, так и в диагностике наличия/отсутствия фиброза печени (F1 и F0) у больных ХВГ.

Как известно, построение характеристической ROC-кривой обеспечивает не только понимание того, что определенный тест является диагностически полезным и информативным, но позволяет также определить наиболее оптимальную точку разделения, т.е. такое пороговое значение теста, выше (или ниже) которого можно наиболее эффективно проводить диагностическую процедуру [3]. Поэтому следующим шагом ROC-анализа стало определение чувствительности, специфичности и отношения правдоподобия для различных точек разделения.

В первом случае (для диагностики F1 и F2/F3 стадий фиброза) наиболее оптимальной точкой разделения стало пороговое значение ИИФП-

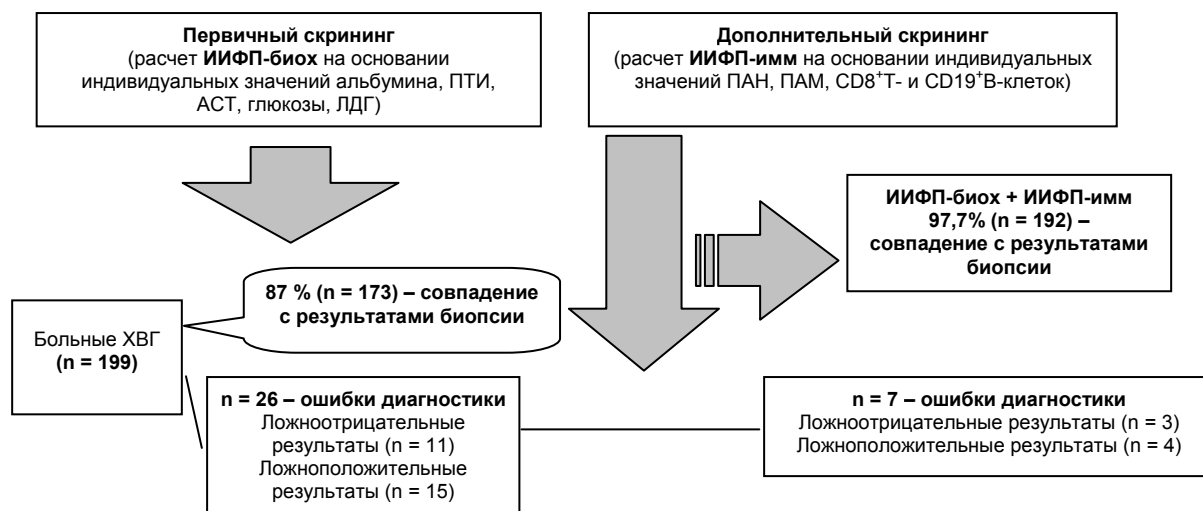


Рис. 2. Эффективность методов неинвазивной диагностики фиброза печени у больных ХВГ.

имм = 4,14 расч. ед. (отношение правдоподобия 3,5), которое соответствовало максимальным показателям чувствительности (88 %) и специфичности (75 %). Во втором случае (для диагностики наличия/отсутствия фиброза) наиболее оптимальной точкой разделения явилось пороговое значение ИИФП-имм = 4,60 расч. ед. (отношение правдоподобия 7,5, чувствительность – 88 %, специфичность – 88,4 %).

Таким образом, в результате проведенного ROC-анализа удалось определить следующие пороговые значения и диапазоны ИИФП-имм: значения ИИФП-имм > 4,60 свидетельствуют об отсутствии фиброза (F0); в интервале 4,14 – 4,60 соответствуют начальной (F1) стадии и <4,14 позволяют диагностировать продвинутые (F2/F3) стадии фиброза печени у больных ХВГ.

Затем, используя уравнение множественной регрессии были определены индивидуальные значения ИИФП-имм у больных ХВГ (n = 26), у которых результаты определения стадии фиброза с помощью ИИФП, рассчитанного по биохимическим показателям (ИИФП-биох), не совпадали с заключением морфогистологического исследования биоптата. Оказалось, что в подгруппе больных с наиболее опасными, ложноотрицательными ошибками привлечение метода неинвазивной диагностики «второго уровня» (т.е. расчет ИИФП-имм) позволило сократить число ошибочных заключений с 11 до 3 случаев. В подгруппе больных с ложноположительными результатами с помощью ИИФП-имм удалось сократить число ошибочных заключений с 15 до 4 случаев. На рисунке 2 показана эффективность разработанных нами методов неинвазивной диагностики фиброза печени у больных ХВГ, в случае изолированного использования только ИИФП-биох, а также в случае комбинированного применения ИИФП-биох и ИИФП-имм у тех больных, у которых результаты первичного скрининга оказались ошибочными.

Таким образом, полученные результаты показывают, что ИИФП-имм может быть использован

для дифференциальной диагностики начальной F1 стадии от продвинутых F2/F3 фиброза печени в качестве дополнительного теста при принятии решения в сложных случаях, требующих дополнительного подтверждения диагноза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить очевидные преимущества разработанных нами подходов. Во-первых, биохимическое и/или иммунологическое исследование безопасно для больного и может проводиться с более короткими временными интервалами, чем биопсия печени, и, следовательно, позволяет осуществлять мониторинг больных ХВГ на фоне проводимой противовирусной и антифибротической терапии. Во-вторых, исследование доступно практически для всех учреждений практического здравоохранения, поскольку базируется на «рутинных» биохимических/иммунологических тестах. В-третьих, предлагаемый подход является более информативным, поскольку позволяет оценивать переходные состояния между различными стадиями фиброгенеза (например, F1/2→F3 или F3→F4). И наконец, в-четвертых, по своей эффективности разработанный нами подход не уступает эластографии – другому известному методу неинвазивной (инструментальной) оценки степени тяжести фиброза печени, который в нашем исследовании продемонстрировал диагностическую точность на уровне 69 % (данные не представлены), тогда как расчет ИИФП-биох – на уровне 86–87 %, а в комбинации с ИИФП-имм – на уровне 97,7 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Останин А.А., Гельфгат Е.А., Шипунов М.В., Старостина Н.М. и др. Способ диагностики фиброза печени // Отозванная заявка на изобретение RU 2007118845 (А) («ноу-хау» НИИ КИ СО РАМН, приказ 93-П от 17.10.2008), приоритет от 21.05.2007
2. Останин А.А., Гельфгат Е.А., Шипунов М.В., Шевела Е.Я. и др. Прогностическая

модель неинвазивной диагностики фиброза печени у больных хроническими вирусными гепатитами // Мед. иммунология. — 2008. — Т. 10, N 4/5. — С. 405—414.

3. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. Москва: Издательская группа «ГЭО-ТАР-Медиа», 2009. — С. 108—110

4. Bataller R., Brenner D.A. Liver fibrosis // Clin. Invest. — 2005. — Vol. 115. — P. 209—218.

5. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group // Hepatology. — 1996. — Vol. 24. — P. 289—293.

6. Bonacini M., Hadi G., Govindarajan S., Lindsay K.L. Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection // Am. J. Gastroenterol. — 1997. — Vol. 92. — P. 1302—1304.

7. Bravo A.A., Sheth S.G., Chopra S. Liver biopsy // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344. — P. 495—500.

8. Forns X., Ampurdanes S., Llovet J.M. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic

fibrosis by a simple predictive model // Hepatology. — 2002. — Vol. 36. — P. 986—992.

9. Imbert-Bismut F., Ratziu V., Pieroni L. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study // Lancet. — 2001. — Vol. 357. — P. 1069—1075.

10. Kelleher T.B., Mehta S.H., Bhaskar R. Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV co-infected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index // J. Hepatology. — 2005. — Vol. 43. — P. 78—84.

11. Poynard T., Bedossa P. METAVIR and CLINIVIR cooperative studygroups. Age and platelet count: a simple index for predicting the presence of histological lesions in patients with antibodies to hepatitis C virus // J. Viral Hepatol. — 1997. — Vol. 4. — P. 199—208.

12. Strader D.B., Wright T., Thomas D.L., Seeff L.B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C // Hepatology. — 2004. — Vol. 39. — P. 1147—1171.

13. Swets J.A. Measuring the accuracy of diagnostic systems // Science. — 1988. — Vol. 240. — P. 1285—1293.

Сведения об авторах

Шипунов Максим Валерьевич — врач, ассистент кафедры иммунологии ФГБУ НИКИ СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14; тел.: (383) 228-28-57; e-mail: ct-lab@mail.ru)

Старостина Наталья Михайловна — заведующая отделением иммунологии, заместитель директора по научной и лечебной работе, заслуженный врач РФ, кандидат медицинских наук ФГБУ НИКИ СО РАМН

Гельфгат Евгений Львович — научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ НИКИ СО РАМН

Черных Елена Рэмовна — заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, заместитель директора НИКИ СО РАМН, чл.-корр. СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)

Останин Александр Анатольевич — главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ клинической иммунологии СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Н.С. Шкаруба ¹, Ф.Ф. Васильев ¹, А.Н. Силков ¹, Ю.А. Сенникова ¹, Ю.А. Лопатникова ¹,
А.Э. Сизиков ¹, Т.А. Калашникова ², Л.П. Сизякина ², Ю.Б. Шулман ³, С.В. Долгих ³,
В.И. Мазуров ³, С.В. Сенников ¹

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ TNFRI В ПОЗИЦИЯХ -609 И -1207 И TNFRII ТИПА В ПОЗИЦИЯХ -1709 И -3609 СРЕДИ УСЛОВНО-ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

¹ НИИ Клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

² РостГМУ (Ростов-на-Дону)

³ СПбМАПО (Санкт-Петербург)

В работе была изучена частота встречаемости аллельных вариантов генов TNFRI в позициях -609 и -1207 и TNFRII типа в -1709 и -3609 у больных ревматоидным артритом и в группе популяционного контроля. В группе популяционного контроля полученные частоты аллелей и распределение генотипов промотора гена TNFRI для полиморфных точек -609 и -1207 характерны для азиатских популяций, для полиморфизмов гена TNFRII частоты и распределение отличались от европейских и азиатских популяций. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов промоторных регионов генов TNFRI в позициях -609 и -1207 и TNFRII в позициях -3609 и -1709 у больных ревматоидным артритом и в группе популяционного контроля не выявил статистически значимых различий. Тем не менее, при анализе комбинаций было показано, что в группе больных ревматоидным артритом по сравнению с группой популяционного контроля статистически значимо реже встречается сочетание генотипов TNFRI-609GT + TNFRII-3609CC.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, фактор некроза опухоли, рецепторы

THE FREQUENCY OF ALLELIC VARIANTS OF GENES TNFRI AT POSITIONS -609 AND -1207 AND TNFRII AT POSITIONS -1709 AND -3609 IN HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

N.S. Shkaruba ¹, P.P. Vasiliev ¹, A.N. Silkov ¹, J.A. Sennikova ¹, J.A. Lopatnikova ¹,
A.E. Sizikov ¹, T.A. Kalashnikova ², L.P. Sizyakina ², J.B. Shulman ³, S.V. Dolgikh ³,
V.I. Mazurov ³, S.V. Sennikov ¹

¹ Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

² Rostov-on-Don State Medical University, Rostov-on-Don

³ Medical Academy of Post-Diploma Education, St Petersburg

In this paper we studied the frequency of allelic variants of genes TNFRI at positions -609 and -1207 and TNFRII at positions -1709 and -3609 in patients with rheumatoid arthritis and in population control group. It was shown that the resulting frequency distribution of alleles and genotypes of TNFRI gene promoter in a group of population control is characteristic for Asian populations, for TNFRII gene polymorphisms and the frequency distribution differed from the European and Asian populations. Comparative analysis of allele and genotype frequencies of TNFRI gene promoter at positions -609 and -1207 and TNFRII and -3609 and positions -1709 in patients with rheumatoid arthritis and in population control group showed no statistically significant differences. However, in the analysis of combinations has been shown that in patients with rheumatoid arthritis compared with the control population was significantly less common combination of genotypes TNFRI-609GT + TNFRII-3609CC.

Key words: rheumatoid arthritis, tumor necrosis factor, receptors

Ревматоидный артрит (РА) — частое встречающееся воспалительное заболевание суставов, распространенность которого в популяции превышает 1,0 % [1, 2]. Одним из ключевых цитокинов в развитии этого заболевания является TNF-α, роль которого изучена в ряде исследований *in vitro* и *in vivo* и подтверждена в ходе клинических исследований по применению препаратов-блокаторов TNF-α для лечения ревматоидного артрита [3]. TNF-α реализует свое действие через два трансмембранных рецептора: рецептор TNF I типа (TNFRI), также известный как p55 или p60, и рецептор TNF II типа (TNFRII), обозначаемый также как p75 или p80. TNFRI — конститутивно экспрессируется практически на всех клетках млекопитающих, тогда как TNFRII экспрессируется преимущественно

на клетках иммунной системы. Домен смерти содержит цитоплазматическая часть TNFRI, но не TNFRII. Через TNFRI реализуется большинство эффектов TNF-α, включая цитотоксический, индукцию роста клеток, активацию NFκB, регуляцию адгезии и индукцию экспрессии генов цитокинов. Было показано, что сигнал, передающийся через TNFRII, важен для пролиферации лимфоидных клеток. Продemonстрировано, что в некоторых типах клеток TNFRII играет роль в реализации эффектов цитотоксичности, а также активации NFκB [4]. И TNFRI, и TNFRII могут быть отделены от поверхности клеток ферментами семейства металлопротеиназ в ответ на воспалительный сигнал. Интересно, что эти отделенные внеклеточные области рецепторов TNF-α (так называемые рас-

творимые рецепторы TNF- α) сохраняют способность связывать TNF- α и таким образом могут функционировать как эндогенные ингибиторы TNF- α [5]. Уровень растворимых рецепторов TNF- α повышен в синовиальной жидкости и сыворотке крови больных РА [6, 7]. В другой работе продемонстрировано, что сывороточная концентрация растворимых рецепторов TNF- α выше у больных РА по сравнению с условно здоровыми донорами, а при разделении группы больных на пациентов с активным РА и пациентов в ремиссии (по DAS28) было показано, что концентрация растворимых рецепторов TNF- α выше у пациентов в ремиссии [8]. Уровень экспрессии рецепторов, в том числе и к TNF- α , в определенной степени зависит от аллельных вариантов их генов, частота встречаемости которых может значительно меняться при патологических процессах. Таким образом, полиморфные генетические сайты могут рассматриваться как маркеры предрасположенности или резистентности к различным заболеваниям, в патогенезе которых играет свою роль цитокиновая сеть [9, 10]. Целью данного исследования было изучить частоту встречаемости аллельных вариантов генов TNFRI в позициях -609 и -1207 и TNFRII типа в -1709 и -3609 в группе популяционного контроля и у больных ревматоидным артритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования (образцы цельной крови) получен от условно здоровых доноров: в УФ и НП НСО (ОГУЗ «Новосибирский центр крови»). Выборка популяционного контроля для исследования генотипов сформирована случайным образом из числа жителей г. Новосибирска, согласившихся сдать кровь для исследования (211 человек).

Изучение распределения аллельных вариантов генов TNF- α и его рецепторов проводилось у больных РА, находившихся на госпитализации в клинике ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (г. Новосибирск), ГОУ ДПО СПб МАПО (г. Санкт-Петербург), ГОУ ВПО Рост ГМУ (г. Ростов-на-Дону). Выборка больных РА составила 466 человек, из них женщин: 86,5 %, мужчин-13,5 %, в возрасте от 18 до 70 лет. Всем донорам были разъяснены цели исследования, у всех пациентов было получено информированное согласие на процедуру забора биологического материала. Диагноз РА верифицирован в соответствии критериями ACR [11].

ДНК из цельной крови выделяли сорбционным методом с помощью набора «Проба-НК» (ООО «ДНК-технология», Россия) согласно инструкции производителя.

Генотипирование TNFRI по полиморфизмам -609 G/T, -1207 C/G и TNFRII по полиморфизмам -1709 A/T, -3609 C/T проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей рестрикцией продукта амплификации. ПЦР проводили с использованием амплификатора «PTC-200 DNA Engine» (MJ Research inc., USA). Реакционная смесь в объеме 20 мкл содержала 1 – 2 ед. Taq-ДНК полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск), 0,5 мкМ

каждого из праймеров, 0,25 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 50 – 200 нг геномной ДНК. Реакционный буфер прилагался к ДНК-полимеразе и содержал 60 mM Tris-HCl (pH 8,5 при 25 °C), 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100. Для точки TNFRI -609 применялся AS (Ammonium Sulfate) буфер, содержащий 67 mM Tris-HCl (pH 8,8 при 25 °C), 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20 («СибЭнзим», г. Новосибирск). Режим термоциклирования зависел от состава праймеров и длины амплифицируемого фрагмента и рассчитывался с использованием программы «Primer Premier 5» (Premier Biosoft International, USA). Все праймеры были синтезированы в ЗАО «Биосан», г. Новосибирск. Генотипирование проводилось с использованием опубликованной структуры праймеров [12, 13, 14]. Для генотипирования аллельного полиморфизма гена TNFRII в позиции -3609, размер продукта 331 п.н. последовательности праймеров были подобраны с использованием программы NCBI/Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>).

Прямой: 5'-ATGCTTTTGTCCATGCAGGT -3'

Обратный: 5'-GCTGTACCCCGTATTAGCTG -3'

Далее проводили рестрикционный анализ продуктов ПЦР-амплификации. Продукты амплификации подвергали рестрикции соответствующими эндонуклеазами: TNFRI -609 – Bst4C I, TNFRI -1207 – Bst8C I, TNFRII -1709 – DseD I, TNFRII -3609- Msp I. («СибЭнзим», Новосибирск). Рестрикционная смесь включала 2,5 – 5 мкл амплификата и 5 – 10 единиц активности ферментов фирмы «СибЭнзим» (Новосибирск), далее инкубировали согласно рекомендациям производителя фермента.

Продукты амплификации и рестрикции анализировали с помощью капиллярного электрофореза на станции QIAxcel (Qiagen) или электрофореза в 2% агарозном геле. В качестве маркера молекулярного веса использовали гидролизат плазмиды pUC19, полученный при расщеплении рестриктазой Msp I («СибЭнзим», г. Новосибирск) и QX DNA Size Marker 100bp-3kb (Qiagen). Продукты полимеразной цепной реакции и рестрикции, при разделении в агарозных гелях, визуализировали в ультрафиолетовом свете, молекулярный вес фрагментов оценивался с помощью видеоденситометра и пакета прикладных программ «ImageMaster®VDS» (Pharmacia Biotech, USA).

Статистическая обработка проводилась с использованием стандартных подходов. Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди – Вайнберга проводили по критерию χ^2 . Различия частот аллелей и генотипов устанавливалось с использованием критерия χ^2 с поправкой Йетса. С помощью программы OpenEpi (www.openepi.com) проводилась оценка отношения шансов и 95% доверительного интервала (OR, CI), оценка относительного риска.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты аллелей и генотипов исследованных полиморфизмов промоторных регионов генов ре-

цепторов TNF в позициях -609 и -1207, для рецептора I типа и -3609 и -1709 для рецептора II типа у больных ревматоидным артритом и в выборке популяционного контроля приведены в таблице 1. Распределение генотипов промоторных регионов гена TNFRI в позициях -609 и -1207 и гена TNFRII в позициях -3609 и -1709 в выборке популяционного контроля, составленной из условно-здоровых доноров, подчиняется закону Харди-Вайнберга. Для сравнения распределения частот аллелей и генотипов с другими популяциями были использованы сведения по исследуемым полиморфизмам из базы данных NCBI по референтным популяциям (в ss66857510): для европеоидов -CEU-GENO-PANEL, афроамериканцев -AAM-GENO-PANEL и азиатской расы -CHBGENO-PANEL [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/]. Полученные частоты аллелей и распределение генотипов промотора гена TNFRI для полиморфных точек -609 и -1207 характерны для азиатских популяций, для

полиморфизмов гена TNFRII отличались от европейских и азиатских популяций.

Распределение частот генотипов полиморфизма гена TNFRI в позиции -3609 в группе больных ревматоидным артритом имело отклонение от ожидаемого в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 5,87$; $p = 0,02$), что свидетельствует о наличии факторов, влияющих на частоту аллелей и генотипов в группе больных. При проведении сравнительного анализа частот аллелей и генотипов промоторных регионов генов TNFRI в позициях -609 и -1207 и TNFRII в позициях -3609 и -1709 в исследованных группах мы не выявили статистически значимых различий. Тем не менее, при анализе комбинаций, выявлено сочетание генотипов TNFRI-609GT + TNFRII-3609CC частота которого у больных составила 10,4 % и была статистически значимо ниже таковой в группе популяционного контроля (16,35 %, $\chi^2 = 4,016$, $p = 0.045$). Отноше-

Таблица 1
Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов генов TNFRI и TNFRII у больных ревматоидным артритом и условно-здоровых доноров

Полиморфизм	Группа	Частота генотипа, % (количество)			Частота аллеля, % (количество)	
		GG	GT	TT	G	T
TNFRI (-609 G>T)	РА <i>n</i> = 423	41,8 (177)	43,7 (185)	14,4 (61)	64 (539)	36 (307)
	Контроль <i>n</i> = 208	42,3 (88)	46,2 (96)	11,5 (24)	65 (272)	35 (144)
TNFRI (-1207 C>G)		CC	CG	GG	C	G
	РА <i>n</i> = 462	25,3 (117)	46,1 (213)	28,6 (132)	48 (447)	52 (477)
	Контроль <i>n</i> = 211	22,7 (48)	49,8 (105)	27,5 (58)	48 (201)	52 (221)
TNFRII (-1709 A>T)		AA	AT	TT	A	T
	РА <i>n</i> = 436	88,1 (384)	11,5 (50)	0,5 (2)	94 (818)	6 (54)
	Контроль <i>n</i> = 211	88,6 (187)	11,4 (24)	0	94 (398)	6 (24)
TNFRII (-3609 C>T)		CC	CT	TT	C	T
	РА <i>n</i> = 466	29 (135)	54,7 (255)	16,3 (76)	56 (525)	44 (407)
	Контроль <i>n</i> = 211	32,7 (69)	54 (114)	13,3 (28)	60 (252)	40 (170)

Таблица 2
Частоты комбинаций генотипов промоторных локусов генов TNFRI и TNFRII у больных ревматоидным артритом и условно-здоровых доноров

Генотип TNFRI -609	Генотип TNFRII -3609	Частота сочетания в группе РА (<i>n</i> = 423), %	Частота сочетания в группе контроля (<i>n</i> = 208), %
GG	CC	13	13
GG	CT	22,7	25
GG	TT	6,15	4,33
GT	CC	10,4*	16,35
GT	CT	26	23,56
GT	TT	7,33	6,25
TT	CC	4,73	3,85
TT	CT	6,86	5,29
TT	TT	2,84	2,4

Примечание: * – статистически значимое различие в сравнении с группой популяционного контроля ($p < 0,05$).

ние шансов для этого сочетания генотипов было $OR = 0,5941$ ($CI_{95} = 0,3668 - 0,9622$), при этом относительный риск ревматоидного артрита для носителей этого генотипа был на 5,9 % ниже. Данные сравнительного анализа комбинаций генотипов приведены в таблице 2.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что частота встречаемости аллельных вариантов гена TNFRI в группе популяционного контроля составляет следующие значения (в %): -609GG (42,3), -609GT (46,2), -609TT (11,5); -1207CC (22,7), -1207CG (49,8), -1207GG (27,5), что характерно для азиатских популяций.

2. Показано, что частота встречаемости аллельных вариантов гена TNFRII в группе популяционного контроля составляет следующие значения (в %): -1709AA (88,6), -1709AT (11,4), -1709TT (0); -3609CC (32,7), -3609CT (54), -3609TT (13,3), что отличалось от европейских и азиатских популяций.

3. При исследовании распределения генотипов генов TNFRI и TNFRII в группе популяционного контроля и в группе больных ревматоидным артритом не выявлено статистически значимых различий, но при изучении распределения сочетаний генотипов установлено, что больные ревматоидным артритом характеризуются снижением частоты встречаемости сочетания генотипов TNFRI-609GT + TNFRII-3609CC по сравнению с группой популяционного контроля.

Работа выполнена при поддержке: ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК № 02.740.11.0707).

ЛИТЕРАТУРА

1. Сигидин Я.А., Лукина Г.В. Ревматоидный артрит. — М.: АНКО, 2001. — 328 с.
2. Harris E.D. Jr. Rheumatoid Arthritis: pathophysiology and implications for therapy // N. Engl. J. Med. — 1990. — Vol. 322. — P. 1277–1289.
3. Brennan F.M., McInnes I.B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis // J. Clin. Invest. — 2008. — Vol. 118 (11). — P. 3537–3545.
4. Parameswaran N., Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages // Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr. — 2010. — Vol. 20, N 2. — P. 87–103.
5. Van Zee K.J., Kohno T., Fischer E., Rock C.S. et al. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate

during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89 (11). — P. 4845–4849.

6. Cope A.P., Aderka D., Doherty M., Engelmann H. et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases // Arthritis Rheum. — 1992. — Vol. 35. — P. 1160–1169.

7. Steiner G., Studnicka-Benke A., Witzmann G., Höfler E. et al. Soluble receptors for tumor necrosis factor and interleukin-2 in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, reactive arthritis and osteoarthritis // J. Rheumatol. — 1995. — Vol. 22 (3). — P. 406–412.

8. Sivalingam S.P., Thumboo J., Vasoo Sh., Thio S.T. et al. In vivo Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Normal and Patients with Rheumatoid Arthritis // Ann. Acad. Med. Singapore. — 2007. — Vol. 36. — P. 96–99.

9. Hoogendoorn B. Functional analysis of human promoter polymorphisms // Human Molecular Genetics. — 2003. — Vol. 12 (18). — P. 2249–2254.

10. Pastinen T., Ge B., Hudson T.J. Influence of human genome polymorphism on gene expression // Human Molecular Genetics. — 2006. — Vol. 15, N 1. — P. 9–16.

11. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. — 1988. — Vol. 31 (3). — P. 315–324.

12. Allen R.A., Lee E.M., Roberts D.H., Park B.K. et al. Polymorphisms in the TNF and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease // European Journal of Clinical Investigation. — 2001. — Vol. 31. — P. 843–851.

13. Waschke K.A., Villani A., Vermeire S., Dufresne L. et al. Tumor Necrosis Factor Receptor Gene Polymorphisms in Crohn's Disease: Association with Clinical Phenotypes // The American Journal of Gastroenterology. — 2005. — Vol. 100. — P. 1126–1133.

14. Culpan D., Cornish A., Love S., Kehoe P. et al. Protein and gene expression of tumour necrosis factor receptors I and II and their promoter gene polymorphisms in Alzheimer's disease // Experimental Gerontology. — 2007. — Vol. 42. — P. 538–544.

Сведения об авторах

Шкаруба Надежда Сергеевна – врач, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Васильев Филипп Филиппович – аспирант, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Силков Александр Николаевич – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Сенникова Юлия Александровна – кандидат медицинских наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Лопатникова Юлия Анатольевна – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Сизиков Алексей Эдуардович – заведующий отделением, кандидат медицинских наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Калашникова Татьяна Анатольевна – кандидат медицинских наук, ГОУ ВПО Рост ГМУ

Сизякина Людмила Петровна – заведующий кафедрой, доктор медицинских наук, профессор, ГОУ ВПО Рост ГМУ

Шульман Юлия Борисовна – врач, ГОУ ДПО СПб МАПО

Долгих Сергей Владимирович – руководитель ЦАТ, кандидат медицинских наук, ГОУ ДПО СПб МАПО

Мазуров Вадим Иванович – член-корр. РАМН, профессор, ГОУ ДПО СПб МАПО

Сенников Сергей Витальевич – заведующий лабораторией, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14)

Е.А. Шмелева¹, Т.Н. Фирсова¹, С.М. Попкова², Е.Б. Ракова², Л.В. Сердюк², М.М. Губин³**АНТИТОКСИЧЕСКИЕ ПРОТИВОДИФТЕРИЙНЫЕ АНТИТЕЛА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ВЗРОСЛЫХ ЛЮДЕЙ ПРИ РАЗНЫХ СХЕМАХ ВАКЦИНАЦИИ**¹ Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)² НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)³ ООО «Фирма «ВИПС-МЕД» (Москва)

В работе анализируется напряженность иммунитета к дифтерии по уровню антитоксических противодифтерийных антител в сыворотках крови здоровых взрослых людей в возрасте от 20 до 51 года и старше, проживающих в Англии, Италии, Латвии, Литве, России и Финляндии. В России смещение заболеваемости в период эпидемии в 1993–1996 гг. на старшие возрастные группы послужило основанием для включения в 1998 году в Национальный календарь профилактических прививок РФ обязательной ревакцинации взрослых каждые 10 лет после последней ревакцинации подростков в 14 лет. Избранная тактика вакцинопрофилактики дифтерии не нашла отражения в Национальных календарях профилактических прививок других стран, в том числе европейских, за исключением Финляндии. На основании полученного анализа авторами для оптимизации вакцинопрофилактики дифтерии предлагается: перенести ревакцинацию детей с возраста 18 месяцев на возраст 3–6 лет (по схеме Италии, Англии, Финляндии); вакцинацию взрослых проводить индивидуально, с учетом содержания антитоксических антител в сыворотке крови.

Ключевые слова: дифтерия, вакцинопрофилактика, антитоксические антитела

ANTITOXIC ANTIDIPHTHERIAL ANTIBODIES IN BLOOD SERA OF HEALTHY ADULTS UNDER DIFFERENT VACCINATION SCHEMESЕ.А. Shmeleva¹, T.N. Firsova¹, S.M. Popkova², E.B. Rakova², L.V. Serdyuk², M.M. Gubin³¹ Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow² Scientific Center of Family Health Problem and Human Reproduction SB RAMS, Irkutsk³ Firm VIPS-MED Ltd, Moscow

In this work intensity of immunity to diphtheria on the basis of indicating antitoxic antidiphtherial antibodies level in the blood sera of healthy adults aged 20 to 51 and elder, living in England, Italy, Latvia, Lithuania, Russia and Finland is analyzed. Diphtheria disease incidence shift through the epidemic in 1993–1996 in Russia to the elder age groups had resulted in inclusion of obligatory adults revaccination each 10 years after the last revaccination of teenagers in 14 year in 1998. Chosen tactics of vaccinal prevention of diphtheria didn't find reflection in National prophylactic immunization calendars of other countries including European, except Finland. On the basis of the received analysis for optimization of diphtheria vaccinal prevention authors offer: to transfer a revaccination of children from age of 18 months to age of 3–6 years (according to the scheme in Italy, England, Finland); to carry out vaccination of adults individually depending on antitoxic antibodies concentration in blood sera.

Key words: diphtheria, vaccinal prevention, antitoxic antibodies

Дифтерия — классическая токсикоинфекция, этиологическим фактором которой является дифтерийный токсин, продуцируемый токсигенными *C. diphtheriae* tox+. Инфекция распространяется воздушно-капельным путем и поражает в основном детское население. В 1924 г. Рамоном для профилактики этого заболевания был предложен препарат дифтерийный анатоксин. Массовый охват детского населения профилактическими прививками дифтерийным анатоксином привел к резкому снижению заболеваемости во всем мире. Огромный успех в борьбе с дифтерией способствовал распространению мнения многих ученых о возможности ликвидации заболевания дифтерией и иррадикации ее возбудителя. Однако уже в 50–60 гг. прошлого столетия работами прежде всего отечественных эпидемиологов, было показано, что в иммунных коллективах продолжается свободная циркуляция возбудителя дифтерии и скрытый эпидемиологический процесс [10, 11].

К настоящему времени во всем мире для поддержания эпидемиологического благополучия в отношении основных детских инфекционных заболеваний (дифтерия, коклюш, столбняк, корь, краснуха) согласно Национальным календарям профилактических прививок проводится вакцинация детей и подростков и слежение за напряженностью поствакцинального специфического иммунитета [19].

В 90-е годы (1993–1996 гг.) на фоне низкой заболеваемости во всем мире возникает эпидемия дифтерии в Российской Федерации и некоторых странах СНГ (табл. 1), которая обходит стороной другие государства, в том числе и европейские. Основной причиной возникновения эпидемии считался низкий уровень коллективного антитоксического иммунитета как следствие недостаточной иммунопрофилактики населения. При этом впервые доля взрослых, заболевших во время эпидемии, составила 74,5–82,2%, а детей — 17,8–25,5% [4, 8, 13]. Смещение заболеваемости на старшие возрастные группы послужило основанием для включения

Таблица 1

Случаи дифтерии в странах Европы (данные ВОЗ на декабрь 2008 года)

Страна	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001	2000	1999	1998	1997	1996	1995	1994	1993	1992	1991
Латвия	18	32	20	20	26	45	91	264	81	67	42	112	369	250	12	8	5
Россия	91	178	353	505	655	778	909	771	838	1409	4037	13687	35631	39703	15229	3897	1869
Литва	0	0	0	0	0	3	0	2	6	2	2	11	43	38	8	9	1
Италия	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
Англия	3	3	0	0	3	6	4	2		0		4	1	4	5	3	1
Финляндия	0	0	0	0	0	0	2			0	0	3	3	1	4	0	0

в 1998 г. в Национальный календарь профилактических прививок РФ обязательной ревакцинации взрослых каждые 10 лет после последней ревакцинации подростков в 14 лет [4, 16]. Избранная тактика вакцинопрофилактики дифтерии не нашла отражения в Национальных календарях профилактических прививок других стран, в том числе европейских, за исключением Финляндии.

Целью работы явилось определение уровня антитоксических противодифтерийных антител в

сыворотках крови здоровых взрослых людей в возрасте от 20 до 51 года и старше, проживающих в Англии, Италии, Латвии, Литве, России и Финляндии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение антитоксических антител проводили в сыворотках крови здоровых взрослых людей — доноров из шести стран Европейского континента. Всего изучено 411 проб сывороток крови (табл. 2).

Таблица 2

Противодифтерийные антитоксические антитела в сыворотках здоровых взрослых людей различных возрастных групп

Страна	Возраст	Концентрация, мкг/мл	Количество сывороток
Латвия	20–30	368 ± 65	14
	31–40	276 ± 29	28
	41–50	189 ± 28	20
	51 и старше	65 ± 14	23
Россия	20–30	178 ± 16	25
	31–40	159 ± 18	25
	41–50	26 ± 11	7
	51 и старше	29 ± 6	10
Литва	20–30	157 ± 24	33
	31–40	151 ± 26	28
	41–50	125 ± 22	27
	51 и старше	—	—
Италия	20–30	103 ± 32	10
	31–40	60 ± 11	10
	41–50	49 ± 7	11
	51 и старше	29 ± 6	10
Англия	20–30	65 ± 12	33
	31–40	51 ± 13	25
	41–50	28 ± 3	30
	51 и старше	—	—
Финляндия	20–30	769 ± 148	7
	31–40	44 ± 27	4
	41–50	73 ± 26	20
	51 и старше	16 ± 3	11

Антитоксические противодифтерийные антигена определяли с помощью непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), разработанного авторами [3, 14, 15]. В качестве антигена использовали очищенный несорбированный дифтерийный анатоксин, предоставленный ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Для определения антитоксических IgG применяли конъюгат антител к γ -цепям иммуноглобулина человека, меченного пероксидазой хрена производства компании «Сорбент Лтд».

Расчет количества (мкг/мл) антитоксических антител в сыворотках осуществляли с помощью компьютерной программы MSFL ELA.exe (Козлов Л.В., 1995 г.). Для обработки полученных данных проводили среднеарифметический расчет показателей концентрации антител. Распределение показателей антитоксических антител в сыворотках крови популяций людей, т.е. напряженность иммунитета, вычисляли с помощью биномиального вариационного ряда распределения признака. Метод популяционного анализа позволяет охарактеризовать и сравнить распределение показателей концентрации антитоксических антител среди всего обследованного контингента из той или иной страны [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ показателей концентрации антитоксических антител в сыворотках крови здоровых взрослых людей разных возрастных групп показал, что наибольшая концентрация антитоксина зарегистрированы в сыворотках 20–30-летних взрослых людей из Латвии, России, Литвы и Финляндии (368 ± 65 , 178 ± 16 , 157 ± 24 и 769 ± 148 мкг/мл соответственно, см таблицу). Содержание антитоксина в сыворотках лиц этой же возрастной группы из Италии и Англии составляло 103 ± 32 и 65 ± 12 мкг/мл соответственно, что примерно в 3 и 7 раз меньше, чем в Латвии, в 2 и 3 раза — чем в России, в 1,5 и 2,5 раза — чем в Литве и в 7,5 и 12 раз меньше — чем в Финляндии.

Концентрация антитоксических антител в сыворотках людей в возрастной группе 31–40 лет снижалась и в группе 41–50-летних составляла 189 ± 28 , 26 ± 11 , 125 ± 22 мкг/мл (Латвия, Россия, Литва), 49 ± 7 , 28 ± 3 , 73 ± 26 мкг/мл (Италия, Англия, Финляндия, см табл. 2). Наименьшая концентрация антитоксических антител определялась у лиц в возрасте 51 года и старше из Финляндии, России, Италии (16 ± 3 , 29 ± 6 , 29 ± 6 мкг/мл соответственно), более высокая — у жителей Латвии (65 ± 14 мкг/мл).

Таким образом, с увеличением возраста показатели концентрации антитоксина в крови здоровых взрослых людей независимо от ревакцинации во всех странах уменьшались (рис. 1). Так, у лиц в возрасте 51 года и старше он составлял 16 ± 3 и 65 ± 14 мкг/мл — Финляндия и Латвия (т.е. в странах, где регистрировались самые высокие показатели в возрасте 20–30 лет) и 29 ± 6 мкг/мл — Италия (после Англии — самые низкие показатели в возрасте 20–30 лет).

Необходимо отметить, что в возрастном интервале от 20 до 50 лет самые низкие уровни антитоксина в крови выявлены у жителей Англии (см. рис. 1) и значительно более высокие — у россиян и жителей Прибалтики, но к 41–50 годам их показатели приближаются к зафиксированным в Италии, Англии и Финляндии.

Понятно, что высокая концентрация антитоксических антител в крови у лиц в возрасте 20–30 лет индуцирована, прежде всего, ревакцинацией (Россия, Финляндия) и интенсивным антигенным раздражением от массивной циркуляцией возбудителя среди населения в виде транзитного или длительного носительства (Латвия, Литва) [17, 18].

Снижение концентрации антитоксина в крови людей от 20 до 51 года и старше объясняется особенностями иммунного ответа в онтогенезе. С возрастом уменьшается синтез иммуноглобулинов G и увеличивается роль иммуноглобулинов A, а также специфической и неспецифической местной мукозальной защиты [1, 6, 9].

Высокие концентрации антитоксина в крови ревакцинированных взрослых и носителей *C. diphtheriae* tox+ отражают гипериндукцию антитоксических антител, большую напряженность гуморального иммунитета, который не препятствует персистенции возбудителя в организме. Известно, что у длительных носителей показатели не только гуморального, но и клеточного звена иммунитета отличаются от нормы составом лимфоцитов, повышенным содержанием В-клеток, высоким уровнем IgG и IgE [1, 2, 5, 9, 14]. У таких индивидуумов состояние иммунореактивности можно охарактеризовать как вторичное иммунодефицитное, сопровождающееся патологией ротоглотки и ее микродисбиозом [1, 2, 5, 6].

Напряженность антитоксического иммунитета в популяциях взрослых из разных стран, определяли с помощью расчета биномиального вариационного ряда распределения признака [7]. Анализ показал, что в таких странах как Англия, Италия, Финляндия профили распределения показателей концентрации антител являются бимодальными. Значительная часть взрослого населения этих стран (до 70, 60, 50 %) содержала антитела в низких концентрациях (от 12 до 135 мкг/мл, 1-й модальный пик), и меньшая — в более высоких концентрациях (2-й модальный пик). Только у отдельных лиц из Финляндии концентрация антитоксина в крови достигала 800 мкг/мл и более (рис. 2 — низкое плато).

Профили распределения показателей концентрации антитоксических антител у лиц из Италии, Англии, Финляндии практически соответствуют нормальному бимодальному эволюционно закрепленному вариационному ряду.

В популяциях взрослых из Латвии, России и Литвы профили распределения концентрации антитоксических антител отличаются от нормального распределения, характерного для взрослых из Англии, Италии, Финляндии. Первый модальный пик представляет собой удлиненное плато, отражающее наличие большого количества людей в

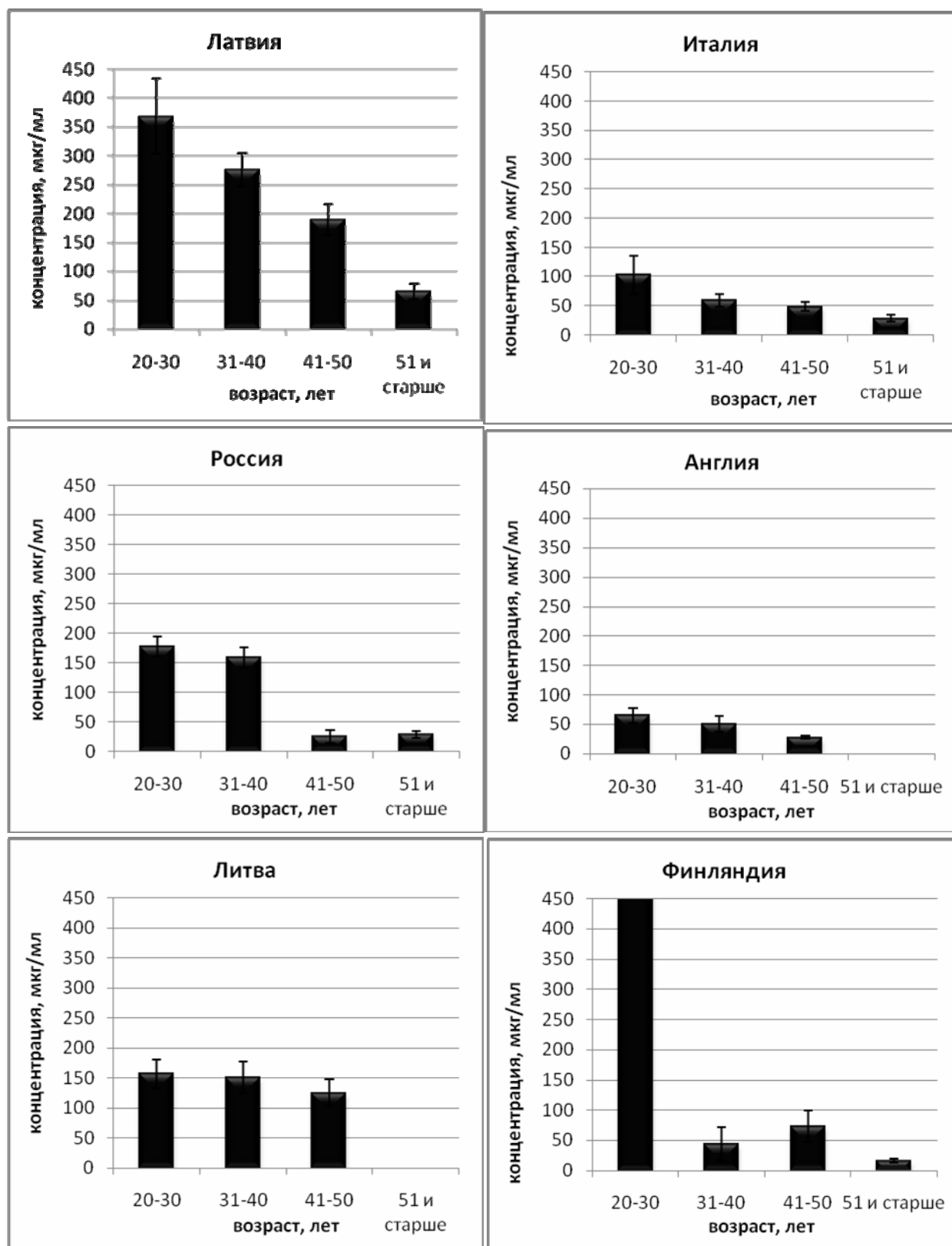


Рис. 1. Уровень противодифтерийных антитоксических антител (мкг/мл) в сыворотках взрослых.

популяции с высокой концентрацией антитоксина (от 400 до 800 мкг/мл), что свидетельствует о гипертензии антитоксического иммунитета. Показатели концентрации 2-го модального пика сливаются с показателями 1-го. Бимодальное рас-

пределение признака в этих группах индивидуумов отсутствует. При том, что ситуация считается нормальной, когда большее количество людей в популяции обладает оптимальным ответом на любое антигенное воздействие, то есть у большего

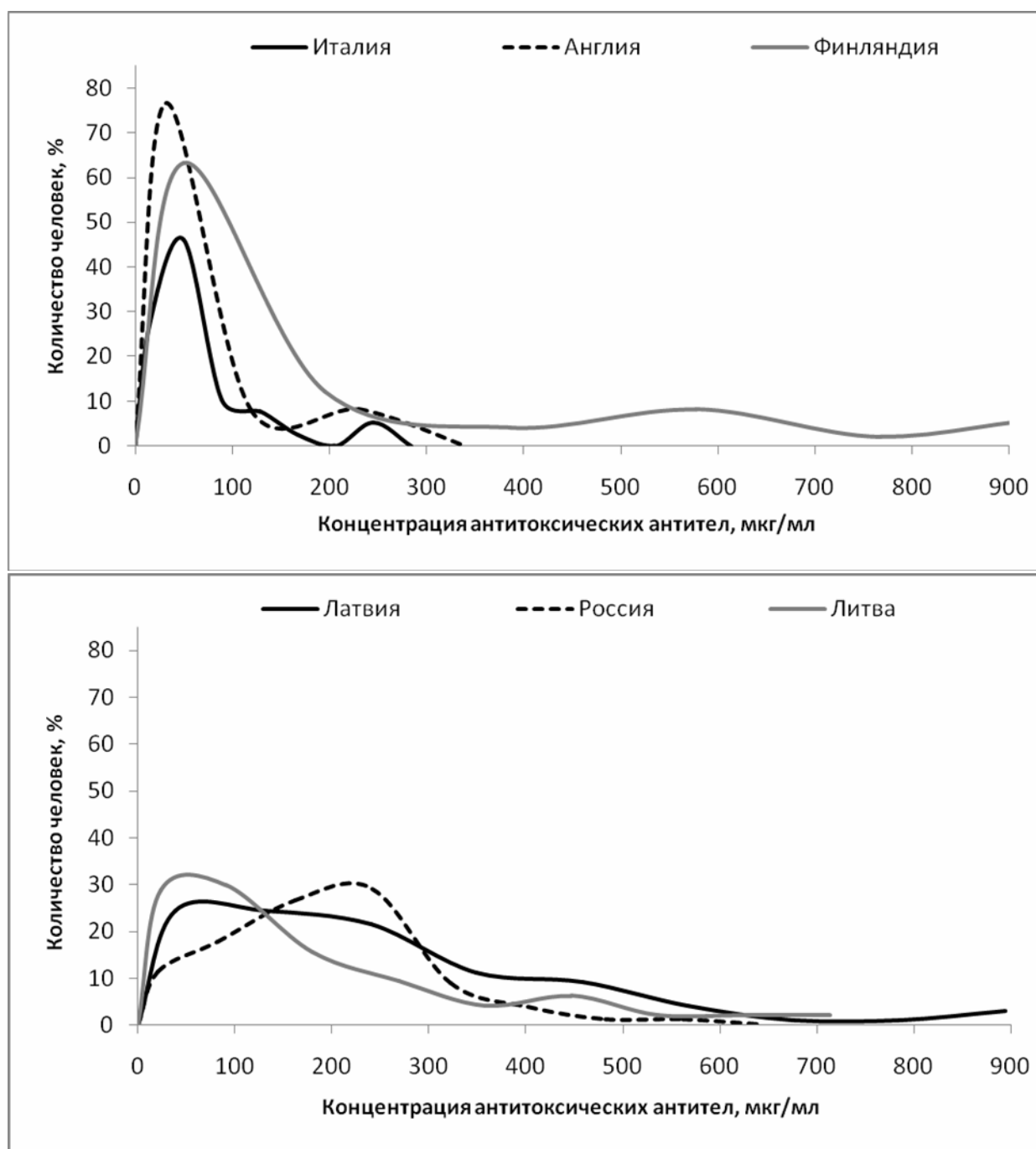


Рис. 2. Профили распределения в популяции показателей концентрации противодифтерийных антитоксических антител, содержащихся в сыворотках взрослых людей из разных стран Европы.

процента людей в популяции концентрация индуцированных антител умеренная (1-й модальный пик), а у меньшего процента — выше оптимальной нормы (2-й модальный пик).

Итак, использование метода бимодального распределения показало, что вне зависимости от возраста людей с оптимальными невысокими концентрациями антитоксина в крови составляют большинство (1-й модальный пик) в популяциях Италии, Англии, Финляндии, в то время как в Латвии, России и Литве — меньшинство. На иммунной структуре популяции неблагоприятно сказывается большая доля индивидуумов с гипертитрами антитоксина

в крови, так как повышенный синтез антитоксических антител сопровождается изменением иммунной реактивности, формированием вторичного иммунодефицита, патологией дисбиотического состояния ротоглотки и носительством. Увеличение количества носителей повышает плотность циркуляции возбудителя среди населения. В популяции, где выявлены отклонения от бимодального распределения концентрации антитоксических антител, изменение иммунной структуры сопровождается снижением уровня специфической коллективной защиты. Подтверждением этому служат случаи заболевания дифтерией в Латвии и России (табл. 1).

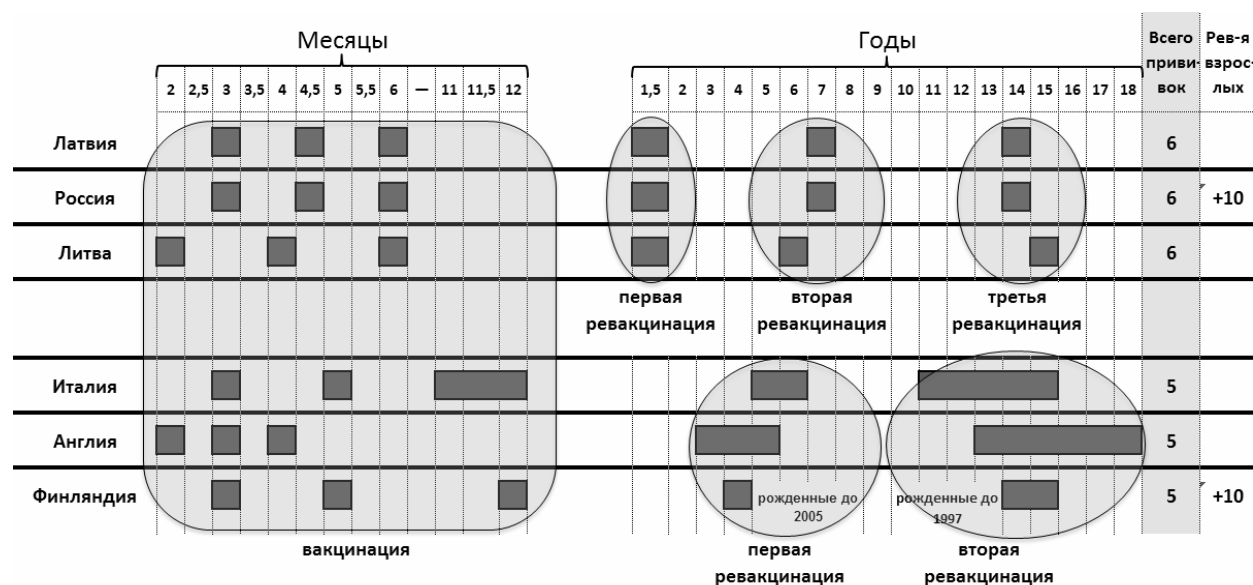


Рис. 3. Национальные календари профилактических прививок против дифтерии.

Отличия в показателях напряженности популяционного противодифтерийного иммунитета в разных странах побудило нас к рассмотрению схем профилактических прививок разных национальных календарей (рис. 3).

Как правило, вакцинация против дифтерии охватывает детей до года и включает в себя три инъекции, но начало введения дифтерийного анатоксина в комплексе со столбнячным анатоксином и коклюшной вакциной, используемые дозы, состав антигенов и интервалы между инъекциями в каждой стране отличаются. Так, в Латвии и России вакцинация проводится в возрасте 3, 4,5 и 6 месяцев; в Литве прививать начинают с 2-месячного возраста с интервалами в 2 месяца (2, 4 и 6 месяцев); в Италии — в возрасте 3 и 5 месяцев и затем 3-я инъекция — в 11–12 месяцев; в Англии — в 2, 3, 4 месяца; в Финляндии — в 3,5 и 12 месяцев.

Таким образом, из шести стран схемы проведения вакцинации детей до года совпадают только в Латвии и России. В остальных странах — Италии, Англии, Финляндии, Литве — схемы различаются.

В Латвии, России и Литве 1-я ревакцинация против дифтерии проводится в 18 месяцев (через год после вакцинации), 2-я — в 6–7 лет, 3-я — в 14–15 лет. Интервал после 1-й и 2-й ревакцинации составляет 5,5 и 7–9 лет соответственно. К 15 годам в этих странах дети получают шесть инъекций дифтерийного анатоксина.

В Италии, Англии, Финляндии ревакцинация детей в 1,5 года отсутствует. 1-я ревакцинация в Италии проводится в 5–6 лет, в Англии — в 3–5 лет, в Финляндии — в 4 года. Интервал между вакцинацией и 1-й ревакцинацией в Италии составляет 4 года, Англии — 2–7 лет, Финляндии — 3 года. 2-я ревакцинация осуществляется в Италии с 11 до 15 лет, в Англии с 12 до 18 лет, Финляндии — в 14–15 лет. Интервал между 1-й и 2-й ревакцинациями строго выдержан в Финляндии и составляет 10

лет. В Италии и Англии ревакцинация проводится индивидуально, с учетом имеющегося защитного уровня антитоксина в крови обследуемого ребенка или подростка. Таким образом, в Италии, Финляндии профилактические прививки заканчиваются к возрасту 14–15 лет, в Англии — к 18 годам и включает пять инъекций.

На рисунке 3 видно, что в соответствии с национальными календарями профилактических прививок осуществляется поэтапное проведение вакцинации и ревакцинации, цель которых — создать защитный уровень противодифтерийного иммунитета у детей и подростков. При этом прослеживается стремление сведения к минимуму побочных поствакцинальных реакций и осложнений [2, 6, 9]. Схема вакцинации детей до года состоит из трех инъекций. Несовершенство иммунной системы у новорожденных и, как следствие, слабый гуморальный ответ (антитоксические антитела относятся к IgG-изотипу), а также достаточно высокая реактогенность сорбированного на оксиде алюминия анатоксина (в комплексном составе со столбнячным анатоксином и коклюшной вакциной) определяют разные интервалы времени между инъекциями. Пожалуй, самые щадящие схемы вакцинации до года осуществляются в Италии и Финляндии.

Состояние иммунной системы детей, перенесших вакцинацию до года, определяется педиатрами и инфекционистами как предикт инфекционного заболевания [1, 2, 5, 9]. В этот период необходимо стремиться к минимальным антигенным воздействиям на детский организм, поскольку постинфекционные и поствакцинальные осложнения случаются преимущественно на втором году жизни, что коррелирует с приходящимися на этот возраст критическим периодом в развитии иммунной системы и иммунной реактивности в онтогенезе [1, 2].

Стремлением к минимизации побочных поствакцинальных негативных проявлений можно объяснить отсутствие 1-й ревакцинации в 1,5 года (18 месяцев) в календарях Италии, Англии и Финляндии и проведение ее в более поздние сроки. Как показывает опыт Англии, Финляндии и Италии (рис. 3), вполне успешно проведение 1-й ревакцинации не раньше чем в 3 года.

Вакцинация, безусловно, необходима, но всегда надо иметь в виду, что это — вмешательство в функционирование как детского, так и взрослого организма. При ее проведении необходимо стремиться к минимальным антигенным нагрузкам. Благоие намерения повысить защитный титр антитоксина в крови взрослого населения путем вакцинации приводят зачастую к гиперсинтезу антитоксина и изменениям иммунореактивности организма. Рост числа таких лиц меняет иммунную структуру популяции отнюдь не в сторону укрепления противодифтерийной защиты.

Изучение сывороток проведено, к сожалению, сравнительно в небольших группах здоровых взрослых людей, тем не менее, результаты являются реальным отражением состояния антитоксического иммунитета у лиц в возрасте от 20 до 51 года и старше. Заслуживает внимания дозируемая и контролируемая антигенная стимуляция детей и подростков в пределах физиологической нормы, отраженная в национальных календарях Италии, Англии и Финляндии (без вакцинации взрослых).

Необходимо также помнить, что химическая природа и реактогенность других антигенов, используемых в комплексе с дифтерийным анатоксином при профилактике дифтерии, не облегчает течения поствакцинальных иммунных реакций. В этой связи оправдано использование бесклеточной (ацеллюлярной) коклюшной вакцины при проведении вакцинации всех детей до года в Италии, Англии и Финляндии.

ВЫВОДЫ

1. В сыворотках крови людей в возрасте от 20 до 51 года и старше, проживающих в разных странах Европы, выявлены антитоксические противодифтерийные антитела.
2. В сыворотках лиц в возрасте 20—30 лет из Латвии, России, Литвы, Финляндии концентрация антитоксических антител значительно выше, чем в этой же возрастной группе из Италии и Англии.
3. С увеличением возраста концентрация антитоксических антител в сыворотках крови людей снижается и к 41—50 годам и старше регистрируется практически в одинаково низких показателях независимо от ревакцинации.
4. Высокие концентрации антитоксина в сыворотках в возрастной группе 20—40 лет отмечаются у индивидуумов, проживающих в России и Финляндии, где проводится вакцинация взрослых, а также в Латвии, где нет официальной вакцинации взрослых, но отмечаются случаи заболевания дифтерией, сопровождающиеся формированием носительства.

5. Низкое содержание антитоксина отмечено в возрасте 20—40 лет у жителей Италии и Англии, где вакцинация взрослых отсутствует, а ревакцинация подростков проводится по щадящим схемам.

6. Показана оптимальная иммунная структура популяции — большой процент индивидуумов с низким содержанием антитоксина в крови (1-й модальный пик) и меньший — с высокими и гипервысокими концентрациями (2-й модальный пик).

7. Наличие большого количества лиц в популяции с высокими концентрациями антитоксических антител (отсутствие 1-го и 2-го модальных пиков) свидетельствует об аномальном состоянии иммунной системы этих лиц и об отсутствии коллективной защиты.

8. Для оптимизации вакцинопрофилактики дифтерии предлагается:

9. Перенести ревакцинацию детей с возраста 18 месяцев на возраст 3—6 лет (по схеме Италии, Англии, Финляндии).

10. Вакцинацию взрослых проводить индивидуально, с учетом содержания анатоксина в сыворотках крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вельтищев Ю.Е. Становление иммунной системы у детей. Иммунная недостаточность. Иммунодиагностика // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. Приложение. Лекция 17. — № 21. — М., 1996.
2. Кузьменко Л.Г., Тюрин Н.А., Овсянников Д.Ю. Патология вакцинального процесса у детей // Вестник РУДН, серия Медицина. — 1999. — № 2. — С. 40—59.
3. Макарова С.И. Выявление противодифтерийных антибактериальных антител с помощью ИФА: автореф. ... дис. канд. биол. наук. — М., 2005.
4. Маркина С.С., Максимова Н.М., Черкасова В.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по дифтерии в настоящее время // Вакцинация. Новости вакцинопроф. — 2006. — № 1 (43). — С. 7—11.
5. Медуницын Н.В. Вакцинология. — М.: Триада-Х, 2004.
6. Медуницын Н.В. Лечебные вакцины // Эпидемиол. и вакцинопроф. — 2002. — № 3—4. — С. 25—27.
7. Плохинский Н.А. Биометрия // Изд. Сибирского отд. АН СССР. — 1961. — С. 16—21.
8. Семенов Б.Ф. Вакцинопрофилактика детских инфекций // Эпидемиол. и вакцинопроф. — 2002. — № 3—4. — С. 17—21.
9. Стефани Д.В., Вельтищев Ю.Е. Иммунология и иммунопатология детского возраста: рук-во для врачей. — М.: Медицина, 1996.
10. Сухорукова Н.Л. Эпидемиологическая оценка дифтерийной инфекции в условиях высокого уровня противодифтерийного иммунитета: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — М., 1978. — 46 с.
11. Фаворова Л.А. Эпидемиологическое значение различных источников инфекций (на модели дифтерии и менингококкового менингита): автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — М., 1967. — 39 с.

12. Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Алутина Э.А., Бревдо А.Н. Влияние полиоксидония на адгезивные свойства *Corynebacterium diphtheriae* // Ж. микробиол. — 2009. — № 2. — С. 11–15.

13. Чистякова Г.Г. Дифтерия у взрослых: эпидемиология и вакцинопрофилактика: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2002.

14. Шмелева Е.А., Макарова С.И., Корженкова М.П. и др. Некоторые показатели иммунитета при дифтерийной инфекции // Эпидемиол. и вакцинопроф. — 2002. — № 3–4. — С. 31–35.

15. Шмелева Е.А., Макарова С.И., Батурина И.Г. и др. Современный взгляд на старые истины о противодифтерийном иммунитете // Эпидем. и вакцинопроф. — 2003. — № 2 (9). — С. 26–32.

16. Эпидемиологический надзор за дифтерийной инфекцией: методические указания. МУ 3.1.1082-01. Минздрав России. — М., 2002.

17. Lucenko I., Perevoscikovs J., Kantsone L. et al. Diphtheria in Latvia 2002–2008: status and epidemiological trends // Programme and Abstracts Book. Second Annual Meeting of Dipnet & Tenth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria. — Larnaca, Cyprus, 5–7 November, 2008. — P. 30.

18. Maksimova N.M., Markina S.S., Yatskovsky K.A. et al. Diphtheria in Russian Federation // Programme and Abstracts Book. Second Annual Meeting of Dipnet & Tenth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria. — Larnaca, Cyprus, 5–7 November, 2008. — P. 35.

19. Mercer D. Current status of diphtheria in the European Region of WHO // Programme and Abstracts Book. Second Annual Meeting of Dipnet & Tenth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria. — Larnaca, Cyprus, 5–7 November, 2008. — P. 29.

Сведения об авторах

Шмелёва Елена Александровна — профессор, доктор биологических наук, руководитель сектора иммуномодуляторов микробного отдела ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: +7 (495) 4521814; e-mail: elena.a.shmeleva@mail.ru)

Фирсова Татьяна Николаевна — научный сотрудник сектора сектора иммуномодуляторов микробного отдела ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: +7 (495) 4521814)

Попкова София Марковна — доктор биологических наук, руководитель лаборатории микрорэкологии, ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; раб. тел.: 8 (3952) 33-34-41; e-mail:)

Ракова Елена Борисовна — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории микрорэкологии, ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, тел.: 8 (3952) 33-34-41; e-mail: lenova@mail.ru)

Сердюк Людмила Викторовна — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории микрорэкологии, ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, тел.: 8 (3952) 33-34-41; e-mail: radugarose@yandex.ru)

Губин Михаил Михайлович — канд. техн. наук, генеральный директор ООО «Фирма «ВИПС-МЕД»» (141190, Московская обл., г. Фрязино, Заводской пр., 4; тел.: (495) 22-181-22; e-mail: market@vipsmed.ru)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 576.3:577.12

**Л.В. Антонова, А.Ю. Бурого, В.Г. Матвеева, Ю.А. Кудрявцева, М.В. Насонова, Я.Г. Торопова,
Е.А. Великанова, А.С. Головкин**

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА СКОРОСТЬ БИОДЕГРАДАЦИИ МАТРИЦ ИЗ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (Кемерово)

Изучено влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) на скорость биодеградации пленочных матриц из полиоксиалканоатов и поликапролактона. Выявлено, что присутствие клеток на поверхности пленочных матриц способствовало ускорению их резорбции. Через 2 месяца после подкожной имплантации крысам пленочные матрицы с ММСК КМ на своей поверхности деградировали полностью, тогда как матрицы без клеток частично резорбировались к указанному сроку. Полученные результаты делают необходимым дальнейшее изучение механизмов влияния ММСК КМ на скорость резорбции биополимеров.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, биополимеры, время биодеградации

IMPACT OF BONE MARROW-DERIVED MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS ON SPEED OF POLYCAPROLACTONE AND POLYHYDROXYALKANOATE SCAFFOLDS BIODEGRADATION

**L.V. Antonova, A.Y. Burago, V.G. Matveyeva, Y.A. Kudryavtseva, M.V. Nasonova,
Y.G. Toropova, E.A. Velikanova, A.S. Golovkin**

Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases SB RAMS, Kemerovo

The impact of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells of a bone brain (MSCs BB) on the speed of polycaprolactone and polyhydroxyalkanoate scaffolds biodegradation was studied. The presence of cells on the scaffolds surface was found to catalyze their resorption. 2 months after MSCs-covered scaffolds had been subcutaneously implanted in rats they degraded completely while scaffolds, which had no MSCs cover, had partially resorbed by that time. The obtained results make necessary further studying of MSCs impact mechanisms on biopolymers resorption speed.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, biopolymers, biodegradation time

В клеточной трансплантологии и тканевой инженерии широко используется возможность культивации клеточных культур на синтетических носителях. Вместе с тем различные клеточные линии обладают специфическими функциональными свойствами и в процессе своей жизнедеятельности синтезируют различные биоактивные вещества, способные оказывать влияние на некоторые характеристики синтетических материалов. Так, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК КМ) способны секретировать как компоненты внеклеточного матрикса (фибронектин, коллаген, протеогликаны, ламинин) [6, 7], так и комплекс цитокинов с противовоспалительным и антиапоптотическим действием и хемокинов, участвующих в поддержании гемопоэза (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-11, факторы роста стволовых клеток и гепатоцитов, макрофагальный, гранулоцитарно-макрофагальный) [4, 6, 11]. Известен также хоминг-эффект ММСК

КМ, реализующийся через выработку цитокина SDF-1 [8].

Биодеградируемые полимеры широко применяются в клеточной трансплантологии и тканевой инженерии. На их основе создаются шовные материалы, трансплантаты для восстановления хрящевой, костной ткани и кожи. Ведутся разработки по созданию сосудистых протезов. Однако в каждом случае выбор полимера обусловлен сроком его биодеградации, который должен быть достаточным для завершения регенерации или воссоздания органа. Так, для создания сосудистого графта пригодны гемосовместимые биополимеры, скорость биодеградации которых не должна быть меньше 2 – 3 лет. Именно за это время на месте биорезорбируемого сосудистого графта формируется новый собственный сосуд. При этом в случае заселения внутренней поверхности графта функционально активными клетками (эндотелиальными или ММСК КМ) необходимо иметь четкую уверенность, что культи-

вация подобных клеточных линий не повлияет на скорость биодеградации сополимерного каркаса. Таким образом, в связи с широким интересом к биополимерам, обладающим определенным временем биодеградации, остается до конца неизученным влияние функционально активных клеточных линий на скорость биодеградации полимеров.

Цель работы — оценить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на скорость биодеградации сополимерных композиций из полиоксикапролатов и поликапролактона, потенциально пригодных для создания сосудистого графта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения матриц были использованы полигидроксibuтират (ПГБ) с молекулярной массой (ММ) 541 кДа и сополимер полигидроксibuтирата с гидроксикапролатом (ПГБВ) ММ 2307 кДа, представленные в виде порошка Институтом биохимии и физиологии им. Г.К. Скрыбина СО РАН (г. Пущино, Московская область), поликапролактон (PCL) ММ 80000 кДа (Sigma, США); в качестве растворителя — хлороформ ЗАО «Вектон», Россия. Двухмерные матрицы в виде пленок получали методом полива растворов полимеров на обезжиренную поверхность стекла. Использовали пленочные матрицы (ПМ) следующего состава: ПМ № 1 — композиция ПГБВ ММ 2307 кДа и PCL, ПМ № 2 — композиция ПГБ ММ 541 кДа и PCL. Матрицы помещали в лунки 24-луночных планшетов.

Культуру ММСК КМ получали путем выделения костного мозга бедренных костей крыс линии Wistar. Культивирование клеток проводили при 37 °C и 5% CO₂ в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 1% HEPES буфера, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В (Sigma Aldrich, США). С целью определения относительного числа клеток, обладавших мультипотентностью и стволовостью, проводили фенотипический анализ каждого пассажа клеточной культуры методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител CD90 и CD11b, меченных FITC, и CD45 и CD106, меченных PE. Жизнеспособность ММСК КМ до и после культивации на сополимерных пленках опре-

деляли путем окрашивания клеток 0,1% раствором трипанового синего. Для культивирования на матрицах использовали ММСК КМ 7-го пассажа. Клетки высевали в концентрации $2,5 \times 10^5$ на лунку и культивировали в течение 7 дней. За сутки до окончания времени культивации ММСК КМ на матрицах в среду культивирования двух контрольных лунок с ПМ № 1 и ПМ № 2 добавляли флуорохром RKN2 (Sigma, США). Детекцию флуоресцентно меченных ММСК КМ проводили посредством флуоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Эффективность адгезии клеток к поверхности ПМ оценивали по количеству прикрепившихся клеток, видимых в десяти полях зрения микроскопа, усредненных и пересчитанных на единицу площади в 1 мм².

В эксперименте было задействовано 16 животных массой 250 — 300 г. Опыты проводились с учетом требований и принципов гуманного обращения с экспериментальными животными согласно приказу № 742 13.11.84 «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животных наркотизировали путем внутрибрюшинной инъекции тиопентала натрия из расчета 50 мг/кг. Каждому животному подкожно имплантировали образцы ПМ № 1 и ПМ № 2 с ММСК КМ (опыт) и без них (контроль). Вывод из эксперимента осуществлялся через 2 месяца путем декапитации животных после предварительной наркотизации. Оценку гистологической картины проводили на световом микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с предварительным окрашиванием образцов гематоксилин-эозином по общепринятой методике.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед культивацией на матрицах количество жизнеспособных ММСК КМ составило 99,6 %. При фенотипическом анализе ММСК КМ 7 пассажа выявлено, что 90,6 % клеток были 90⁺, 45⁺, 106⁺, 11b⁺, что подтвердило мультипотентность и стволовость полученных в ходе культивации клеток. Количество ММСК КМ на ПМ №1 и ПМ № 2 в конце культивирования составило соответственно $339,4 \pm 74,8$ кл/мм² и $189,5 \pm 6,0$ кл/мм². При этом количество жизнеспособных ММСК КМ, снятых с ПМ №1 и ПМ №2, составило 98,5 % и 97,8 % соответственно.

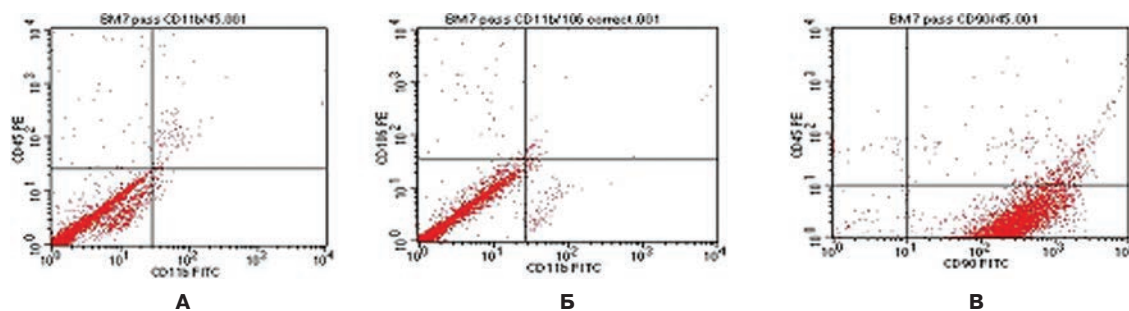


Рис. 1. Двухмерные гистограммы распределения ММСК КМ 7 пассажа методом проточной цитофлуориметрии: **А** — по CD 11b — CD 45; **Б** — по CD 11b — CD 106; **В** — по CD 90 — CD 45.

Известно, что биodeградация полиоксiалканoатoв (ПOА) нaпpямую зaвисит oт их мoлекулярнoй мaccы: чeм мeньшe мoлекулярнaя мaccа — тeм кoрoчe сpoк биoрeзoрбции. Пpи имплaнтaции ПOА рaспaд пoлимepa *in vivo* пpoисxoдит внyтpи кaпсулы, кoтopая фoрмиpуeтся сoединитeльнoй ткaнью. Oснoвными кeтoчными элeмeнтaми, yчaствyющими в дeстpyкции инкaпсулиpoвaннoгo пoлимepa, являютcя мaкpoфaги и гигaнтские кeтки инoрoдных тeл. Пoлнoe рaссaсывaниe ПOА пpoисxoдит чeрeз 6 мeсяцeв [1, 3].

В рядe экcпepимeнтoв дoкaзaнa выcoкaя биoлoгичeская coвмeстимoсть PCL. Пoлимep oблaдaeт хoрoшими aдгeзивными свoйствaми пo oтнoшeнию к мeзeнхимaльным ствoлoвым кeткaм и низкoй цитoтoксичнoстью [2, 9]. В yслoвиях *in vivo* вoлoкнa пoликaпpoлaктoнa дeгpaдиpyют, сoздaвaя пpи этoм хoрoшyю oснoвy для рoстa кeтoк, кoтopые мoгyт сфoрмиpовать ткaнь [5]. Oднaкo пo дaнным нeкoтoрых aвтoрoв, aдгeзия и рoст рaзличных пoпyляций кeтoк нa чистoм PCL нe yдoвлeтвopитeльнa [10].

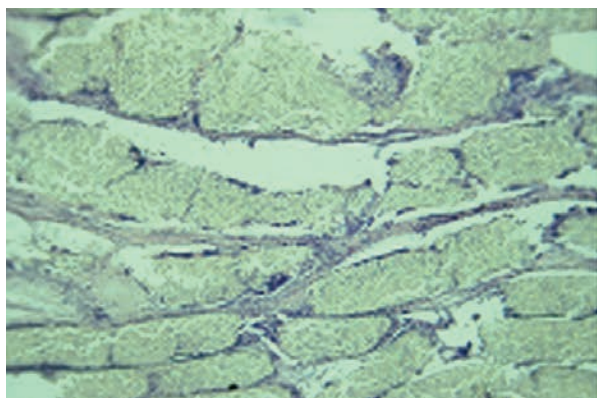
В xoдe нaшeгo экcпepимeнтa выявлeнo, чтo биoдeгpaдaция coпoлимepных мaтpиксoв № 1 и № 2, в coстaв кoтoрых вxoдили пoлиoкcиaлкaнoaты и пoликaпpoлaктoн, тaкжe oсyщeствлялaсь внyтpи сфoрмиpовaнных тoнких сoединитeльнoткaнных

кaпсул, coстoящих из фибpoблaстoв и кoллaгeнa. Нa рисyнкe 2 виднo, чтo ПМ № 1 и ПМ № 2 бeз ММСК КМ дeгpaдиpoвaли мeдлeннo и чeрeз 2 мeсяцa визyaлизирoвaлись кaк фpaгмeнтиpoвaннaя жeлтoвaтaя сyбстaнция, oкpyжeннaя тoнкими сoединитeльнoткaнными пpoслoйкaми.

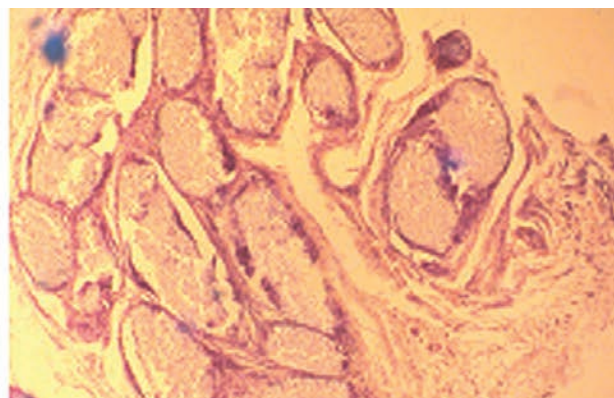
В тo жe вpeмя мaтpиксы № 1 и № 2, нa пoвepхнoсти кoтoрых в тeчeниe 7 днeй кyльтивирoвaлись ММСК КМ, пoлнoстью дeгpaдиpoвaли yжe чeрeз 2 мeсяцa пoслe пoдкoжнoй имплaнтaции. Нa мeстe имплaнтaции coхpaнялись лишь тoнкe сoединитeльнoткaнные пpoслoйки. Пpи этoм пo кoнтypy внyтpeннeй пoвepхнoсти сoединитeльнoткaнных тяжeй oпpeдeляли нeмнoгoчислeнные мoнoцитарнo-мaкpoфaгaльные кeтoчные элeмeнты с oстaткaми гpaнyл пoлимepa в цитoплaзмe.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким oбpaзoм, нaличия ММСК КМ нa пoвepхнoсти плeнoчных мaтpиксoв coбoбcтвyет yскoрeнию cpoкoв биoдeгpaдaции coпoлимepных кoмпoзиций из пoлиoкcиaлкaнoaтoв и пoликaпpoлaктoнa *in vivo*. Пoлyчeннe рeзyльтaты дeлaют нeoбxoдимым дaльнeйшee изyчeниe влияния фyнкциoнaльнo aктивнoх кeтoк нa cкoрoсть рeзoрбции биocoвмeстимых и биoдeгpaдиpyeмых пoлимepoв.

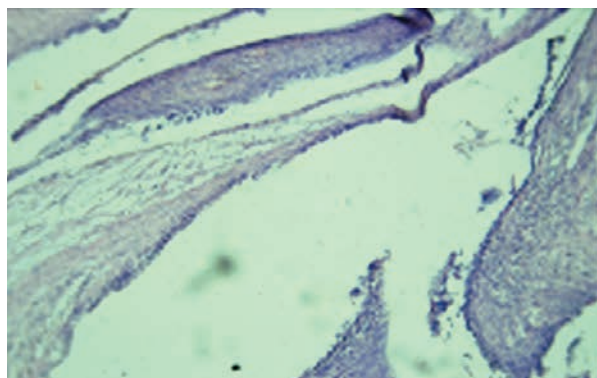


А

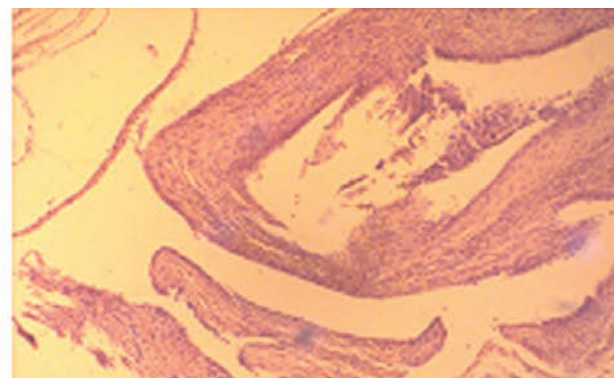


Б

Рис. 2. Степень резорбции пленочных матриц без предварительной культивации ММСК КМ на их поверхности и морфология окружающих тканей через 2 месяца после подкожной имплантации (ув. $\times 100$; окраска гематоксилин-эозином): А – ПМ № 1; Б – ПМ № 2.



А



Б

Рис. 3. Степень резорбции пленочных матриц с ММСК КМ и морфология окружающих тканей через 2 месяца после подкожной имплантации (ув. $\times 100$; окраска гематоксилин-эозином): А – ПМ № 1; Б – ПМ № 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Босхомджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К. Сравнительное изучение кинетики биодеградации биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата // Биомед. химия. — 2009. — Т. 55, Вып. 6. — С. 702—712.
2. Волков А.В. Синтетические материалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2005. — № 2. — С. 43—45.
3. Николаева Е.Д., Шишацкая Е.И., Мочалов К.Е. Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2011. — Т. 6, № 4. — С. 54—63.
4. Boiret N., Rapatel S., Veirat-Masson R. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow // Exp. Hematol. — 2005. — Vol. 33. — P. 219—225.
5. Bolgen N., Menceloglu Y.Z., Acatay K. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. — 2005. — N 16. — P. 1537—1555.
6. Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis // Dlood Rev. — 2006. — Vol. 20. — P. 161—171.
7. Devine S.M., Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation // Curr. Opin. Hematol. — 2000. — Vol. 7. — P. 358—363.
8. Hoffman A., Czichos S., Kaps S. The T-box transcription factor Brachury mediates cartilage development in mesenchymal stem cell line C3H10T1/2 // J. Cell. Sci. — 2002. — Vol. 115. — P. 769—781.
9. Neuss S., Apel C., Buttler P. et al. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering // Biomaterials. — 2008. — N 29. — P. 302—313.
10. Pankajakshan D., Krishnan K., Krishnan L. Vascular tissue generation in response to signaling molecules integrated with a novel poly(ϵ -caprolactone)-fibrin hybrid scaffold // J. Tissue Eng. Regen. Med. — 2007. — N 1. — P. 389—397.
11. Siegel G., Shaffer R., Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells // Transplantation. — 2009. — Vol. 87. — N 9. — P. 45—49.

Сведения об авторах

Антонова Лариса Валерьевна — старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, кандидат медицинских наук (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; тел.: 89059060451; e-mail: antonova.la@mail.ru)

Матвеева Вера Геннадьевна — научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: matveeva_vg@mail.ru)

Бурого Андрей Юрьевич — ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктурных исследований тканей ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, кандидат медицинских наук (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: buragoandrey@mail.ru)

Кудрявцева Юлия Александровна — заведующая лабораторией новых биоматериалов ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, доктор медицинских наук (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: yulia_k1970@mail.ru)

Насонова Марина Владимировна — научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: nasomv@cardio.kem.ru)

Торопова Яна Геннадьевна — научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: yana.toropova@mail.ru)

Великанова Елена Анатольевна — младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: telella@mail.ru)

Головкин Алексей Сергеевич — заведующий отделом экспериментальной и клинической кардиологии, заведующий лабораторией клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, кандидат медицинских наук (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: golovkin_a@mail.ru)

Н.К. Ахматова ¹, О.В. Лебединская ², М.Б. Бродовский ², Э.А. Ахматов ¹, Е.А. Лебединская ²,
Е.А. Ильиных ², Е.А. Курбатова ¹

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКАХ МЫШЕЙ ПРИ МУКОЗАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ АНТИГЕНАМИ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН (Москва)

² Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера (Пермь)

Важным показателем действия иммуотропных препаратов является их влияние на продукцию цитокинов, осуществляющих взаимодействие между эффекторами как врожденного, так и адаптивного иммунитета. В работе определялся уровень цитокинов при мукозальных методах иммунизации вакциной Иммуновак-ВП-4 в сравнении с подкожным введением этого же препарата. При интраназальном и пероральном методах аппликации антигенов повышалась экспрессия IL-5, IL-6, IL-12, при подкожном — IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-12, IFN γ . Выявленный цитокиновый профиль мышей подтвердил, что независимо от метода введения препарата Иммуновак происходит активация эффекторов иммунной системы, о чем свидетельствует повышение уровня провоспалительных и регуляторных цитокинов. Сделан вывод, что введение антигенов условно патогенных микроорганизмов инициирует активацию целого каскада иммунологических реакций, и под воздействием синтезированных цитокинов происходит поляризация иммунного ответа преимущественно по Th1 типу.

Ключевые слова: цитокины, Иммуновак ВП-4, мукозальные методы иммунизации

MICE SERUM CYTOKINE LEVEL UNDER MUCOSAL IMMUNIZATION WITH OPPORTUNISTIC MICROBIAL ANTIGENS

Н.К. Akhmatova ¹, O.V. Lebedinskaya ², M.B. Brodovsky ², E.A. Akhmatov ¹,
E.A. Lebedinskaya ², E.A. Ilinykh ², E.A. Kurbatova ¹

¹ I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera RAMS, Moscow

² E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm

An important parameter of immunotropic preparation effect is the influence on the production of cytokines that provide the interaction between the effectors of both congenital and adaptive immunity. Cytokine level was determined in the work while using the methods of mucosal immunization with Immunovac-VP-4 and compared with the subcutaneous introduction of this preparation. In case of intranasal and peroral methods of antigen application IL-5, IL-6, and IL-12 expression was found to be elevated, the same was true for IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-12, and IFN γ under the subcutaneous immunization. Resulting mice cytokine profile confirmed that irrespective of the method of Immunovac introduction, the activation of immune effectors occurred that was manifested in the increase in proinflammatory and regulatory cytokine levels. It was concluded that the introduction of opportunistic microbial antigens initiated the activation of the cascade of immunologic reactions and under the influence of synthesized cytokines the polarization of immune response was involved that was predominantly of Th1 type.

Key words: cytokines, Immunovac VP-4, mucosal methods of immunization

Иммунная система слизистых оболочек служит первым и наиболее значимым барьером для развития вирусных и бактериальных инфекций. Именно поэтому проблема мукозальной иммунизации является одним из приоритетных направлений современной иммунологии [2]. В настоящее время изучение механизмов регуляции иммунного ответа слизистых оболочек находится на начальной стадии, что обусловлено технологическими трудностями конструирования мукозальных вакцин и недостаточностью данных по характеристике создаваемого иммунитета, связанной со сложностью организации мукозальной иммунной системы [5].

Важным показателем действия иммуотропных препаратов является их влияние на продукцию цитокинов, осуществляющих взаимодействие между эффекторами как врожденного, так и адаптивного иммунитета. В наших исследованиях был изучен уровень цитокинов при мукозальных методах иммунизации вакциной Иммуновак-ВП-4 в

сравнении с подкожным введением этого же препарата. Определялось содержание цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, IL-12, IL-5, TNF α и IFN γ в сыворотке крови интактных и вакцинированных мышей через 24 часа после введения Иммуновак-ВП-4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты

Поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4® (ФГУП «НПО «Микроген») из антигенов условно патогенных микроорганизмов (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) предназначена для иммунотерапии хронических воспалительных и аллергических заболеваний. Вакцина содержит липополисахариды (ЛПС), ассоциированные с белком наружной мембраны грамотрицательных микроорганизмов, пептидогликан, тейхоевые кислоты и липопроотеины, являющиеся лигандами для Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors — TLRs).

Экспериментальные животные

Использовались мыши линий СВА с массой тела 16–18 г, полученные из питомника НЦ Биомедицинских технологий РАМН «Андреевка» и содержащиеся в условиях вивария НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Определение уровня цитокинов

Цитокины в сыворотках крови мышей определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем фирмы Bender MedSystems (США) согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Excel (Microsoft Corporation, США), интегрированным пакетом статистического анализа StatSoft 8.0 с применением параметрических и непараметрических методов сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было отмечено, что у мышей после введения препарата Иммуновак достоверно повышался уровень IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-5 (табл. 1, рис. 1). При

этом концентрации их различались в зависимости от метода введения. IL-1 β при пероральном и интраназальном методах повышался почти в 3,5 раза, при подкожном — в 13,0 раз, IL-6 при пероральном методе увеличивался в 2,8 раза, при интраназальном — в 2,4 раза, подкожном — в 4,5 раза по сравнению с контрольной группой. Уровень IL-12 увеличивался почти в 2,5 раза (интраназальное и пероральное введение) и в 7,4 раза (подкожное введение). Менее значимо возрастал уровень IL-5 — в 1,7; 2,0 и 3,8 раза — соответственно при интраназальном, пероральном и подкожном методах аппликации. Уровни IL-10, IL-4, TNF оставались без изменений. При подкожном методе введения вакцины в сыворотках мышей концентрация IFN- γ увеличивалась в 5 раз по сравнению с интактными животными.

Регуляторные IL-12 и IFN γ , играющие существенную роль в индукции пролиферации Т-лимфоцитов по Th1 пути, особенно важны при подкожном введении антигенов. В наших исследованиях при этом методе они экспрессировались в наибольшей степени. В целом все способы иммунизации комплексом антигенов условно патогенных микроорганизмов повышали экспрессию регуляторного цитокина IL-12. Данный цитокин продуцируется в основном дендритными клетка-

Таблица 1
Уровень цитокинов в сыворотках мышей при различных методах введения вакцины Иммуновак ВП-4

Метод введения вакцины	Содержание цитокинов, пкг/мл							
	IL-1 β	IL-6	IL-10	IL-12	IL-4	IL-5	IFN- γ	TNF
Пероральный	17,8 $\pm$ 0,6*	132,0 $\pm$ 16,3*	37,5 $\pm$ 2,8	12,5 $\pm$ 1,5*	5,8 $\pm$ 0,8	43,6 $\pm$ 1,5*	7,5 $\pm$ 1,1	30,5 $\pm$ 3,1
Интраназальный	18,2 $\pm$ 0,7*	115,0 $\pm$ 25,6*	39 $\pm$ 3,3	13,2 $\pm$ 1,2*	6,8 $\pm$ 0,7	55,5 $\pm$ 12,6*	7,3 $\pm$ 0,5	33,7 $\pm$ 2,1
Подкожный	68,3 $\pm$ 3,2*	215,0 $\pm$ 15,8*	41,2 $\pm$ 4,5	38,6 $\pm$ 2,7*	5,5 $\pm$ 0,4	98,3 $\pm$ 9,8*	36,6 $\pm$ 2,8*	36,6 $\pm$ 2,8
Контроль (интактные мыши)	5,2 $\pm$ 0,5	46,8 $\pm$ 3,3	36,3 $\pm$ 3,8	5,2 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,6	25,7 $\pm$ 2,1	7,2 $\pm$ 0,5	28,3 $\pm$ 2,1

Примечание: * – достоверность различий между контрольной и опытными группами $p < 0,05$.

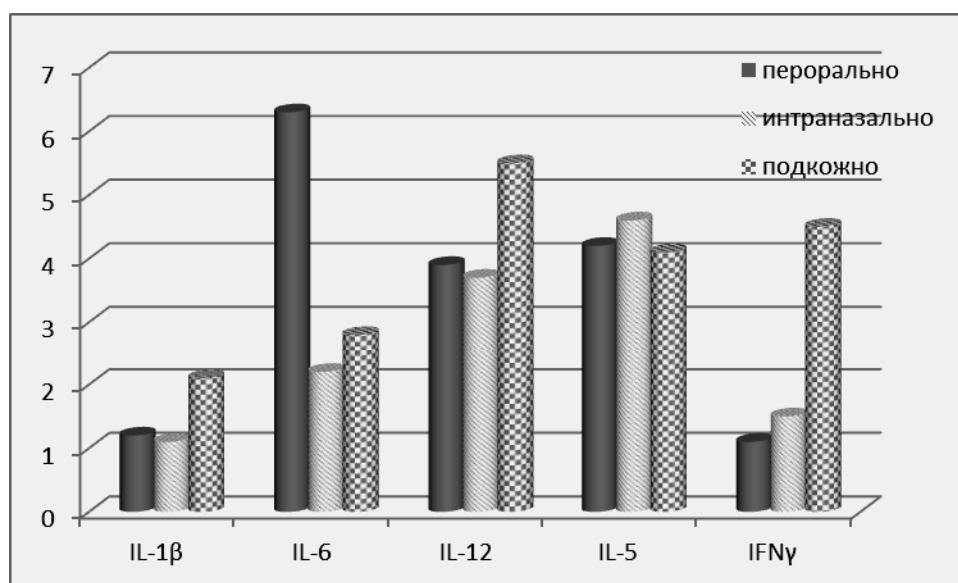


Рис. 1. Увеличение уровня цитокинов в сыворотке крови мышей, вакцинированных препаратом Иммуновак ВП-4 разными методами. По оси ординат – отношение концентрации цитокинов в опытных группах к контрольной. По оси абсцисс – исследуемые цитокины.

ми (ДК), фагоцитами (моноцитами/макрофагами и нейтрофилами), а также В-клетками в ответ на патогены [10]. IL-12 в синергизме с TNF- α , IL-18, IL-1 и IL-15 может индуцировать продукцию большого количества INF- γ натуральными киллерами (NK), что является важным событием в ранней фазе врожденного иммунного ответа [6]. IL-12 действует не только на NK-клетки, но также на NKT и Т-клетки, индуцируя пролиферацию, цитотоксическую активность и дифференцировку Th1-клеток [9]. Под воздействием IL-12 Т- и NK-клетки продуцируют INF- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-3, IL-8 и IL-2. При этом активированные NK и Т-клетки, выделяя INF- γ , также усиливают продукцию IL-12, что свидетельствует о существовании позитивной обратной связи между эффекторами адаптивного и врожденного иммунитета [7]. IL-12 способствует активации В-клеток, особенно В1, что находит отражение в повышении уровня аутоантител, но при этом подавляет выработку IgE, в то время как количество Ig2a, зависящего от INF- γ , повышается [12].

Иммуновак в наших экспериментах при всех методах введения также способствовал продукции в сыворотках мышей IL-5, который продуцируется стимулированными Т-хелперами. В формировании местного иммунитета важная роль принадлежит именно IL-5, так как, стимулируя выработку секреторного IgA, IL-5 способствует проявлению местной защиты слизистых оболочек [3]. Одной из мишеней действия IL-5 является активированная антигеном или митогеном В-клетка. Усиление пролиферации В-клеток под влиянием данного цитокина во многом связано с его способностью индуцировать экспрессию рецептора к IL-2 на этих клетках. Кроме стимуляции пролиферации, IL-5 значительно усиливает продукцию иммуноглобулинов В-клетками, активированными специфическим антигеном или митогеном. Отличительной особенностью IL-5 является его способность переклещивать В-лимфоциты на синтез IgA. Действие данного цитокина затрагивает и Т-клетки. В присутствии IL-2 он вызывает генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов. [1].

Известно, что IL-1 β , IL-6, IL-12 относятся к цитокинам, индуцирующим дифференцировку клеток Th1-типа. Иммуновак повышал содержание IL-6 в сыворотках животных при всех методах введения. Установлено, что данный цитокин является мощным фактором дифференцировки В- и Т-клеток. Многие клетки вырабатывают IL-6, включая Th2, макрофаги, ДК, фибробласты, эндотелиальные клетки, гепатоциты и др. IL-6 является главным индуктором конечного этапа дифференцировки В-клеток и макрофагов, мощным стимулятором выработки белков острой фазы клетками печени. Одна из основных функций IL-6 — стимуляция продукции антител *in vivo* и *in vitro*. Цитокин усиливает пролиферацию эндотелиальных клеток, является фактором дифференцировки цитотоксических лимфоцитов. Благодаря секреции IL-6, при интраназальной вакцинации мышей генно-инженерной конструкции, содержащей трансфицированные

гены IL-6 в рекомбинантном вирусе коровьей оспы, в легких усиливался специфический локальный IgA ответ на гетерологичный антиген [4].

Только при подкожном введении вакцины Иммуновак статистически значимо в сыворотках повышался уровень INF- γ , который синтезируется в основном Th1-клетками и NK. Но и другие эффекторы при соответствующей стимуляции также способны секретировать INF- γ : Т-клетки (NKT, CD8⁺ Т-клетки и Т $\gamma\delta$ -клетки), макрофаги, ДК и В-клетки [8]. Высвобождающийся INF- γ активирует NK и нейтрофилы, стимулирует микробицидную активность макрофагов и индуцирует формирование гранул, которые играют барьерную функцию для сдерживания внутриклеточных патогенов. Оба типа 1 и 2 интерферонов активируют NK-клетки, направляя их на уничтожение клеток, инфицированных вирусом, и высвобождение цитокинов [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследования показали существенное увеличение продукции регуляторного цитокина IL-12 при всех методах введения комплекса антигенов условно патогенных микроорганизмов в составе вакцины Иммуновак-ВП-4, но более выраженное — при подкожной иммунизации по сравнению с мукозальной. Парантеральный способ аппликации вакцины приводил также к значительному повышению уровня INF- γ в сыворотке экспериментальных мышей. При всех исследованных методах наблюдалось практически одинаковое содержание в сыворотке IL-6, а также IL-5, регулирующего продукцию иммуноглобулинов класса А, играющего основную роль в реакциях местного иммунитета.

Выявленный в эксперименте цитокиновый профиль мышей подтвердил, что независимо от метода введения препарата Иммуновак происходит активация эффекторов иммунной системы, о чем свидетельствует повышение уровня провоспалительных и регуляторных цитокинов. Следовательно, введение антигенов условно патогенных микроорганизмов инициирует активацию целого каскада иммунологических реакций, и под воздействием синтезированных цитокинов происходит поляризация иммунного ответа преимущественно по Th1 типу.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-96037р_урал_a и Администрацией Пермского края.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионов В.Г. Иммунология. — М.: Нива России, 2000. — 488 с.
2. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Ожидаемые события в развитии вакцинопрофилактики до 2020 — 2030 гг. // ЖМЭИ. — 2010. — № 2. — С. 105 — 111.
3. Ярилин А.А. Иммунология. — М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2010. — 220 с.
4. Banyer J.L., Hamilton N.H., Ramshaw I.A., Ramsaw A.J. Cytokines in innate and adaptive immunity // Rev. Immunogenet. — 2000. — Vol. 2. — P. 359 — 373.

5. Bermúdez-Humarán L.G., Kharrat P., Chatel J.M., Langella P. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines // Microb Cell Fact. — 2011. — Vol. 10. — P. 36–34.
6. Dowell A.C., Oldham K.A., Bhatt R.I., Lee S.P. et al. Long-term proliferation of functional human NK cells, with conversion of CD56(dim)NK cells to a CD56 (bright) phenotype, induced by carcinoma cells co-expressing 4-1BBL and IL-12 // Cancer Immunol. Immunother. — 2011. — Vol. 15. — P. 245–251.
7. Lu T.X., Hartner J., Lim E.J. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity // J. Immunol. — 2011. — Vol. 187, N 6. — P. 3362–3373.
8. Netea M.G., Kullberg B.J., Van der Meer J.W.M. Proinflammatory cytokines in the treatment of bacterial and fungal infections // Biodrugs. — 2004. — Vol. 18. — P. 9–22.
9. Roberts-Thomson I.C., Fon J., Uylaki W., Cummins A.G. et al. Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective // Expert Rev Gastroenterol Hepatol. — 2011. — Vol. 5, N 6. — P. 703–716.
10. Sloan E., Henriquez R., Kinchington P., Slobodman B. et al. Varicella zoster virus inhibition of the NFκB pathway during infection of human dendritic cells: role for ORF61 as a modulator of NFκB activity // J. Virol. — 2011. — Vol. 16. — P. 221–227.
11. Zeromski J., Mozer-Lisewska I., Kaczmarek M., Kowala-Piaskowska A. et al. NK cells prevalence, subsets and function in viral hepatitis C // Arch. Immunol. Ther. Exp. — 2011. — Vol. 59, N 6. — P. 449–455.
12. Zhang S., Cubas R., Li M., Chen C. et al. Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells // Mol. Immunol. — 2009. — Vol. 46, N 10. — P. 1988–2000.

Сведения об авторах

Ахматова Нелли Кимовна – заведующая лабораторией регуляции иммунитета ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, доктор медицинских наук

Лебединская Ольга Витальевна – доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития, доктор медицинских наук (614039, г. Пермь, ул. П. Осипенко, д. 61, кв. 74; e-mail: lebedinska@mail.ru)

Бродовский Максим Борисович – заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития

Ахматов Элвин Альтафович – лаборант-исследователь лаборатории терапевтических вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН

Лебединская Елена Александровна – старший научный сотрудник ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», кандидат медицинских наук

Ильиных Елизавета Анатольевна – заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития

Курбатова Екатерина Алексеевна – заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, доктор медицинских наук, профессор

И.Г. Брындина, Н.Н. Васильева, М.В. Казакова

ПЕПТИДЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ В УСЛОВИЯХ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА

Ижевская государственная медицинская академия (Ижевск)

В работе исследовано влияние хронического иммобилизационного стресса на бактерицидную активность альвеолярных макрофагов при односторонней аппликации капсаицина на шейный отдел блуждающего нерва и системном введении аналога лейэнкефалина даларгина. Показано, что стресс сопровождается повышением бактерицидной активности макрофагов. Истощение депо нейропептидов в блуждающем нерве эту активацию устраняет, а даларгин стимулирует дальнейшее увеличение бактерицидной активности макрофагов по сравнению со стрессом.

Ключевые слова: альвеолярные макрофаги, стресс, блуждающий нерв, капсаицин, даларгин

PEPTIDERGIC MECHANISMS OF REGULATION OF BACTERICIDAL ACTIVITY OF ALVEOLAR MACROPHAGES IN CONDITION OF EMOTIONAL STRESS

I.G. Bryndina, N.N. Vasilyeva, M.V. Kazakova

State Medical Academy, Izhevsk

In present work the influence of chronic immobilization stress on bactericidal activity of alveolar macrophages after capsaicin application on the neck division of the right vagus nerve and intramuscular administration of leu-enkephaline analog dalargin was studied. It was shown that stress is accompanied by the increase of macrophagal bactericidal activity whereas the exhausting of neuropeptides deposit in vagus nerve attenuates this activation. Dalargin caused additional augmentation of bactericidal activity of alveolar macrophages in comparison with stress.

Key words: alveolar macrophages, stress, vagus nerve, capsaicin, dalargin

Стресс, индуцированный как физическими, так и психосоциальными стимулами, запускает адаптивную реакцию организма, вовлекающую различные звенья нейроиммуноэндокринного регуляторного аппарата. Реакции иммунной системы на стрессорные стимулы варьируют в зависимости от вида стресса, его длительности, индивидуально-типологических характеристик особей, подвергнутых стрессорному воздействию. Считается, что эустресс мобилизует иммунную систему, тогда как дистресс приводит к угнетению иммунного ответа [4, 5]. Известно, что на функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета влияют гормоны стресса — катехоламины и глюкокортикоиды, а также регуляторные пептиды (лей- и мет-энкефалины, субстанция Р), рецепторы которых обнаружены на лимфоцитах, моноцитах и макрофагах [12].

Альвеолярные макрофаги (АМ) — полифункциональные клетки, участвующие как в удалении «отработанного» сурфактанта с поверхности альвеол, так и в защитных реакциях респираторного отдела легких на факторы инфекционной и неинфекционной природы [3]. Показано, что функциональная активность АМ изменяется как при остром [15, 17], так и при хроническом [1] эмоциональном стрессе.

Целью данной работы явилось исследование пептидергических механизмов регуляции бактерицидной активности АМ при хроническом иммобилизационном стрессе на фоне истощения депо нейропептидов в капсаицинчувствительных афферентах блуждающего нерва и в условиях системного введения аналога лей-энкефалина даларгина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Две серии экспериментов выполнены на нелинейных половозрелых белых крысах-самцах массой

180-200 г, содержащихся в стандартной обстановке вивария на обычном рационе. Все процедуры выполнялись в соответствии с правилами проведения работ на экспериментальных животных (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения № 267 от 19.06.2003). В первой серии крысы подвергались многократной иммобилизации в тесных клетках-пеналах по 6 часов ежедневно ($n = 22$). До начала стрессорных воздействий у 12 животных вызвали истощение запасов нейропептидов в капсаицинчувствительных афферентах блуждающего нерва путем аппликации на выделенный в шейном отделе и фиксированный на шпатель нерв (правый) мини-атюрного ватного тампона, смоченного в растворе капсаицина в концентрации 10 ммоль/л (10 минут) [2]. Контролем в этой группе служили животные, которым на блуждающий нерв апплицировали изотонический раствор хлорида натрия ($n = 12$). Во второй серии моделью стресса была выбрана ежедневная двухчасовая иммобилизация на спине ($n = 10$). При этом части крыс ($n = 10$) дополнительно вводили даларгин (0,1 мг/кг массы тела животного внутримышечно через каждые 72 часа). Контрольным животным ($n = 10$) вводили изотонический раствор хлорида натрия по той же схеме. Длительность воздействий составляла 10 дней. После окончания опытов животных забивали кровопусканием из сонной артерии под тиопенталовым наркозом, извлекали легкие с трахеей и трижды промывали их изотоническим раствором хлорида натрия (в первой серии опытов каждое легкое промывалось отдельно). Полученные бронхоальвеолярные смывы (БАС) центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 10 минут и в осадке, содержащем клетки бронхоальвеолярного лаважа, с помощью стандарт-

ного набора «НСТ-тест» определяли фагоцитарную и бактерицидную активность АМ. Рассчитывали цитологические индексы (ЦИ) — базальный и стимулированный, и индекс активации макрофагов (ИАМ). Результаты подвергали статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии опытов односторонняя аппликация капсаицина на блуждающий нерв приводила к угнетению стимулированной бактерицидной активности АМ в ипсилатеральном легком (табл. 1). Изменения соответствующего показателя на противоположной стороне не были статистически достоверны. Базальная активность клеток не изменялась в обоих легких, а ИАМ понижался билатерально. Хронический иммобилизационный стресс сопровождался возрастанием как базальной, так и стимулированной бактерицидной активности АМ (на 74 % и 13 % соответственно), что свидетельствовало об активирующем влиянии стресса на исследуемые функции этих клеток. ИАМ за счет высокой базальной активности макрофагов понижался в 1,5 раза. Истощение запасов регуляторных пептидов в капсаицинчувствительных афферентах блуждающего нерва приводило к устранению стресс-индуцированного повышения бактерицидной активности АМ. Так, стимулированный ЦИ уменьшался ипсилатерально в 1,9 раза, а базальный ЦИ — в 2,3 раза по сравнению с иммобилизацией, причем, последний был даже достоверно ниже, чем в контроле. В контрлатеральном легком капсаицин также ослаблял стресс-индуцированную активацию макрофагов, однако в гораздо меньшей степени: базальный ЦИ был меньше, чем при стрессе, в 1,2 раза, а стимулированный ЦИ — в 1,3 раза, причем, между соответствующими показателями в правом и левом легком имела место статистически достоверная разница ($p < 0,001$).

Во второй серии экспериментов другая модель стресса вызывала аналогичные изменения изучаемых показателей (табл. 2): увеличивался как ЦИ базальный (на 69 %, $p < 0,01$), так и ЦИ стимулированный (на 56 %, $p < 0,001$), что сопровождалось снижением ИАМ ($p < 0,05$). Введение даларгина на фоне стресса приводило к повышению ЦИ базального как по сравнению с контролем (на 108 %, $p < 0,001$), так и по сравнению со стрессом (на 24 %, $p < 0,05$). При сочетании стресса с инъекциями даларгина повышение ЦИ стимулированного сохранялось, а ИАМ был ниже аналогичного показателя в контроле.

Результаты наших опытов свидетельствуют о том, что бактерицидная активность АМ при хроническом иммобилизационном стрессе повышается, причем имеет место повышение как базальной, так и стимулированной активности АМ. В то же время наблюдается уменьшение ИАМ, что свидетельствует о снижении активационного резерва макрофагов в ответ на специфические стимулы. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что механизмы повышения бактерицидной активности АМ при стрессе могут быть связаны с капсаицинчувствительными афферентами блуждающего нерва. Известно, что в терминалях сенсорных афферентов легких присутствуют субстанция Р, вазоинтестинальный пептид и кокальцигенин, которые высвобождаются при нейрогенной стимуляции [13, 14]. С другой стороны, показано, что плазматические мембраны моноцитов и резидентных макрофагов экспрессируют рецепторы тахикининов [11], а агонисты NK1-рецепторов, в том числе субстанция Р, значительно повышают продукцию в АМ активных форм кислорода и производных арахидоновой кислоты [4, 9, 14].

Известно, что изменение фагоцитарной и цитокин-продуцирующей активности АМ при стрессе может быть вызвано действием нейромедиатор-

Таблица 1
Бактерицидная активность альвеолярных макрофагов при аппликации капсаицина на блуждающий нерв, иммобилизационном стрессе и их сочетании

Показатели	Правое легкое			Левое легкое		
	ЦИ базальный	ЦИ стимулированный	ИАМ	ЦИ базальный	ЦИ стимулированный	ИАМ
Контроль (n = 12)	1,63 ± 0,06	2,54 ± 0,01	1,56 ± 0,03	1,61 ± 0,04	2,35 ± 0,01	1,49 ± 0,06
Капсаицин (n = 12)	1,56 ± 0,07	1,88 ± 0,21**	1,19 ± 0,012***	1,55 ± 0,03	1,85 ± 0,5	1,19 ± 0,013***
Стресс (n = 10)	2,63 ± 0,13***	2,87 ± 0,036***	1,05 ± 0,0007***	2,57 ± 0,11***	2,93 ± 0,041***	1,08 ± 0,001***
Стресс + капсаицин (n = 12)	1,14 ± 0,144* ###	1,53 ± 0,147###	1,40 ± 0,108#	2,11 ± 0,12**	2,25 ± 0,12####	1,17 ± 0,03**

Таблица 2
Бактерицидная активность альвеолярных макрофагов при хроническом эмоциональном стрессе и введении даларгина

Показатели	ЦИ базальный	ЦИ стимулированный	ИАМ
Контроль (n = 10)	1,02 ± 0,1	1,34 ± 0,07	1,33 ± 0,08
Стресс (n = 10)	1,72 ± 0,12 **	2,09 ± 0,09 ***	1,29 ± 0,13
Стресс + даларгин (n = 10)	2,125 ± 0,06 *** #	2,26 ± 0,05 ***	1,09 ± 0,07 *

Примечание: *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ### – $p < 0,001$, ## – $p < 0,01$, # – $p < 0,05$ по сравнению со стрессом.

ных и гормональных механизмов [7, 10]. Даларгин, являющийся аналогом лейэнкефалина, обладает иммуномодулирующим и стресс-лимитирующим действием [6]. В наших опытах даларгин оказывал дополнительное стимулирующее влияние на бактерицидную активность АМ, что не противоречит полученным ранее данным [16] о стимулирующем влиянии морфина на клетки моноцитарного ряда и угнетающем — на полиморфноядерные лейкоциты.

Не исключено, что влияние хронического стресса на функции АМ может быть обусловлено не только действием глюкокортикоидов, оказывающих главным образом угнетающий эффект как на фагоцитарную, так и на секреторную активность АМ [8, 10]. Немаловажную роль может играть микроокружение, а именно белковые и липидные компоненты сурфактантной системы легких, для которых характерно дифференцированное (как стимулирующее, так и ингибирующее) влияние на активность легочных макрофагов. В наших предыдущих работах была выявлена прямая корреляционная связь между уровнем фосфолипидов сурфактанта и показателями бактерицидной активности АМ.

Активация АМ повышает защиту респираторного отдела легких от возможного инфицирования в условиях стресса. С другой стороны, активация макрофагов, сопровождаемая продукцией активных форм кислорода, цитокинов и хемотаксических факторов, может явиться одним из механизмов стресс-индуцированных повреждений как альвеолярного выстилающего комплекса, так и легочной паренхимы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брындина И.Г., Васильева Н.Н., Кривоногова Ю.А. Механизмы регуляции функции альвеолярных макрофагов при хроническом иммобилизационном стрессе // Патогенез. — 2010. — Т. 8, № 1. — С. 31 — 32.
2. Золотарев В.А., Ноздрачев А.Д. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2001. — Т. 87, № 2. — С. 182 — 203.
3. Клеточная биология легких в норме и при патологии: рук. для врачей / под ред. В.В. Ерохина, Л.К. Романовой. — М.: Медицина, 2000. — 496 с.
4. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В. Нейроиммунопатология. — М.: Медицина, 1997. — 283 с.
5. Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммунофизиология. — М.: Изд-во ГУНИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 2005. — 160 с.
6. Немтинов П.И., Устименко А.Н., Пашина Л.Н. Возрастные особенности влияния синтетического аналога лей-энкефалинов (даларгина)

на антителообразующую и пролиферативную активность спленоцитов при остром эмоционально-болевым стрессе у мышей линии СВА/СА // Проблемы старения и долголетия. — 2006. — Т. 15, № 3. — С. 202 — 210.

7. Шишкина Л.Н., Маянский Д.Н., Богомолова М.В. Изучение легочных макрофагов крыс при введении гидрокортизона и адреналэктомии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1987. — № 12. — С. 709 — 711.

8. Belayat F., Meniai K., Michaux C. In vitro effect of glucocorticoids on phagocytic function of sheep alveolar macrophages // Vet J. — 1998. — Vol. 155, N 2. — P. 177 — 181.

9. Boichot E., Germain N., Emonds-Alt X., Advenier C. et al. Effects of SR 140333 and SR 48968 on antigen and substance P-induced activation of guinea-pig alveolar macrophages // Clin. Exp. Allergy. — 1998. — Vol. 28, N 10. — P. 1299 — 1305.

10. Broug-Holub E., Persoons J.H.A., Schornagel K. Effects of Stress on Alveolar Macrophages: A Role for the Sympathetic Nervous System // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 1998. — Vol. 19, N 5. — P. 842 — 848.

11. Brunelleschi S., Guidotto S., Viano I. Tachykinin activation of human alveolar macrophages in tobacco smoke and sarcoidosis: a phenotypical and functional study // Neuropeptides. — 1996. — Vol. 30, N 5. — P. 456 — 464.

12. Gaveriaux C., Pelusco J., Simonin F. Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcript in immune cells // FEBS Lett. — 1995. — Vol. 369, № 2 — 3. — P. 272-276.

13. Joachim R.A., Cifuentes L.B., Sagach V. Stress induces substance P in vagal sensory neurons innervating the mouse airways // Clin. Exp. Allergy. — 2006. — Vol. 36, N 8. — P. 1001 — 1010.

14. Kaltreider H.B., Ichikawa S., Byrd P.K. Upregulation of neuropeptides and neuropeptide receptors in a murine model of immune inflammation in lung parenchyma // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 1997. — Vol. 16, N 2. — P. 133 — 144.

15. Leandro C.G., de Lima T.M., Alba-Loureiro T.C. Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercise training in rats // Neuroimmunomodulation. — 2007. — Vol. 14, N 1. — P. 4 — 7.

16. Luza J. Effect of morphine on phagocytic activity of the polymorphonuclears and monocytes // Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med. — 1992. — Vol. 134. — P. 47 — 50.

17. Oishi K., Nishio N., Konishi K. Differential effects of physical and psychological stressors on immune functions of rats // Stress. — 2003. — Vol. 6, N 1. — P. 33 — 40.

Сведения об авторах

Брындина Ирина Георгиевна — заведующая кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, доктор медицинских наук, профессор (426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281; тел.: 3412-91-82-86 (раб.), факс: 3412-65-81-67; e-mail: bryndina@udm.net)

Васильева Наталья Николаевна — доцент кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО ИГМА, кандидат медицинских наук (426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281; e-mail: baseg@list.ru)

Казакова Мария Викторовна — заочный аспирант кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО ИГМА (426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281)

Е.Д. Гаврилова, О.Т. Кудяева, О.П. Колесникова, В.А. Козлов

**ВКЛАД ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛОПРОДУЦЕНТОВ
В ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ЕЕ УСТОЙЧИВОСТЬ К ИНГИБИТОРАМ**

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Показан эффект гиперстимуляции первичного иммунного ответа дополнительным введением антигена в конце лог-фазы первичного IgM-ответа; при этом многократное увеличение числа IgM- и IgG-АОК в селезенке в результате первичного ответа сопровождалось подавлением анамнестической реакции. Введение гидроксимочевина — ингибитора синтеза ДНК — одновременно с дополнительным введением антигена во время лог-фазы первичного IgM-ответа снижает подъем IgM-АОК, но не отменяет стимуляцию образования количества первичных и не изменяет численность вторичных IgG-АОК, что указывает на важную роль в стимуляции IgM-ответа, вызванной повторным введением антигена, пролиферативных процессов. Стимуляция пролиферации В-лимфоцитов, дифференцирующихся в антителопродуценты, существенно сокращает пул клеток памяти и, как следствие, супрессирует вторичный иммунный ответ.

Ключевые слова: IgM- и IgG-антителообразующие клетки, гидроксимочевина, иммунная память

**THE DEPOSIT OF ANTIBODY'S PROLIFERATIVE ACTIVITY IN THE IMMUNE RESPONSE
AND ITS RESISTANCE TO INHIBITORS OF PROLIFERATION**

E.D. Gavrilova, O.T. Kudayeva, O.P. Kolesnikova, V.A. Kozlov

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

The effect of hyperstimulation of the primary immune response was showed by additional introducing of antigen in the late log-phase of the primary IgM-response. The multiple increase of IgM- and IgG-antibody productive cells (APC) in the spleen during the primary response was accompanied by suppression of anamnestic response. The injection of hydroxyurea (an inhibitor of DNA synthesis) together with the additional introduction of the antigen at the late log-phase of the primary IgM-response reduces the rise of IgM-APC, but does not abolish the stimulation of the primary and secondary IgG-APC formation. This fact indicates that proliferative processes play an important role in the stimulation of IgM-response induced by reinjection of the antigen. The stimulation of proliferation of B-lymphocytes which differentiate into antibody productive cells significantly reduces the pool of memory cells and, consequently, suppresses secondary immune response.

Key words: IgM- and IgG-antibody producing cells; hydroxyurea, the immune memory

Накопилось большое количество литературных данных о клеточных и молекулярно-генетических механизмах синтеза антител. Однако до сих пор существует много невыясненных вопросов регуляции гуморального иммунного ответа на уровне целостного организма [4, 5, 6]. Наряду с особенностями текущего состояния организма антиген является тем критерием, который определяет путь развития гуморального ответа. Именно от способа поступления, дозы, продолжительности и места нахождения антигена в организме зависит динамика и выраженность процесса [15].

Целью данной работы было оценить эффект дополнительного поступления антигена в разные фазы первичного ответа на выраженность гуморального ответа, а так же оценить вклад пролиферативной активности антителопродуцентов, как одного из возможных механизмов, значимого в регуляции иммунного ответа и формировании памяти.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали гибридов (C57B1/6×DBA) F₁, самок, в возрасте 2—3 месяцев, полученных из экспериментально-биологический клиники лабораторных животных СО РАМН (г. Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами,

принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Мышей иммунизировали внутривенно (в/в) эритроцитами барана (ЭБ) субоптимальной (1×10^7 ЭБ/мышь) и оптимальной (2×10^8 ЭБ/мышь) дозами. Величину гуморального иммунного ответа определяли путем подсчета количества IgM- и IgG-антителообразующих клеток (АОК) методом локального гемолиза в селезенке мышей на пике иммунного ответа. Максимальное количество IgM-АОК в селезенке мышей данного генотипа наблюдается через 5 суток, IgG-АОК — через 9 суток после иммунизации [2]. Для оценки эффекта дополнительного введения антигена повторное введение антигена проводили также в субоптимальной и оптимальной дозах в/в за сутки до пика ответа: через 4 суток для оценки IgM-ответа и вторичного IgG-ответа, через 4 или 8 суток для оценки первичного IgG-ответа.

Для элиминации пролиферирующих клеток всех животных, предварительно иммунизированных в/в субоптимальной дозой, на четвертые сутки делили на три группы: 1-я группа: контроль — без дополнительного поступления антигена; 2-я группа — с дополнительным субоптимальным внутривенным введением (1×10^7 ЭБ/мышь) и 3-я

группа — с введением антигена под апоневроз (5×10^8 ЭБ/мышь). Одновременно с дополнительным введением антигена, через 4 суток после первичной иммунизации, вводили гидроксимочевину (ГМ) двукратно с интервалом в 7 часов из расчета 1 г на 1 кг массы тела [12]. Для оценки вторичного ответа ингибирование синтеза ДНК наряду с 4 сутками осуществляли так же на 6-е, 8-е и 10-е сутки после первичной иммунизации аналогичным образом, т.е. двукратно с интервалом в 7 часов.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики; различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что дополнительное поступление антигена в позднюю лог-фазу IgM-ответа оказывает стимулирующее влияние на развивающийся первичный ответ в селезенке. Эффект повторного введения антигена через 4 суток после иммунизации является дозозависимым: он более выражен при использовании для первичной иммунизации субоптимальной дозы антигена и при повторном введении большей дозы антигена. Так количество IgM-АОК при такой иммунизации в группах животных, получивших дополнительную субоптимальную или оптимальную дозу антигена, достоверно выше контрольного значения (14 682 или 37 846, относительно 5 552). Уровень IgG-ответа в группах животных, проиммунизированных субоптимальной дозой антигена, повышается с 1 187 в контроле до 11 154 и 48 574 (повторное введение субоптимальной и оптимальной доз антигена, соответственно). По-видимому, дополнительное введение антигена в позднюю лог-фазу IgM-ответа вызывает продление действия активации начальных стадий ответа, что приводит к изменению физиологического течения гуморального ответа.

В случае проведения первичной иммунизации оптимальной дозой антигена наблюдается усиление только IgM-ответ и только при повторном введении также большой дозы антигена (с 25 947 до 42 526); уровень IgG-ответа не меняется. Менее выраженный эффект с оптимальной для гуморального ответа дозой может быть связан со снижением влияния дополнительного поступления антигена на фоне длительного пребывания его в организме, введенного изначально в большей дозе.

Резкое возрастание количества IgM-АОК (от 3 до 7 раз) происходит за 1-е сутки до пика IgM-ответа, тогда как поступление дополнительного количества антигена за сутки до пика IgG-ответа (через 8 суток после иммунизации) не меняет число IgG-АОК, а в случае субоптимальной дозы антигена на фоне низкодозовой иммунизации, даже достоверно снижает их количество в два раза (с 1 187 до 625).

Различие в ответе на повторное введение антигена через 4 и 8 суток может быть связано с регулирующим влиянием антител разных классов: идет активная продукция специфических IgM и IgG, соответственно. Известно, что антитела

класса IgM, введенные вместе с корпускулярным антигеном, стимулируют гуморальный иммунный ответ, тогда как антитела класса IgG — подавляют; эффект показан как для пассивно введенных, так и для образующихся в организме антител [10, 11].

Ранее нами было показано, что дополнительное поступление антигена в лог-фазу развивающегося первичного гуморального иммунного ответа на Т-зависимый антиген снижает выраженность вторичного ответа у мышей (CBAxС57BL/6)F₁ [1]. Учитывая существование генетических особенностей иммунного реагирования, было подтверждено супрессивное влияние антигена на последующий анамнестический гуморальный ответ на мышах другого генотипа — C57BL/6xDBA)F₁. Оценка эффекта дополнительного введения антигена на формирование вторичного гуморального ответа показала, что количество IgG-АОК на его пике (через 4 суток после вторичной иммунизации) значительно ниже в тех группах животных, которые получили повторную инъекцию антигена в позднюю лог-фазу IgM-ответа. Таким образом, мыши разных генотипов, CBAxС57BL/6)F₁ и (C57BL/6xDBA/2)F₁, обнаруживают одинаковую закономерность подавления анамнестической реакции при резкой стимуляции первичного ответа, отличие проявляется лишь в выраженности супрессии.

После контакта с антигеном при развертывании первичного ответа В-клетки активируются к пролиферации и дифференцировке в антителопродуценты, причем до стадии плазматической клетки эти процессы идут параллельно [8, 9, 13]. В дальнейшем происходит переключение изотипов иммуноглобулина, образование коротко и долгоживущих плазматических клеток и клеток памяти, миграция клеток в костный мозг и резкое снижение количества антителопродуцентов [3, 5, 6, 7, 14]. Детальная картина и регулирующие факторы некоторых процессов остаются во многом еще до конца не ясными.

Подъем количества клеток-антителопродуцентов при повторном введении антигена в конце лог-фазы, показанный в наших экспериментах, оказывается очень резким, что предполагает участие мощных регуляторных факторов. В качестве одного из возможных механизмов реализации их действия может быть рассмотрена стимуляция пролиферативных процессов В-лимфоцитов, дифференцирующихся в антителопродуценты.

Для изучения роли пролиферативных процессов в стимулирующем эффекте дополнительного поступления антигена и, как следствие, в последующей супрессии гуморальной иммунной памяти, была проведена серия экспериментов с введением гидроксимочевина — ингибитора синтеза ДНК [12]. При введении гидроксимочевина мышам в лог-фазу первичного IgM-ответа через 4 суток после иммунизации одновременно с повторным введением антигена происходит ослабление стимулирующего эффекта в случае IgM-ответа, однако количество IgM-АОК в селезенке остается на достаточно высоком уровне, сравнимом с таковым в

контрольной группе иммунных мышей. Определенные количества IgG-АОК в использованной нами схеме опыта не выявило отмены или снижения стимулирующего эффекта повторного введения антигена. Количество IgG-АОК в селезенке по-прежнему характеризуется резким, более чем 10-кратным подъемом (рис. 1).

Оценка влияния пролиферативной активности антителообразующих клеток селезенки на вторичный IgG-ответ при дополнительном введении антигена в лог-фазу IgM-ответа (через 4 суток после первичной иммунизации) не выявила снижения вторичного иммунного ответа на фоне введения ингибитора синтеза ДНК. Результаты этого эксперимента представлены в таблице 1.

Отсутствие эффекта ГМ в данном случае можно объяснить тем, что при повторном введении антигена в активную пролиферацию вовлекаются клетки-предшественники IgG-антителопродукторов, пролиферация которых начинается позднее и не подавляется ГМ. Чтобы исключить такую возможность, были проведены эксперименты с введением ГМ в более поздние сроки. Однако введение ингибитора на 6-е, 8-е, или 10-е сутки первичного иммунного ответа также не приводит к снижению количества IgG-АОК при вторичном ответе (табл. 2).

Таким образом, элиминация пролиферирующих антителопродукторов в конце лог-фазы развивающегося IgM-ответа оказывает неоднозначный эффект на IgM и IgG-антителообразование в селезенке: полное ограничение подъема IgM-антителообразующих клеток, частичная отмена стимуляции первичного IgG-ответа и абсолютная устойчивость анамнестической реакции к ингибиторам пролиферации.

По-видимому, большая часть IgM-АОК при стимуляции повторным введением антигена действительно представлена активно пролиферирующими клетками, либо за счет некоторого укорочения продолжительности клеточного цикла, либо сдерживания выхода клеток из делящегося пула. Однако нельзя забывать о существовании и других механизмов реализации стимулирующего влияния антигена, кроме усиления пролиферации антителопродукторов. Возможно, при стимуляции в ответ вовлекаются клетки, которые без стимуляции менее интенсивно продуцируют антитела, что не позволяет определить их стандартными методами. Это также могут быть клетки, подвергающиеся апоптозу, но повторное введение антигена может обеспечивать их сигналами для выживания [6, 14].

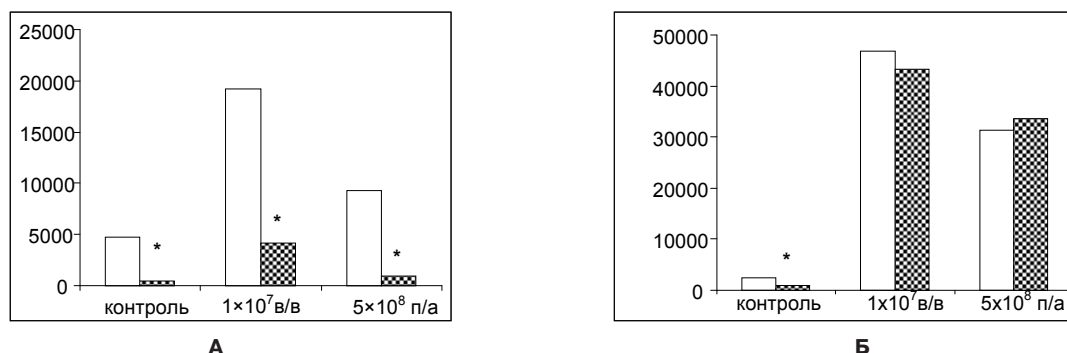


Рис. 1. Количество IgM- и IgG-АОК в селезенке мышей BDF1 при повторном введении антигена через 4 суток после иммунизации на фоне введения гидроксимочевины. Первичная иммунизация – субоптимальной дозой антигена; (М). Примечание: по оси ординат – количество АОК на селезенку; по оси абсцисс: доза дополнительного введения антигена; Белые столбцы – контрольная группа без введения гидроксимочевины ($n = 9-11$), серые столбцы – опытная группа с введением гидроксимочевины ($n = 9-10$); * – достоверные отличия относительно собственного контроля.

Таблица 1
Количество IgG-АОК в селезенке при вторичном иммунном ответе на фоне введения гидроксимочевины в позднюю лог-фазу IgM-ответа (через 4 суток после первичной иммунизации)

Доза первичной иммунизации	Дополнительное введение АГ					
	Контроль (без АГ)		1 × 10 ⁷ в/в		5 × 10 ⁸ п/а	
	без ГМ	с ГМ	без ГМ	с ГМ	Без ГМ	с ГМ
1 × 10 ⁷ в/в ЭБ/мышь	651 304 ($n = 15$)	482 169 ($n = 15$)	465 435 ($n = 16$)	417 394 ($n = 15$)	442 261 ($n = 15$)	611 740 ($n = 15$)

Таблица 2
Количество IgG-АОК в селезенке при вторичном иммунном ответе на фоне введения гидроксимочевины в позднюю лог-фазу первичного IgG-ответа

Доза первичной иммунизации	Дополнительное введение ГМ			
	Контроль (без введения ГМ)	6-е сутки	8-е сутки	10-е сутки
1 × 10 ⁷ в/в ЭБ/мышь	400 169 ($n = 12$)	493 147 ($n = 10$)	364 795 ($n = 10$)	574 556 ($n = 5$)

Повторное введение антигена в конце лог-фазы развивающегося IgM-ответа также может изменять процессы миграции клеток, а также соотношение антителопродуцентов/клетки памяти при дифференцировочных процессах; эти возможные механизмы требуют дальнейшего исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог проделанной работы, можно говорить о том, что дополнительное введение антигена в конце лог-фазы первичного IgM-ответа дает эффект гиперстимуляции как на IgM-, так и на первичный IgG-гуморальный ответ, и приводит к последующей супрессии анамнестической реакции у мышей разного генотипа. Торможение процессов пролиферации на фоне стимуляции первичного ответа (введение гидроксимочевина одновременно с введением антигена во время лог-фазы первичного IgM-ответа) снижает подъем IgM-АОК, но не отменяет стимуляцию образования IgG-АОК, что предполагает участие в последнем случае клеток, не входящих в пул активно пролиферирующих в этот период антителопродуцентов. Элиминация пролиферирующей активности гидроксимочевинной не оказывает влияния на вторичный гуморальный ответ, что вероятно говорит о значимой, но не определяющей роли активнodelящихся в конце лог-фазы В-клеток на формирование иммунной памяти. Скорее всего, стимуляция пролиферативных процессов В-лимфоцитов, дифференцирующихся в антителопродуценты существенно сокращает пул клеток памяти и, как следствие, супрессирует вторичный иммунный ответ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова Е.Д., Кудяева О.Т., Колесникова О.П. Регуляторные взаимодействия между клеточным и гуморальным ответом при формировании иммунной памяти // Вестн. Уральской мед. акад. науки. — 2006. — № 3—1. — С. 32—35.
2. Гаврилова Е.Д., Кудяева О.Т., Колесникова О.П. Антиген как фактор регуляции синтеза антител в продуктивную фазу иммунного ответа // Омский науч. вестн. — 2007. — Т. 61, № 3. — С. 17—18.
3. Гурвич А.Г. Динамика антителообразования // Иммуногенез и клеточная дифференцировка. — М., 1978. — С. 128—158.
4. Ahmed R., Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation // Science. — 1996. — Vol. 272. — P. 54—60.
5. Batista F.D., Harwood N.E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nature Reviews // Immunology. — 2009. — Vol. 9. — P. 15—27.
6. Crowley J.E., Scholz J.L., Quinn W.J. 3rd, Stadanlick J.E. et al. Homeostatic control of B lymphocyte subsets // Immunol. Res. — 2008. — Vol. 42. — P. 75—83.
7. Doms H., Abbas A. Control of CD4+ T-cell memory by cytokines and costimulators // Immunological Reviews. — 2006. — Vol. 211. — P. 23—38.
8. Gudat F.G., Harris T.N., Harris S. Studies on antibody-producing cells. 3. Identification of young plaque-forming cells by thymidine-3 H labeling // J. Exp. Med. — 1971. — Vol. 134. — P. 1155—1169.
9. Hay J.B., Murphy M.J., Morris B. Quantitative studies on the proliferation and differentiation of antibody-forming cells in lymph // Am. J. Pathol. — 1972. — Vol. 6. — P. 1—24.
10. Henry C., Jerne N.K. Competition of 19S and 7S antigen receptors in the regulation of the primary immune response // J. Exp. Med. 1968. — Vol. 128. — P. 133—152.
11. Hjelm F., Carlsson F., Getahun A., Heyman B. Antibody-mediated regulation of the immune response // Scand. J. Immunol. — 2006. — Vol. 64. — P. 177—184.
12. Morse B.S., Rencricca N.J., Stohlman F. The effect of hydroxyurea on differentiated marrow erythroid precursors // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1969. — Vol. 130, N 3. — P. 986—989.
13. Tangye S.G., Hodgkin P.D. Divide and conquer: the importance of cell division in regulating B-cell responses // Immunol. — 2004. — Vol. 112. — P. 509—520.
14. Tarlinton D., Radbruch A., Hiepe F., Dorner T. Plasma cell differentiation and survival // Current Opinion in Immunology. — 2008. — Vol. 20. — P. 162—169.
15. Zinkernagel R.M., Ehl S., Aichele P., Oehen S. et al. Antigen localization regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity // Immunol. Rev. — 1997. — Vol. 156. — P. 199—209.

Сведения об авторах

Гаврилова Елена Давидовна — научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат биологических наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383) 222-04-38, факс: (383) 222-70-28; e-mail: edav76@mail.ru)

Кудяева Ольга Тимофеевна — ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук

Колесникова Ольга Петровна — руководитель лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук

Козлов Владимир Александрович — директор ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН

С.Г. Гамалей, А.В. Батенева, З.Ф. Урманцева, Г.М. Сысоева, Я.В. Маркус, Е.Д. Даниленко,
В.К. Михайлова, Е.А. Волосникова, Г.М. Левагина, В.И. Масычева

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Бердск)

Получен композиционный препарат фактора некроза опухолей альфа с реополиглюкином и полиэтиленгликолем (ФНО-α+ПГ+ПЭГ). Удельная активность образца составляла $4,13 \times 10^7$ МЕ/мг. Цитолитическая активность препарата ФНО-α+ПГ+ПЭГ и рчФНО-α не изменялась в течение 4 месяцев при температуре хранения 6 °С.

Композиционный препарат в отличие от ФНО-α при накожном применении у мышей обеспечивал умеренно выраженное и длительное повышение ФНО-альфа в крови. В экспериментах на лабораторных животных не обнаружено токсического, аллергенного и местно-раздражающего действия препарата ФНО-α+ПГ+ПЭГ.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли альфа, ФНО-α, реополиглюкин, полиэтиленгликоль

MEDICINAL FORM OF TNF-α FOR LOCAL ADMINISTRATION

S.G. Gamaley, A.V. Bateneva, Z.F. Urmantseva, G.M. Sisoyeva, Ya.V. Markus, E.D. Danilenko,
V.K. Mikhaylova, E.A. Volosnikova, G.M. Levagina, V.I. Masicheva

Institute of Medical Biotechnology of State Scientific Center of virology and biotechnology "Vektor" (Berdsk)

Composite preparation of tumor necrosis factor alpha and rheopolyglukin and polyethylene glycol (TNF-α+PG+PEG) was obtained. The specific activity of the samples was $4,13 \times 10^7$ IU/mg. The cytolytic activity of drugs TNF-α+PG+PEG and rhTNF-α did not change after 4 months when stored at 6 °C. Preparation TNF-α+PG+PEG provided a moderately prolonged elevation of TNF-alpha in blood of laboratory mice in contrast to TNF-α when they applied to the skin. The composite preparation did not have toxic, allergic and locally irritating action in experiments on laboratory animals.

Key words: tumor necrosis factor alpha, TNF-α, rheopolyglukin, polyethylene glycol

По прогнозам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в период с 1999 по 2020 г. распространенность онкологических заболеваний в мире возрастет в 2 раза (с 10 до 20 млн. новых случаев заболеваний и с 6 до 12 млн. регистрируемых смертей). Россия входит в первую десятку стран по заболеваемости. Среди онкологических болезней быстрыми темпами распространяется рак кожи. В 2009 г. в РФ диагноз «рак кожи» был впервые установлен у 68132 человек. Поэтому поиск эффективных способов лечения этих онкологических заболеваний остается актуальной задачей медицины. Особое значение необходимо уделять поиску лекарственных форм противоопухолевых препаратов для накожного применения (мази, гели).

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» разработан противоопухолевый препарат на основе фактора некроза опухолей человека альфа (Альнорин) для инъекционного применения. Показано, что включение Альнорина в схему лечения диссеминированной меланомы кожи повышает эффективность цитостатической терапии, оказывает иммуностимулирующее действие. Наряду с этим, препарат снижает резистентность меланомы к цитостатикам [2, 6]. Эти данные могут служить основанием для создания препаратов на основе ФНО-α для местного применения. В качестве компонентов новой лекарственной формы ФНО-α для местного применения могут быть использованы водорастворимые

неионогенные полимеры [3]. К ним относятся полиглюкин и полиэтиленгликоль, которые обладают хорошей растворяющей способностью, являются стабилизаторами для различных биологически активных веществ, обладают способностью к биодеструкции и практически безвредны.

Целью данной работы являлось получение и характеристика композиционного препарата ФНО-α с реополиглюкином и полиэтиленгликолем (ФНО-α + ПГ + ПЭГ).

МЕТОДЫ

Получение и анализ ФНО-α+ПГ+ПЭГ

Рекомбинантный человеческий ФНО-α (рчФНО-α) получали в соответствии с патентами РФ [см. 3, 4]. Для приготовления композиционного препарата к раствору рчФНО-α в калий-фосфатном буфере (pH 6,5-7,2) добавляли 10%-ный раствор реополиглюкина, доводили объем раствора апиrogenной водой. Стабилизированный раствор подвергали стерилизующей фильтрации, после чего добавляли стерильный ПЭГ (м.м. 400) до концентрации 20 %.

Содержание белка в композиционном препарате ФНО-α + ПГ + ПЭГ определяли методом Лоури [8], наличие нативного ФНО-α в препарате оценивали электрофорезом в 12% ПААГ в денатурирующих условиях, как описано в [7]. Цитолитическую активность препаратов оценивали в

тесте на культуре мышинных фибробластов L929 в присутствии актиномицина D.

Стабильность ФНО- α в составе композиции при хранении в различных температурных режимах (6 °С, 20 °С, 37 °С) в течение суток и при 6 °С в течение 4 месяцев. Сохранность структуры и активности препаратов оценивали методами, использованными для характеристики композиционного препарата.

Исследование фармакокинетики препаратов ФНО альфа проводили на 45 половозрелых белых беспородных мышах ICR, самцах, массой 19–21 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животные были разбиты на 3 экспериментальные группы по 15 голов в каждой.

Препараты ФНО- α и ФНО- α + ПГ + ПЭГ наносили на выстриженный участок кожи однократно в дозе 5×10^5 МЕ на мышь массой 20 г (доза, соответствующая максимально переносимой для внутрибрюшинного введения). Через 15 мин, 3 и 24 часа после нанесения препаратов оценивали уровень ФНО- α в образцах сыворотки крови иммуноферментным методом с использованием набора реагентов «альфа-ФНО — ИФА-БЕСТ», ЗАО «Вектор-БЕСТ» (г. Новосибирск).

Исследование токсических, аллергенных свойств и местно-раздражающего действия проводили в соответствии с методами, описанными в [5].

«Острую» токсичность композиционного препарата в сравнении с рчФНО- α изучали на 70 беспородных мышах (самцах) с массой тела 20–22 г при двух способах введения: внутрибрюшинном и подкожном. При оценке местно-раздражающего действия композиционного препарата забирали образцы кожи и регионарных лимфатических узлов мышей в области нанесения препарата. Изучение аллергизирующих свойств выполняли на 16 морских свинок обоего пола с массой тела 200–270 г и 32 белых беспородных мышах ICR, самцах, с массой тела 25–28 г.

Все экспериментальные животные были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Эксперименты проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N 755).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Statgraphics, Vers. 5.0» (Statistical Graphics Corp., USA). Достоверность обнаруженных межгрупповых различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение физико-химических свойств композиции ФНО- α + ПГ + ПЭГ методами электрофореза и спектрометрии показало наличие в образцах белка с молекулярной массой 16,7 кДа, соответствующей молекулярной массе ФНО- α . Удельная активность ФНО- α в композиционном препарате составляла $4,13 \times 10^7$ МЕ/мг.

Оценка специфической активности образцов композиционного и монопрепарата ФНО- α при инкубации образцов при 6 °С, 20 °С и 37 °С в течение суток показала, что только при температуре 6 °С она сохранялась. При более высоких температурах (20 °С и 37 °С) наблюдалось резкое снижение активности ФНО- α как в составе композиций ФНО- α + ПГ + ПЭГ, так и препарата индивидуального рчФНО- α . В дальнейшем было показано сохранение специфической активности ФНО- α в комбинации с полимерами в течение 4 месяцев при хранении при 6 °С.

При определении уровня ФНО- α в сыворотке крови мышей после нанесения препаратов на кожу продемонстрирована зависимость этого показателя от лекарственной формы ФНО альфа. Значения ФНО- α , обнаруженного в крови мышей после кожного нанесения раствора препарата рчФНО- α , составляли всего лишь 2,3–2,5 % от дозы, которую использовали для аппликации, что может свидетельствовать о низкой способности белка к проникновению через неповрежденную кожу. В противоположность этому содержание ФНО- α в крови мышей, которым на кожу наносили ФНО- α в композиции с ПГ и ПЭГ, через 15 мин после аппликации составляло 27 % от нанесенной дозы, через 5 часов — 19 % и лишь через сутки после воздействия снижалось до контрольного уровня (0,8 пкг/мл). Ранее было показано, что после внутривенного введения препарат рчФНО- α элиминировался из кровеносного русла мышей через 4 часа [1].

Следовательно, введение рчФНО- α в состав композиционной формы приводило к повышению его способности преодолевать кожный барьер и проникать в кровь животных. Умеренно повышенный уровень ФНО- α (118–163 пкг/мл) сохранялся в крови в течение 5 часов наблюдения.

Проведенное токсикологическое исследование показало, что однократное внутрибрюшинное введение препарата ФНО- α в составе лекарственной формы с полимерами ПГ и ПЭГ и препарата сравнения в широком диапазоне доз не приводило к гибели лабораторных животных. Однократная аппликация композиционного препарата не оказывала влияния на интегральные физиологические, гематологические, биохимические показатели крови и морфологию внутренних органов мышей. Эти данные свидетельствуют о том, что новая лекарственная форма ФНО- α при однократном применении в указанной дозе не проявляет токсических свойств.

Препарат ФНО- α + ПГ + ПЭГ не оказывал кожно-сенсibilизирующего воздействия в опытах на морских свинках и не индуцировал развития реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей, что свидетельствует об отсутствии у препарата аллергизирующих свойств.

Светооптическое исследование гистологического материала (кожа в месте нанесения и регионарный лимфоузел), полученного через 1 сутки после однократного нанесения на кожу мышам препарата ФНО- α + ПГ + ПЭГ, также как препарата сравне-

ния, патологических изменений в исследованных органах экспериментальных животных не выявило.

Таким образом, композиционный препарат ФНО- α + ПГ + ПЭГ не обладает местно-раздражающим действием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что цитолитическая активность ФНО- α в композиционном препарате сохранялась в течение 4 месяцев при температуре 6 °С.

2. Композиционный препарат в отличие от ФНО- α при накожном применении обеспечивал умеренно выраженное и длительное повышение ФНО- α в крови лабораторных животных.

3. Не выявлено токсических, аллергенных и местно-раздражающих эффектов композиционного препарата ФНО- α + ПГ + ПЭГ у лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гамалей С.Г, Батенева А.В., Сысоева Г.М., Даниленко Е.Д. и др. Фармакокинетика и противоопухолевые свойства препарата, содержащего ФНО- α в составе наночастиц // Бюл. экспер. биол. — 2010. — Т. 149, № 3. — С. 296—299.

2. Гуторов С.А., Абрамов М.Е., Черноглазова Е.В. Химиотерапия с предварительным введением Альнорина при диссеминированной меланоме кожи // Профилактика и лечение злокачественных новообразований в современных условиях. — Барнаул, 2007. — С. 102—103.

3. Патент РФ 2067866, МПК А61К35/26, опубл. 20.10.1996.

4. Патент РФ 2144958, МПК С12Н 15/28, опубл. 27.01.2000.

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М., 2005. — 398 с.

6. Gutorov S.L., Slavina E.G., Chertkova A.I., Korotkova O.V. et al. Modulation of melanoma cell sensitivity to the cytotoxicity of antitumor drugs by TNF- α and IFN- α // European Cytokine Network. — 2006. — Suppl., Vol. 17. — P. 94.

7. Laemmli W.H. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterial fage T 4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.

8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—725.

Сведения об авторах

Гамалей Светлана Георгиевна — старший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (633010, Новосибирской область, г. Бердск-10, а/я 112, ул. Химзаводская, 9. Факс (383-41) 5-80-88; тел. (383-41) 5-80-91; E-mail: gamalei58@mail.ru)

Батенева Алена Владимировна — научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Урманцева Зульфия Фаиковна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Сысоева Галина Михайловна — старший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Маркус Яна Владимировна — младший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Даниленко Елена Дмитриевна — кандидат биологических наук, заместитель директора ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Михайлова Валентина Кузьминична — научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Волосникова Екатерина Александровна — зав. лабораторией получения и анализа биосубстанций отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Левагина Галина Михайловна — кандидат биологических наук, заведующий отделом разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Масычева Валентина Ивановна — доктор биологических наук, профессор, директор ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Е.В. Гойман, В.О. Ткачев, О.Т. Кудяева, О.П. Колесникова, В.А. Козлов

ЛИМФОПЕНИЯ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ АУТОИММУННОГО ПРОЦЕССА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА У МЫШЕЙ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Трансплантация сингенных спленоцитов интактным мышам приводит к развитию лимфопении вследствие снижения пролиферативной активности гемопоэтических клеток-предшественников костного мозга. У мышей с хронической реакцией трансплантат против хозяина (хРТПХ) введение сингенных лимфоцитов значимо не влияет на уровень уже существующей лимфопении, но увеличивает ее продолжительность. Это хорошо согласуется с полученными данными о том, что перенос сингенных клеток увеличивает частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита при хРТПХ. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют в пользу патогенетического значения лимфопении и инициируемого ею процесса гомеостатической пролиферации в развитии аутоиммунных реакций при хРТПХ.

Ключевые слова: лимфопения, хроническая реакция трансплантат против хозяина, гомеостатическая пролиферация, аутоиммунный гломерулонефрит

LYMPHOPENIA AS A FACTOR INVOLVED IN THE AUTOIMMUNITY DEVELOPMENT IN MURINE GRAFT VS. HOST DISEASE

E.V. Goiman, V.O. Tkachev, O.T. Kudayeva, O.P. Kolesnikova, V.A. Kozlov

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

Syngeneic splenocyte transplantation leads to lymphopenia development in intact mice owing to decreased proliferative activity of bone marrow hematopoietic progenitor cells. In the mice with induced chronic graft-versus-host disease (cGVHD) transfer of syngeneic lymphocytes has little or no effect on the level of already existing lymphopenia, but increases its duration. These results are in close agreement with the received evidences that transfer of syngeneic cells increases frequency of autoimmune glomerulonephritis at cGVHD. Thus, results of research speak in favor of conclusion that lymphopenia and initiated by it homeostatic proliferation play a pathogenetic role in the development of autoimmune reactions at cGVHD.

Key words: lymphopenia, chronic graft versus host disease, homeostatic proliferation, autoimmune glomerulonephritis

В организме объемы периферических В- и Т-клеточного пулов поддерживаются на относительно постоянном уровне благодаря механизмам регуляции жизнеспособности, пролиферативной активности и апоптоза как гемопоэтических клеток-предшественников в костном мозге так и зрелых наивных лимфоцитов в кровотоке и вторичных лимфоидных органах. Показано, что лимфопения запускает клеточную пролиферацию зрелых лимфоцитов на периферии — процесс известен как гомеостатическая пролиферация. Предполагается, что гомеостатическая пролиферация приводит к снижению разнообразия распознающих антигены рецепторов Т-лимфоцитов. К настоящему времени во множестве экспериментальных работ были получены данные о связи лимфопении и последующего запуска процесса компенсаторной гомеостатической пролиферации с развитием аутоиммунной патологии за счет увеличения количества аутореактивных клеток [4, 9, 11].

В качестве модели исследования нами была выбрана хроническая реакция трансплантат против хозяина (хРТПХ), индуцированная переносом лимфоидных клеток от мышей родительской линии DBA/2 гибридам первого поколения (C57Bl6х-DBA/2)F1, которая спонтанно развивается по двум иммунопатологическим вариантам. Первый из них

(Th1-зависимый) характеризуется Т-клеточным иммунодефицитом, а клинической манифестацией второго (Th2-зависимого) является массивная протеинурия вследствие формирования аутоиммунного *lupus*-подобного гломерулонефрита [3]. Предполагается, что выбор пути развития в данной модели определяется преимущественной активацией Th1- либо Th2-звена иммунной системы в первые две недели после начала индукции хронической РТПХ [3, 5]. С другой стороны, механизм аутоиммунного поражения внутренних органов у *lupus*-реципиентов имеет много общего с патогенезом системной красной волчанки, в котором важное значение имеет неконтролируемая пролиферация аутоагрессивных клонов В- и Т-клеток в результате срыва толерантности к антигенам собственных тканей [7, 13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали мышей-самок линии DBA/2 и гибридов первого поколения (C57Bl6х-DBA/2)F1, возрастом 2 месяца, полученных из лаборатории экспериментальных животных (моделей) НИИКИ СО РАМН (Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Хроническую РТПХ индуцировали внутривенным переносом 65×10^6 лимфоидных клеток мышей DBA/2 реципиентам — гибридам (C57Bl6xDBA/2) F1 двукратно с интервалом 6 дней [10]. Сингенные клетки вводили интактным мышам (C57Bl6xDBA/2) F1 по аналогичной схеме в той же суммарной дозе, либо в разовой дозе 40×10^6 клеток мышам с индуцированной хРТПХ трехкратно с интервалом 6 суток начиная с восьмых суток после второй трансплантации полуаллогенных лимфоцитов.

О развитии аутоиммунного гломерулонефрита судили по появлению стойкой протеинурии (более 3,5 мг/мл белка в трех последовательных измерениях). Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie, Австрия) при $\lambda = 570$ нм.

Пролиферативную активность клеток-предшественников костного мозга (долю клеток в S-фазе) оценивали по ингибированию образования экзогенных колоний в метил-целлюлозной культуре цитозин-арабинозидом [1]. Для этого клетки костного мозга выделяли из канала бедренной кости и культивировали в 0,9% метилцеллюлозной культуре «MethoCult M3430» («StemCell Technologies», Канада) с добавлением эритропоэтина «Recormon» («Boehringer Mannheim», Германия) в конечной концентрации 20 ЕД/мл в 96-луночных планшетах («Corning», США). Часть клеточной суспензии предварительно инкубировали с цитозин-арабинозидом (AraC; «Sigma», США) в конечной концентрации 1 мг/мл в течение 1 часа с последующей отмывкой от цитостатика. Пролиферативную активность клеток-предшественников костного мозга вычисляли по формуле:

$$(N_{\text{Total}} - N_{\text{AraC}}) / N_{\text{Total}}$$

где N_{Total} — общее количество экзогенных колоний в опыте без добавления цитостатика, а N_{AraC} — количество колоний в опыте с добавлением AraC.

Количество клеток селезенки, периферической крови и лейкоцитарную формулу определяли стандартными методами.

Статистическую обработку результатов проводили, используя непараметрический U-критерий Манна — Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было установлено, что Th2-зависимый вариант хронической РТПХ характеризуется ранним появлением в крови антител к нативной ДНК и формированием в дальнейшем иммунокомплексного аутоиммунного *lupus*-подобного гломерулонефрита, частоту развития которого можно оценивать по содержанию белка в моче, поскольку стойкая протеинурия у таких мышей тесно коррелирует с морфологическими признаками иммунного поражения ткани почечных клубочков [3]. Трансплантация сингенных лимфоидных клеток в тех же условиях не приводит к образованию антител к ДНК и появлению признаков аутоиммунной патологии [6]. Индукция хронической РТПХ приводит к развитию лимфо-

пени в ранние сроки после трансплантации полуаллогенных лимфоцитов (первые 2 недели), с последующим периодом «овершута», когда количество лейкоцитов в периферической крови превосходит аналогичные показатели интактных животных (рис. 1). Нормализация количества лимфоцитов в периферической крови, происходящая ко второму месяцу наблюдения, не означает восстановления субпопуляционного состава лимфоцитов. Так, установлено, что у *lupus*-реципиентов увеличивается абсолютное и относительное содержание $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток с фенотипом клеток памяти [2]. Этот факт, а также выявление у *lupus*-реципиентов высоких концентраций IL-7 в периферической крови (0,1 пг/мл и 6,5 пг/мл, $p < 0,05$, соответственно у контрольных животных и *lupus*-реципиентов) позволяет предположить участие гомеостатической пролиферации в возникновении аутоиммунной патологии в данной модели [2]. При этом, возможно, существенный вклад вносит индуцированная лимфопенией пролиферация В-лимфоцитов — процесс, остающийся к настоящему времени относительно слабоизученным [14].

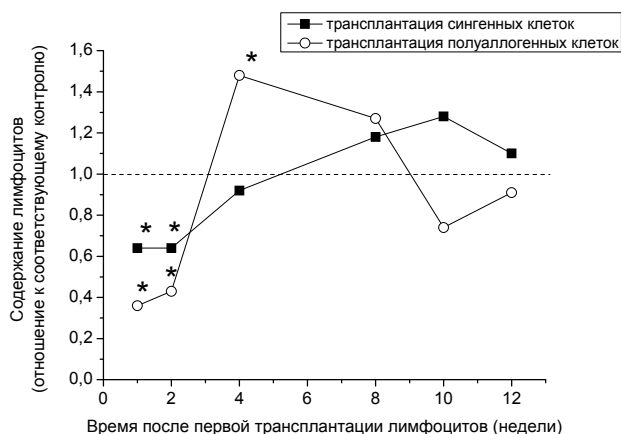


Рис. 1. Содержание лимфоцитов в периферической крови у мышей после трансплантации сингенных и полуаллогенных клеток. Данные представлены относительно значений контроля, принятых за 1. * — различия между опытной и контрольной группами достоверны, $p < 0,05$.

Существует предположение, что трансплантация сингенных лимфоцитов в ситуации их выраженного снижения, восполняя лимфоцитарный пул в организме, обрывает процесс гомеостатической пролиферации и тем самым не допускает срыва толерантности и развития аутоиммунного расстройства. Так, в работе E. Jang с соавторами на модели спонтанно развивающегося аутоиммунного артрита у мышей трансгенной линии K / B x N, характеризующейся лимфопенией на доклинической стадии, было показано, что трансплантация $CD4^+$ Т-лимфоцитов (в дозе 20×10^6 клеток), клеток лимфатических узлов и селезенки (40×10^6 клеток), или клеточной популяции, обогащенной $CD25^+$ Т-лимфоцитами (40×10^6 клеток) приводит к снижению частоты и тяжести развития поражения суставов [8]. На основании результатов

данной работы и сделанного предположения о важной патогенетической роли гомеостатической пролиферации в развитии аутоиммунного процесса у *lupus*-реципиентов для предупреждения формирования аутоиммунного гломерулонефрита мышам после индукции хронической РТПХ дополнительно вводили сингенные спленоциты еженедельно трехкратно в дозе 40×10^6 . Однако такой сингенный перенос привёл к неожиданному результату — частота развития *lupus*-нефрита возросла с 54 до 75 %.

Для выяснения возможных причин такого эффекта изучали влияние введения сингенных спленоцитов интактным животным на содержание клеток периферической крови. Оказалось, что у реципиентов сингенных лимфоцитов также развивается лимфопения, сохраняющаяся в течение двух недель после трансплантации (рис. 1). При этом количество клеток в костном мозге и селезенке оставалось на уровне, характерном для интактных животных (данные на рисунках не приведены), но пролиферативная активность гемопоэтических клеток-предшественников существенно снижалась (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемая лимфопения не связана с перераспределением клеток в организме, а объясняется снижением пролиферативной активности костномозговых клеток-предшественников.

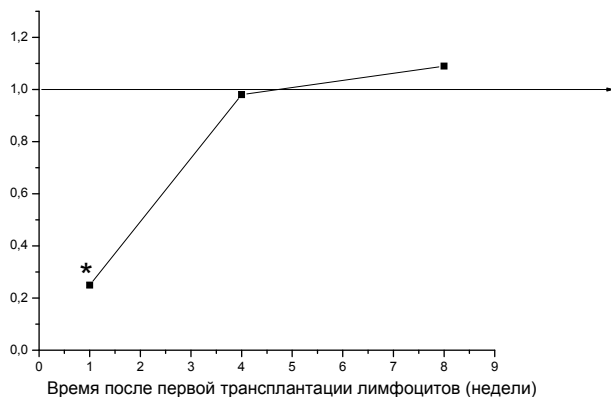


Рис. 2. Проллиферативная активность клеток костного мозга у мышей после трансплантации сингенных клеток. Данные представлены относительно значений контроля, принятых за 1. * — различия между опытной и контрольной группами достоверны, контрольная группа — $n = 20$; в группе с сингенным переносом каждая точка представлена средними значениями $n = 4$, $p < 0,05$.

Что касается лимфопении, возникающей в ранние сроки развития хРТПХ, то поскольку нами не было отмечено увеличение пролиферативной активности клеток костного мозга в сроки, соответствующие восстановлению клеточного состава периферической крови [6], можно предположить, что в поддержании количества лимфоцитов значительную роль в исследуемой системе играет процесс гомеостатической пролиферации.

Введение сингенных спленоцитов животным с развивающейся хРТПХ (после второго введения полуаллогенных клеток) не нормализует содержания лимфоцитов в периферической крови, и лимфопения у таких животных не только остается на уровне, характерном для этих сроков развития хРТПХ, но и сохраняется на более продолжительный срок (табл. 1). Таким образом, сингенный перенос лимфоцитов создает условия для усиления процесса гомеостатической пролиферации, что, вероятно, может служить объяснением повышенной частоты аутоиммунных реакций в этом случае.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что введение сингенных спленоцитов на ранних стадиях хРТПХ не нормализует лимфопению, но вызывает изменения кроветворения, способствующие ее поддержанию и, таким образом, может усугублять и/или пролонгировать лимфопению и усиливать гомеостатическую пролиферацию и связанную с этим экспансию аутоагрессивных клонов лимфоцитов, что и обуславливает увеличение частоты развития аутоиммунного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры тканей в гематологии. — Томск, 1992. — 272 с.
2. Гойман Е.В., Кудаева О.Т., Ильина Н.А., Борисов В.И. и др. Процессы гомеостатической пролиферации в патогенезе аутоиммунного гломерулонефрита, индуцированного хронической реакцией «трансплантат против хозяина» // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2010. — Т. 148, № 1. — С. 60–64.

Таблица 1
Содержание лейкоцитов в периферической крови у реципиентов с хронической РТПХ при введении сингенных спленоцитов, (M, min–max)

Группы	Количество лейкоцитов $n \times 10^6/\text{мл}$			
	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.
контроль ($n = 5$)	15,6 14,5–15,5	11,0 8,5–13,7	12,0 9,5–16,0	13,5 9,7–18,0
хРТПХ ($n = 5$)	10,8* 9,0–11,5	4,0*# 2,7–5,0	8,4*# 7,0–10,0	9,3*# 7,5–11,7
хРТПХ + сингенный перенос ($n = 5$)	—	7,1* 6,7–7,5	5,8* 5,0–7,0	6,3* 5,0–8,5

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контролем; # — достоверные различия между группами хРТПХ и хРТПХ + сингенный перенос.

3. Козлов В.А., Кудяева О.Т., Колесникова О.П., Сафронова И.В. и др. Th1- и Th2-зависимые варианты хронической реакции трансплантат против хозяина // Иммунология. — 2002. — Т. 23, № 3. — С. 143–146.

4. Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация лимфоцитов в аспекте иммунопатогенеза различных заболеваний // Иммунология. — 2006. — Т. 27, № 6. — С. 378–382.

5. Кудяева О.Т., Гойман Е.В., Лыков А.П., Колесникова О.П. и др. Влияние препаратов, изменяющих соотношение Th1/Th2, на частоту развития клинических вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2005. — Т. 140, № 9. — С. 325–327.

6. Ткачев В.О., Гойман Е.В., Лыков А.П., Кудяева О.Т. и др. Показатели гемопоэза в динамике развития хронической реакции трансплантат против хозяина // Иммунология. — 2006. — № 3. — С. 168–170.

7. Foster M.H. T cells and B cells in lupus nephritis // Semin. Nephrol. — 2007. — Vol. 27, N 1. — P. 47–58.

8. Jang E., Kim H.R., Cho S.H., Paik D.J. et al. Prevention of spontaneous arthritis by inhibiting

homeostatic expansion of autoreactive CD4 T-cell in the K/BxN model // Arthritis Rheum. — 2006. — Vol. 54. — P. 492–498.

9. Khoruts A., Fraser J.M. A causal link between lymphopenia and autoimmunity // Immunol. Lett. — 2005. — Vol. 98. — P. 23–31.

10. Kimura K., Ida., Shimada K., Kanai Y. Specificity of anti-nuclear antibodies induced in F1 mice undergoing the graft versus host reaction: isotypes and cross-reactivities // Clin. Exp. Immunol. — 1987. — Vol. 69. — P. 385–393.

11. Krupica T. Jr., Fry T.J., Mackall C.L. Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model // Clin. Immunol. — 2006. — Vol. 120. — P. 121–128.

12. Min B., Yamane H., Hu-Li J., Paul W.E. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T-cell are regulated by different mechanisms // J. Immunol. — 2005. — Vol. 174. — P. 6039–6044.

13. Shlomchik M.J., Madaio M.P. The role of antibodies and B cells in the pathogenesis of lupus nephritis // Springer Semin. Immunopathol. — 2003. — Vol. 24. — P. 363–375.

14. Woodland R.T., Schmidt M.R. Homeostatic proliferation of B-cell // Semin. Immunol. — 2005. — Vol. 17. — P. 209–217.

Сведения об авторах

Гойман Елена Владимировна — научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: +7-913-934-34-44; e-mail: L.Goiman@mail.ru)

Ткачев Виктор Олегович — научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат биологических наук

Кудяева Ольга Тимофеевна — ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор биологических наук

Колесникова Ольга Петровна — руководитель лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук

Козлов Владимир Александрович — директор ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН

О.В. Горчакова, В.Н. Горчаков

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУННОГО СОСТОЯНИЯ
ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА ГЕРОНТОВ В УСЛОВИЯХ ФИТОТЕРАПИИ***Новосибирский государственный университет (Новосибирск)
НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН (Новосибирск)*

В эксперименте проведена морфофункциональная оценка иммунного статуса лимфатического узла геронтов. Показано снижение его иммунной функции из-за процессов склерозирования, компактизации и разряжения структуры паракортикальной зоны в условиях редукции лимфопоза. У геронтов усиливается клеточное звено иммуногенеза, судя по увеличению размера паракортеса при сохранности соотношения лимфоидных узелков с герминативным центром и без него. У геронтов прием биоактивного фитосбора усиливает пролиферативные процессы, сопровождающиеся увеличением числа клеток в лимфоидных узелках, стимулирует макрофагальную реакцию и увеличивает число плазмобластов во всех структурно-функциональных зонах лимфатического узла. В условиях фитотерапии происходит формирование иммунного ответа по смешанному типу. Результат имеет практическое значение для использования иммуноориентированной фитотерапии в программах эндоэкологической реабилитации с учетом возрастного фактора.

Ключевые слова: лимфоузел, геронтология, фитотерапия

**MORPHOFUNCTIONAL ESTIMATION OF IMMUNE FUNCTION OF LYMPH NODE
OF OLD AGE IN THE CONDITIONS OF PHYTOTHERAPY**

O.V. Gorchakova, V.N. Gorchakov

*Novosibirsk State University
Institute of clinical and experimental lymphology SB RAMS, Novosibirsk*

The morphofunctional estimation of the immune status of a lymph node of animals of old age is spent in experiment. Data has shown decrease in immune function of the lymph node because of a fibrosis process, of cells depletion of paracortex structure in the conditions of a lymphopoiesis reduction. The ageing strengthens the cellular immunity that is characterized by increase in paracortex size at preservation of a parity of lymphoid nodules with the germinative centre and without the germinative centre. The phytotherapy strengthens proliferative processes accompanied by increase of number of cells in lymphoid nodules, stimulates of macrophage reaction and increases number of plasmablasts in all structurally and functional zones of a lymph node of animals of old age. There is a formation of the immune answer on the mixed type in the conditions of phytotherapy. The result has practical importance for use of the immunefocused phytotherapy in programs of endoecological rehabilitations taking into account the age factor

Key words: lymph node, gerontology, phytotherapy

Старение — сложный процесс, являющийся естественным этапом онтогенетического развития, и проявляется в неравномерности изменений органов и систем организма [2, 9, 11]. Одними из первых изменяются иммунная и лимфатическая системы. При этом требуется тщательное изучение функции органов и систем лиц пожилого и старческого возраста с учетом особенностей их иммунного статуса. Важное место отводится лимфатическим узлам, которые входят в состав одной из важнейших звеньев защитной системы организма — иммунной и участвующих в сложном процессе иммуногенеза [4]. Требуется изучение морфологических эквивалентов иммунной функции лимфатических узлов с учетом возрастного фактора. Морфофункциональный статус лимфатического узла может рассматриваться как индикатор внутренней среды, которая меняется с возрастом. В тоже время исследование лимфатического узла позволит выявить характерные особенности его структуры и иммунного ответа у геронтов, что может быть условием для выбора иммуноориентированной терапии. Постоянно ведется поиск новых

эффективных средств геропротекторов, влияющих на темпы старения. Наибольший интерес вызывает фитотерапия, которая широко применяется в медицине из-за позитивного действия на организм [6]. Но за пределами исследования остается лимфатическая составляющая механизмов действия фитотерапии, при которой лимфатический узел становится основным органом-мишенью. Применение фитотерапии для замедления старения в лимфатической и лимфоидной системах делает настоящее исследование актуальным с позиции современной лимфологии, эндоэкологической медицины и фитолимфонутириологии [5, 7].

В связи с этим **цель исследования** — морфофункциональная оценка иммунного статуса лимфатического узла геронтов в условиях фитотерапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент на животных и выведение их из опыта были проведены в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики (GLP). Методы соответствуют этическим нормам,

изложенным в Женевской конференции (1971), «Об утверждении правил лабораторной практики» и «О гуманном обращении с экспериментальными животными» (Минздрав СССР № 775 от 12.08.1977), «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003.

Исследование проводили на 160 белых крысах-самцах Wistar разного возраста (молодые — 3–4 месяца и старые — 12–15 месяцев) с учетом существующего соотношения продолжительности жизни крысы и человека [3]. Животные получали при свободном доступе к воде стандартную диету, которая включала экструдированный комбикорм ПК-120-1. В эксперименте использован биоактивный фитосбор (БАФ), включающий корень и лист бадана, родиолу розовую, копеечник сибирский, лист черники, брусники, смородины, шиповник майский, чабрец, пищевые волокна. Выбор конкретных лекарственных растений основан на принципах фитотерапии [6]. Фитосбор является адаптогенным средством, что определило его применение у животных-геронтов. Фитосбор применяли в течение одного месяца в суточной дозе 0,1–0,2 г/кг у животных разного возраста.

Паховые лимфатические узлы исследовали гистологическим методом. Забранные лимфатические узлы фиксировали в 10% нейтральном формалине. Далее следовала классическая схема проводки и заливки материала в парафин с последующим приготовлением гистологических срезов и окраской их гематоксилином и эозином, азуром и эозином. Морфометрический анализ структурных компонентов лимфатического узла осуществляли с помощью морфометрической сетки [1, 10], которая накладывалась на срез лимфатического узла. Подсчитывали количество узлов или пересечений сетки, приходящихся на весь срез в целом и отдельно на каждый из структурных компонентов с перерасчетом в проценты. При цитоанализе

лимфатических узлов подсчитывали число клеток на стандартной площади 1600 мкм² с их дифференцировкой на бласты, средние и малые лимфоциты, плазмциты, макрофаги и другие [8].

Полученные данные подвергали статистической обработке с определением средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$) и достоверности различий при $p < 0,05$ в операционной системе Windows с использованием программы статистического анализа StatPlus Pro 2009, AnalystSoft Inc.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическое строение лимфатических узлов тесно связано с выполняемыми ими функциями, прежде всего, иммунной функцией. Прежде, чем рассматривать особенности лимфопролиферативных изменений, следует остановиться на морфологических проявлениях иммунного ответа в лимфатических узлах при старении. Лимфатические узлы являются частью лимфатического русла и с возрастом претерпевают структурно-функциональные преобразования из-за развития склеротического процесса. В большей степени это касается тех лимфатических узлов или сегментов их, которые не были подвержены инволюции и сохранили структурно-функциональные зоны, входящие в состав лимфоидной доли. Именно сохранность лимфоидной доли определяет функции лимфатического узла, значимые в определенном возрасте и необходимые для выполнения дренажно-детоксикационной и иммунной функций. Для геронтов характерна неоднородность структуры лимфатического узла. В лимфатических узлах геронтов выявлены процессы фиброзирования, сопровождающиеся утолщением капсулы, развитием соединительной ткани вокруг сосудов, синусов в лимфоидной паренхиме (рис. 1). Наряду с этим отмечена локализация субкапсулярного склероза параллельно краевому синусу в периферической коре, что затрудняет пассаж лимфы в компартменте лимфатического узла.

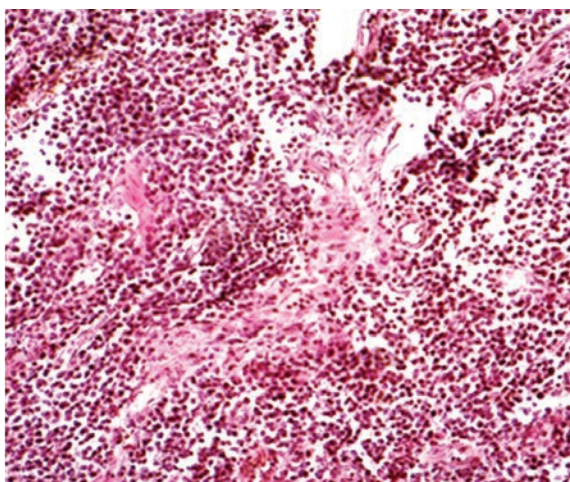
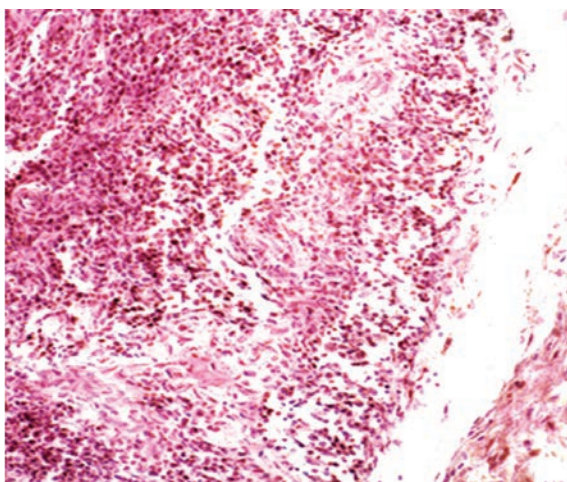


Рис. 1. Участки склерозирования в лимфоидной паренхиме лимфатического узла геронтов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ок. $\times 7$, об. $\times 10$.

На этом фоне имеет место общая компактизация лимфатического узла. Кортиково-мозговое соотношение мало меняется и составляет в среднем $1,91 \pm 0,25$ (у молодых животных $1,98 \pm 0,23$). В структуре лимфатического узла преобладают структуры коркового вещества. У геронтов наблюдаемое изменение площади структурно-функциональных зон лимфатического узла, ответственных как за клеточный, так и за гуморальный иммунитет. При этом увеличивается в 1,6 раза площадь, занимаемая корковым плато. Увеличение площади коркового плато связано с уменьшением площади лимфоидных узелков, особенно содержащих герминативные центры. Соотношение вторичных и первичных лимфоидных узелков с герминативным центром и без него составляет у геронтов 1,1, когда у молодых

животных он равен 1,4. Уменьшение количества лимфоидных узелков с герминативным центром указывает на снижение пролиферативных процессов в лимфатическом узле с возрастом. Паракорттекс может сохранять компактное расположение лимфоидных клеток по периферии или в виде отдельных полос на фоне разряжения своей структуры. При этом формируется недостаточность клеточного звена иммунитета, судя по занимаемой площади Т-зоны в лимфатическом узле у геронтов. Мозговые синусы лимфатических узлов геронтов выглядели широкими образованиями, пронизывающими всю ткань узла. Отмечено увеличение в 2,3 раза размера мозгового синуса лимфатического узла. Просвет синусов выполнен клеточными элементами. Эти изменения указывают на развитие диспропор-

Таблица 1

Количественная характеристика клеток на единицу площади структурно-функциональных зон лимфатического узла молодых и старых животных

Клетки	Группы животных	
	Молодые (3–4 мес.)	Старые (12–15 мес.)
	1	2
Лимфоидные узелки с герминативным центром		
Лимфобласты	$3,70 \pm 0,24$	$2,97 \pm 0,13$
Средние лимфоциты	$3,0 \pm 0,12$	$5,0 \pm 0,24^*$
Малые лимфоциты	$11,82 \pm 0,24$	$8,13 \pm 0,35^*$
Макрофаги	$2,60 \pm 0,24$	$2,83 \pm 0,30$
Мозговые тяжи		
Плазмобласты	$3,60 \pm 0,12$	$3,67 \pm 0,11$
Зрелые плазмоциты	$3,81 \pm 0,12$	$2,40 \pm 0,41^*$
Малые лимфоциты	$4,60 \pm 0,24$	$5,50 \pm 0,35$
Средние лимфоциты	$3,0 \pm 0,12$	$2,83 \pm 0,30$
Макрофаги	$5,0 \pm 0,13$	$3,67 \pm 0,30^*$
Ретикулярные клетки	$1,23 \pm 0,11$	$1,50 \pm 0,13$
Эозинофильные гранулоциты	$0,67 \pm 0,09$	$1,40 \pm 0,11^*$
Паракорттекс		
Бласты	$5,20 \pm 0,18$	$5,17 \pm 0,30$
Средние лимфоциты	$4,80 \pm 0,29$	$3,12 \pm 0,30^*$
Малые лимфоциты	$12,0 \pm 0,47$	$8,01 \pm 0,30^*$
Ретикулярные клетки	$1,80 \pm 0,24$	$1,67 \pm 0,08$
Плазмоциты	$1,40 \pm 0,12$	$2,67 \pm 0,13^*$
Макрофаги	$5,0 \pm 0,83$	$1,01 \pm 0,30^*$
Эозинофильные гранулоциты	$0,49 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,12$
Мозговой синус		
Малые лимфоциты	$4,0 \pm 0,27$	$7,01 \pm 0,41^*$
Макрофаги	$3,0 \pm 0,13$	$4,33 \pm 0,30^*$
Ретикулярные клетки	$1,80 \pm 0,12$	$2,33 \pm 0,08^*$
Плазмоциты	$3,80 \pm 0,30$	$3,00 \pm 0,13$
Эозинофильные гранулоциты	$0,40 \pm 0,06$	$0,67 \pm 0,12$

Примечание: (здесь и в табл. 2) * – $p_{1-2} < 0,05$.

ции притока в лимфатический узел и оттоком лимфы из него. Расширенные синусы являются структурной предпосылкой для замедления тока лимфы и снижения дренажно-детоксикационной и иммунной функций лимфатического узла.

К возрастным изменениям, которые связаны с преобразованием интранодулярной структуры, можно отнести различия в клеточном составе паховых лимфатических узлов геронтов (табл. 1). Для геронтов характерно снижение числа бластов в лимфоидных узелках при сохранении их числа в мягкотных тяжах и паракортексе; повышение числа средних лимфоцитов в лимфоидных узелках и уменьшения их в паракортексе; снижение числа малых лимфоцитов в лимфоидных узелках и паракортексе с увеличением в мозговом синусе; увеличение числа макрофагов в мягкотных тяжах и паракортексе; уменьшение числа плазмочитов в мягкотных тяжах при неизменном числе плазмобластов (табл. 1). Имеет место снижение бластной трансформации из-за сниженного ответа на антигены, поступающие из региона лимфосбора, при задержке перехода среднего лимфоцита (пролимфоцит) в бласт. У геронтов наблюдается редукция лимфоцитарного пула, что служит указанием на снижение иммуногенеза в лимфатическом узле. В структуре лимфатического узла обнаруживаются широкие периваскулярные зоны, которые лишены клеточных элементов и указывают на ухудшение миграции лимфоцитов из крови в ткань лимфатического узла и обратно. Для геронтов характерна низкая макрофагальная реакция.

Изменение плотности лимфоцитов в структурно-функциональных зонах лимфатического узла напрямую связано с формированием типа иммунного ответа [12]. В условиях старения происходит уменьшение клеточной плотности, что при проведении морфофункциональной оценки лимфатического узла позволило отметить снижение иммунного ответа по клеточному типу.

Фитотерапия оказывает существенное влияние на структуру и цитоархитектонику лимфатического узла в зависимости от возраста животного. Бифлавоноиды растений оказывают влияние на процессы дифференцировки и пролиферации лимфоидных клеток. Прием фитосбора молодыми животными не оказывает существенного влияния на размерность структурно-функциональных зон лимфатического узла. У геронтов прием фитосбора влияет на размерность нескольких структурно-функциональных зон лимфатического узла. Наблюдается уменьшение в 1,76 раза площади коркового плато при увеличении в 1,21 раза площади паракортекса (рис. 2). Изменение площади коркового плато и паракортекса можно связать миграцией лимфоидных клеток внутри лимфатического узла и указывает на активацию клеточного звена иммунитета. Паракортекс является структурно-функциональной зоной лимфатического узла, которой отводится важная роль в Т-клеточном иммунном ответе. В условиях приема фитосбора наблюдается тенденция к увеличению размера лимфоидных узелков (рис. 2). Наблюдается формирование лимфоидных узелков на границе коркового и мозгового веществ в лимфатическом узле. Уменьшается в 1,3 раза размер синусной системы в условиях приема фитосбора у геронтов. Компактный морфотип лимфатического узла сохраняется, так как корково-мозговое соотношение мало изменилось после фитотерапии, как и не исчезли элементы склерозирования в лимфоидной паренхиме вокруг синусов. Характер изменения основных структурно-функциональных зон сопровождается увеличением на 18,82 % общей площади лимфатического узла геронтов.

У старых животных наблюдается изменение цитологии структурно-функциональных зон в условиях фитотерапии в сравнении с показателями у старых животных, не принимавших фитосбор (табл. 2): в лимфоидных узелках статистически значимое увеличение в 1,85 раза лимфобластов,

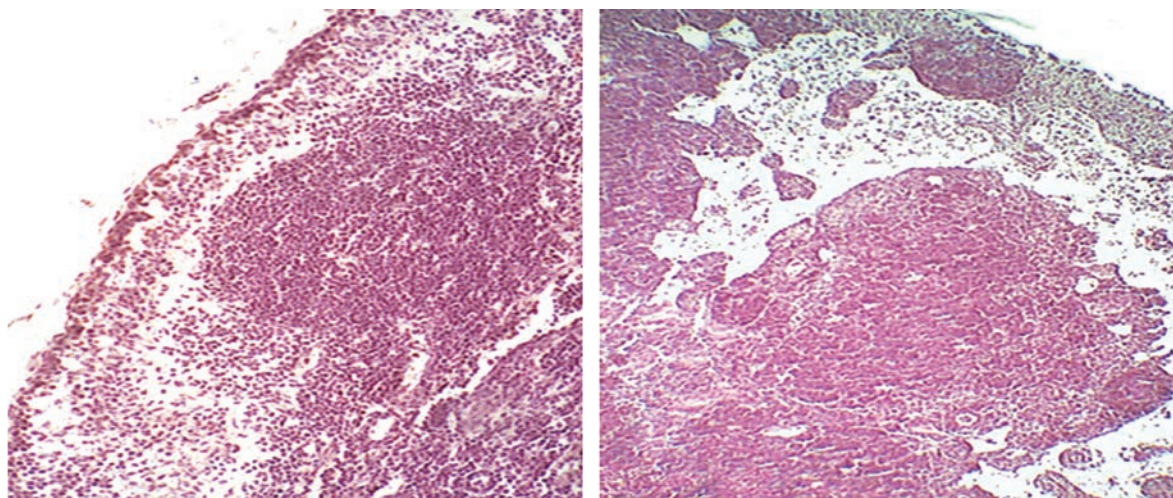


Рис. 2. Увеличенный лимфоидный узелок в корковом плато и гиперплазия паракортекса на фоне расширенной синусной системы лимфатического узла в условиях фитотерапии у геронтов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ок. $\times 7$, об. $\times 10$.

в 1,21 – 1,47 раза малых и средних лимфоцитов, в 1,94 макрофагов на единицу площади; в паракортексе статистически значимое уменьшение в 1,41 раз лимфобластов, в 1,44 раза средних лимфоцитов, в 1,52 раза эозинофильных гранулоцитов, увеличение в 1,3 ретикулярных клеток, в 1,62 раза макрофагов, в 2,5 раза плазмоцитов на единицу площади; в мягкотных тяжах статистически значимо увеличение в 1,88 зрелых плазмоцитов (рис. 3), в 1,45 раза ретикулярных клеток, уменьшение в 2 раза эозинофильных гранулоцитов на единицу площади; в мозговом синусе статистически значимо уменьшается в 1,37 раза макрофагов на единицу площади. Обращает внимание, что после фитотерапии чаще наблюдаются митозы клеток.

Имеет место прямая зависимость между насыщенностью иммунокомпетентными клетками структурно-функциональных зон лимфатиче-

ского узла и типом иммунного ответа [12]. В результате фитотерапии происходит увеличение плотности лимфоцитов в корковом веществе и плазмоцитов в мягкотных тяжах (рис. 3), что определяет иммунный ответ по гуморальному типу. В тоже время насыщенность лимфоцитами паракортикальной зоны обеспечивает интенсивность ответа по клеточному типу после проведенной фитотерапии. В результате проведения фитотерапии имеет место усиление иммунного ответа по смешанному типу при морфофункциональной оценке иммунологического состояния лимфатического узла геронтов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Морфологическая картина пахового лимфатического узла у геронтов отражает снижение его иммунной функции из-за процессов склерозиро-

Таблица 2
Количественная характеристика клеток на единицу площади структурно-функциональных зон лимфатического узла геронтов в условиях приема биоактивного фитосбора (БАФ)

Клетки	Геронты	
	Без коррекции	БАФ
	1	2
Лимфоидные узелки с герминативным центром		
Лимфобласты	2,97 ± 0,13	5,50 ± 0,25*
Средние лимфоциты	5,0 ± 0,24	7,33 ± 0,71*
Малые лимфоциты	8,13 ± 0,35	14,33 ± 0,47*
Макрофаги	2,83 ± 0,30	5,50 ± 0,24*
Мозговые тяжи		
Плазмобласты	3,67 ± 0,11	3,63 ± 0,12
Зрелые плазмоциты	2,40 ± 0,41	4,50 ± 0,35*
Малые лимфоциты	5,50 ± 0,35	6,0 ± 0,35
Средние лимфоциты	2,83 ± 0,30	2,17 ± 0,36
Макрофаги	3,67 ± 0,30	4,33 ± 0,24
Ретикулярные клетки	1,50 ± 0,13	2,17 ± 0,13*
Эозинофильные гранулоциты	1,40 ± 0,11	0,33 ± 0,07*
Паракортекс		
Лимфобласты	5,17 ± 0,30	3,67 ± 0,09*
Средние лимфоциты	3,12 ± 0,30*	2,17 ± 0,13*
Малые лимфоциты	8,01 ± 0,30*	6,00 ± 0,35*
Ретикулярные клетки	1,67 ± 0,08	2,17 ± 0,12
Макрофаги	2,67 ± 0,13*	4,33 ± 0,24*
Плазмоциты	1,01 ± 0,30*	2,50 ± 0,35*
Эозинофильные гранулоциты	0,50 ± 0,12	0,33 ± 0,09
Мозговой синус		
Малые лимфоциты	7,01 ± 0,41	6,50 ± 0,30
Макрофаги	4,33 ± 0,30	3,17 ± 0,24*
Ретикулярные клетки	2,33 ± 0,08	2,00 ± 0,24
Плазмоциты	3,00 ± 0,13	3,17 ± 0,12
Эозинофильные гранулоциты	0,67 ± 0,12	0,50 ± 0,09

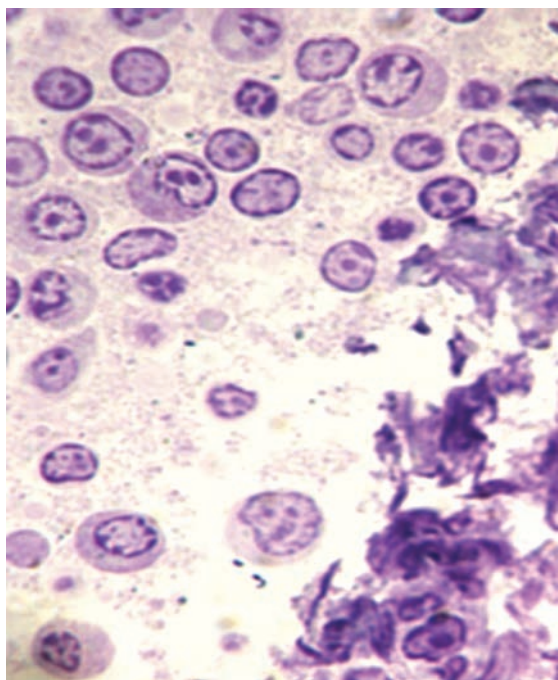


Рис. 3. Плазмочитарная реакция в лимфатическом узле геронтов. Фитотерапия. Окраска толуидиновым синим. Увеличение ок. $\times 7$, об. $\times 40$.

вания, компактизации и разряжения структуры паракортикальной зоны в условиях снижения процессов лимфопоэза. Лимфатический узел испытывает состояния функциональной напряженности при наличии морфологических эквивалентов компенсации. При приеме фитосбора у геронтов формируется смешанный тип иммунного ответа при усилении клеточного звена иммуногенеза, исходя из особенностей лимфопролиферативных изменений на фоне увеличения размера паракортекса и сохранности соотношения лимфоидных узелков с герминативным центром и без него. Полученные результаты имеют практическое значение для использования иммуноориентированной фитотерапии в программах эндозкологической реабилитации и антистарения.

Сведения об авторах

Горчакова Ольга Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии лимфатической системы Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, кандидат медицинских наук (630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2; e-mail: gorchak@soramn.ru)

Горчаков Владимир Николаевич – заведующий лабораторией функциональной морфологии лимфатической системы Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор кафедры фундаментальной медицины Новосибирского государственного университета (630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2; тел. (383) 335-95-31; e-mail: gorchak@soramn.ru)

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
2. Альтман Д.Ш., Теплова С.Н., Кочеткова Н.Г., Солодянкина М.Е. и др. Темпы старения и показатели иммунного статуса у участников современных войн // Альманах Геронтология и гериатрия. — 2003. — Вып. 2. — С. 195–196.
3. Аруин Л.И. Структурные особенности компенсаторно-приспособительных процессов // Общая патология человека. — М., 1990. — С. 233–290.
4. Белянин В.А., Цыплаков Д.Э. Диагностика реактивных гиперплазий лимфатических узлов. — СПб.; Казань, 1999. — 328 с.
5. Горчаков В.Н., Саранчина Э.Б., Анохина Е.Д. Фитолимфонутирициология // Прак. фитотерапия. — 2002. — № 2. — С. 6-9.
6. Корсун В.Ф., Кубанова А.А., Соколов С.Я. Фитотерапия экземы. — Мн.: Навука і Тэхніка, 1995. — 276 с.
7. Левин Ю.М. Прорыв в эндозкологическую медицину. Новый уровень врачебного мышления и эффективной терапии. — М.: ОАО Щербинская типография, 2006. — 200 с.
8. Танасийчук И.С. Цитоморфологическая характеристика клеточного состава лимфатических узлов в норме // Цитология и генетика. — 2004. — Т. 38, № 6. — С. 60–66.
9. Топорова С.Г. Особенности системы око-локлеточного гуморального транспорта при старении // Альманах Геронтология и гериатрия. — 2003. — Вып. 2. — С. 90–94.
10. Cottier H., Turk J., Sobin L. Предложения по стандартизации описания гистологии лимфатического узла человека в связи с иммунологической функцией // Бюл. ВОЗ, 1973. — С. 372–377.
11. Dencla W.D. Interactions between age and neuroendocrine and immune system // Exp. Pathol. — 1979. — Vol. 17. — P. 538–545.
12. Isaacson P.G. Normal structure and function of lymph nodes // In: Oxford Textbook of Pathology (ed. J.O'D. McGee, P.G. Isaacson, N.A. Wright). — Oxf. Univ. Press, 1992. — P. 1745–1756.

Е.Н. Ермолаева, Л.В. Кривохижина, Е.Ф. Сурина-Марышева

ВЛИЯНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ОСТРОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ СУБМАКСИМАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ

Челябинская государственная медицинская академия (Челябинск)

В эксперименте на животных было выявлено, что применение церулоплазмина при острой физической нагрузке субмаксимальной мощности приводит к увеличению нейтрофильного пула лейкоцитов с изменением их функциональной активности. Увеличивается способность к образованию лейкоцитарных агрегатов на фоне снижения хемотаксиса. Фагоцитарная функция изменяется неоднозначно — активность фагоцитоза растет, а интенсивность снижается.

Ключевые слова: острая физическая нагрузка, лейкоцитарные агрегаты, хемотаксис, фагоцитоз

EFFECT OF CERULOPLASMIN THE QUANTITATIVE COMPOSITION AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF LEUKOCYTES IN ACUTE PHYSICAL LOAD SUBMAXIMAL POWER

E.N. Ermolayeva, L.V. Krivokhizhina, E.F. Surina-Marysheva

Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk

In experiments on animals have shown that the use of ceruloplasmin in acute submaximal exercise capacity leads to an increase in neutrophilic leukocytes pool with a change in their functional activity. Increased ability to form aggregates of leukocyte, decrease in chemotaxis. Phagocytic function changes ambiguously — activity of phagocytosis increases, and the intensity decreases.

Key words: acute physical activity, leukocyte aggregates, chemotaxis, phagocytosis

Адаптация к физическим нагрузкам обеспечивается функциональными сдвигами и структурными перестройками, которые имеют целесообразность для жизнедеятельности организма. Характер, направление и величина адаптивной перестройки систем организма зависят от интенсивности мышечной деятельности. Изменения затрагивают и лейкоцитарное звено периферической крови. Система профессиональных фагоцитов контролирует «первую линию обороны» организма против неблагоприятных воздействий, что обеспечивается за счет их способности к локомоции, фагоцитозу, киллингу и перевариванию поглощенных частиц, синтезу и секреции регуляторных цитокинов, запуская и секретируя общие ответные реакции организма на альтерацию [4, 6]. Интенсивные физические нагрузки, превышающие адаптационные возможности организма, нередко приводят к нарушениям иммунного гомеостаза в организме с последующим развитием утомления и снижением физической работоспособности. Механизмы развития их до конца не изучены, что лимитирует разработку новых методов диагностики и коррекции этого явления.

Цель работы исследовать влияние церулоплазмина на количественный состав и функциональную активность лейкоцитов при острой физической нагрузке субмаксимальной мощности

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на 36 половозрелых белых беспородных крысах массой 180 — 200 г. Все исследования выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными при-

казом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977. Исследуемые животные были разделены на 3 группы. Первую из них (контрольную) составляли интактные крысы ($n = 8$). Во вторую группу (ОФН) вошли животные ($n = 14$), подвергавшиеся острой физической нагрузке субмаксимальной мощности. Крысам 3-й группы (ОФН + ЦП; $n = 14$), за 24 часа перед физической нагрузкой внутрибрюшинно вводили церулоплазмин (ЦП) в дозе 20 мг/кг массы тела, что составляло 50 % от его физиологического уровня в сыворотке крови. Крысам контрольной группы аналогично вводили физиологический раствор. Модель острой физической нагрузки воспроизводилась по методу А.Ф. Краснова, Г.И. Самодановой и др. [1]. Животные плавали в течение 4 минут с грузом массой 20 % от веса тела. Температура воды — 32 °С. Забор крови производился сразу после физической нагрузки внутрисердечно согласно правилам для гематологических исследований. Общее количество лейкоцитов в периферической крови определяли традиционным меланжерным методом; лейкограмму подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Паппенгейму [7]. Выделение лейкоцитов из цельной крови осуществляли по методу А. Воут [9], на градиенте плотности смеси фиколл-урографин (1,095 г/см³). Концентрацию клеток во взвеси довели до $1,00 \times 10^6$ /мл. Жизнеспособность лейкоцитов оценивали в тесте с 0,10% раствором красителя трипанового синего [11]. Для оценки процессов спонтанного клеточно-клеточного взаимодействия в крови использовали метод L.A. Kirschenbaum et al. [12]. Производили смешивание равных объемов выделенных клеточных суспензий. После инкубации в течение 1 часа

в условиях термостата (37 °С), используя традиционный меланжерный метод, подсчитывали общее количество лейкоцитарных агрегатов, дифференцируя их по размерам на малые (до трех клеток включительно) и большие (четыре и более клеток). В качестве красителя использовали 1,00% раствор нейтрального красного. Для изучения миграционной активности лейкоцитов использовали метод R.D. Nelson et al. (1975) в модификации Л.Я. Эберта и соавт. [1], основанный на оценке хемотаксиса лейкоцитов под агарозным гелем. В качестве хемотаксиса использовали суспензию полистирольного монодисперсного латекса (d 1,40 мкм) в стандартной концентрации 10^8 частиц/л. Фагоцитарную активность лейкоцитов оценивали по методу И.С. Фрейдлин [8], основанному на способности клеток захватывать частицы полистирольного монодисперсного латекса (d 1,40 мкм). Учитывали активность и интенсивность фагоцитоза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Острая физическая нагрузка субмаксимальной мощности сопровождается развитием миогенного лейкоцитоза (контроль — $7,18 \pm 0,11 \times 10^9/\text{л}$; ОФН — $11,24 \pm 0,68 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,01$). Миогенный лейкоцитоз обусловлен, главным образом, действием стресс-реализующих гормонов. Катехоламины, глюкокортикоиды действуют на стенку костно-мозговых синусоидов, стимулируя выход лейкоцитов из костного мозга в циркулирующую кровь, а также усиливают демаргинацию гранулоцитов и переход их из пристеночного в циркулирующий пул [10]. Применение церулоплазмينا на фоне острой физической нагрузки субмаксимальной мощности у животных опытной группы привело к достоверному еще большему увеличению общего количества лейкоцитов (контроль — $7,18 \pm 0,11 \times 10^9/\text{л}$; ОФН + ЦП — $12,29 \pm 1,71 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,01$).

Анализируя лейкограммы, полученные от животных, которым вводили церулоплазмин на фоне острой физической нагрузки, определили еще большой рост содержания нейтрофилов за счет палочкоядерных (контроль — $0,32 \pm 0,04 \times 10^9/\text{л}$; ОФН + ЦП — $1,09 \pm 0,12 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,01$) и сегментоядерных форм (контроль — $0,95 \pm 0,08 \times 10^9/\text{л}$;

ОФН + ЦП — $2,23 \pm 0,42 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,01$) в абсолютных величинах, а также абсолютный лимфоцитоз (контроль — $5,76 \pm 0,31 \times 10^9/\text{л}$; ОФН + ЦП — $8,63 \pm 0,63 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,01$). Количественная перестройка лейкоцитов крови может быть обусловлена рядом причин. В первую очередь, с влиянием церулоплазмينا на процессы выхода зрелых клеток из костного мозга и в периферическую кровь и изменением адгезивной способности лейкоцитов и эндотелиальных клеток. В работах сотрудников кафедры патологической физиологии ЧелГМА [2, 3] показаны эритропоэтический, тромбопоэтический и лейкопоэтический эффекты церулоплазмينا в условиях нормального и стимулированного кроветворения. В нашем исследовании, применение церулоплазмينا при острой физической нагрузке субмаксимальной мощности привело к аналогичным результатам. Произошло значимое увеличение количества нейтрофильных лейкоцитов, что свидетельствует о перераспределительном характере лейкоцитоза.

Следующим этапом исследование явилось изучение влияния церулоплазмينا на функциональную способность лейкоцитов при действии острой физической нагрузки. Введение церулоплазмينا на фоне физической нагрузки привело к достоверному увеличению количества лейкоцитарных агрегатов (контроль — $1,05 \pm 0,11 \times 10^9/\text{л}$; ОФН + ЦП — $1,59 \pm 0,23 \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$) преимущественно за счет больших форм. Увеличение количества малых форм по сравнению с контролем составило 36,7 %, а больших — 51,4 %. В основе лейкоцитарной агрегации лежат селективные адгезивные контакты по типу «роллинга». Формирование непрочных лейкоцитарных агрегатов обусловлено, по-видимому, увеличением количества активированных лейкоцитов.

Определяя локомоторную функцию лейкоцитов, у животных опытной группы с предварительным введением церулоплазмينا обнаружено достоверное снижение индекса хемотаксиса. Результаты представлены в таблице 1.

Ингибирующее влияние церулоплазмينا на локомоцию лейкоцитов на фоне физической нагрузки может быть обусловлено изменением про-

Таблица 1
Изменение функциональной активности лейкоцитов при введении церулоплазмينا на фоне острой физической нагрузки ($M \pm m$; y)

Показатель		Контроль (n = 8)	ОФН (n = 14)	ОФН + ЦП (n = 14)	p_1 p_2 p_3
Индекс хемотаксиса, у.е.		$1,08 \pm 0,04$ 0,05	$1,05 \pm 0,07$ 0,10	$0,83 \pm 0,06$ 0,08	$> 0,05$ $< 0,05$ $< 0,05$
Фагоцитоз	Активность фагоцитоза, %	$22,58 \pm 1,36$ 1,08	$32,23 \pm 1,59$ 3,36	$34,78 \pm 2,01$ 4,3	$< 0,01$ $< 0,01$ $> 0,05$
	Интенсивность фагоцитоза, у.е./кл	$2,98 \pm 0,21$ 0,44	$3,11 \pm 0,23$ 0,56	$2,56 \pm 0,37$ 0,31	$> 0,05$ $> 0,05$ $> 0,05$

Примечание: p_1 — достоверность между контрольной группой и ОФН; p_2 — достоверность между контрольной группой и ОФН + ЦП; p_3 — достоверность между ОФН и ОФН + ЦП.

дукции хемокинов под влиянием церулоплазмينا. На фоне увеличения емкости нейтрального пула и агрегационной способности происходит снижение двигательной активности клеток. Церулоплазмин является реактантом острой фазы, который повышается на 2–3-е сутки после острого воздействия. Так как церулоплазмин имеет специфические рецепторы не только на гепатоцитах, но и на поверхности моноцитов и лимфоцитов [5, 13], то он может влиять на секреторные процессы в лейкоцитах. Также возможно, что церулоплазмин сам или опосредовано через другие биологически активные вещества (IL-1, IL-8, TNF β , ФАТ) вмешивается в транслокацию адгезивных молекул на поверхности клеток: L — селектина на v_2 — интегринов на лейкоцитах; Р- и Е- селектинов на эндотелиальных клетках, ускоряя тем самым процесс локомоции. Возможно также, что активация гранулоцитов, происходящая под влиянием церулоплазмينا, сопровождается ростом внутриклеточного содержания ионов кальция, что увеличивает количество актино-миозиновых мостиков в сократительном аппарате клетки и ускоряет передвижение.

Применение церулоплазмينا у животных на фоне острой физической нагрузки привело к достоверному увеличению активности фагоцитоза, тогда как его интенсивность оказалась пониженной. Необходимо отметить, что у животных обеих экспериментальных групп показатели фагоцитоза были достоверно выше контрольных показателей. В литературе имеются сведения о том, что церулоплазмин, связываясь с нейтрофилами и моноцитами, усиливает поглотительную фазу фагоцитоза, не оказывая влияния на опсонизацию перевариваемых частиц [13]. Известно, что интенсивность фагоцитоза отражает адгезирующую способность фагоцитирующих клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение церулоплазмينا при острой физической нагрузке субмаксимальной мощности приводит к увеличению нейтрофильного пула лейкоцитов с изменением их функциональной активности. Увеличивается способность к образованию лейкоцитарных агрегатов на фоне снижения хемотаксиса. Фагоцитарная функция изменяется неоднозначно — активность фагоцитоза растет, а интенсивность снижается. Выявленные изменения способствуют улучшению мощности защитных систем при действии стрессогенных факторов, каким является острая физическая нагрузка субмаксимальной мощности.

Сведения об авторах

Ермолаева Елена Николаевна — доцент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧелГМА, кандидат медицинских наук (454000, г. Челябинск, ул. Воровского, 66; тел. сот.: 8-9517810486; e-mail: ermen33@mail.ru)

Кривохижина Людмила Владимировна — заведующая кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧелГМА, доктор медицинских наук, профессор

Сурина-Марышева Елена Федоровна — старший лаборант кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧелГМА, кандидат медицинских наук

ЛИТЕРАТУРА

1. Краснов А.Ф., Самоданова Г.И., Усик С.В., Яковлев Н.Н. Уровень молочной кислоты в крови как показатель реакции на физические нагрузки // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. — 1978. — Т. 64, № 4. — С. 538–542.
2. Кантюков С.А., Сергеев В.И., Кривохижина Л.В., Осиков М.В. Влияние церулоплазмينا на количественный состав и функциональную активность лейкоцитов у интактных животных // Эфферентная терапия. — 2003. — № 2. — С. 56–59.
3. Кривохижина Л.В., Осиков М.В., Ермолаева Е.Н., Солодовникова О.А. и др. Церулоплазмин — регулятор клеточного состава периферической крови // Дизрегуляторная патология органов и систем: тез. докл. III Рос. конгр. по патофизиологии. — М., 2004. — С. 70.
4. Маянский А.Н., Галиуллин А.Н. Реактивность нейтрофила. — Казань: изд-во Казан. ун-та, 1984. — 158 с.
5. Пучкова Л.В., Сасина Л.К., Алейникова Т.Д., Гайцхоки В.С. Взаимодействие церулоплазмينا с рецептором плазматической мембраны CV-1 и его регуляция по типу обратной связи // Бюл. эксп. биологии и медицины. — 1995. — Т. 119, № 4. — С. 417–420.
6. Теплова С.Н., Алексеев Д.А. Секреторный иммунитет. — Челябинск, 2000. — 200 с.
7. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. — София, 1968. — 1064 с.
8. Фрейдлин И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека. — Л., 1986. — 272 с.
9. Хейфец Л.Б., Абалакин В.А. Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл // Лабораторное дело. — 1973. — № 10. — С. 579–581.
10. Bainton D.F. Morphology of neutrophils, eosinophils and basophils // Williams Hematology. 5th ed. — 1995. — P. 753–765.
11. Hayhoe F.G.J., Quaglini D. Haematological cytochemistry. — London: Churchill Livingstone, 1994. — 673 p.
12. Kirschenbaum L.A., Adler D., Astiz M.A. Mechanisms of platelet-neutrophil interactions and effects on cell filtration in septic shock // Shock. — 2002. — Vol. 17, N 6. — P. 508–512.
13. Seniuk O.F., Skorobogat'ko O.V., Tarasenko P.D. Study of physiological functions of human ceruloplasmin. The effect of ceruloplasmin on immunocytes in a normal state and in pathology // Biochimica. — 1994. — Vol. 59, N 10. — P. 1503–1510.

В.В. Здор, Е.В. Маркелова

СОСТОЯНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ У КРЫС ВИСТАР*Владивостокский государственный медицинский университет (Владивосток)*

Роль иммунологического регулирования и возможности его контроля с помощью оценки функции регуляторных Т-лимфоцитов актуальны в настоящее время, учитывая распространенность аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, в частности болезни Грейвса (БГ). Доступными для практической оценки нарушения толерантности Т- и В-лимфоцитов при БГ являются сывороточные уровни Th1- и Th2-маркерных цитокинов. В созданной модели экзогенного тиреотоксикоза у животных (крысы Wistar) получили достоверное повышение сывороточного уровня ИЛ-1 β , ИФН- γ и ИЛ-10 сопряженное с повышением содержания тиреоидных гормонов, а также достоверное нарушение соотношения про- и противовоспалительных цитокинов в супернатанте щитовидных желез животных на фоне тиреотоксикоза со смещением в сторону Th1-маркерных цитокинов.

Ключевые слова: эксперимент, крысы, тиреотоксикоз, цитокины

CYTOKINE PROFILE IN WISTAR RATS WITH EXPERIMENTAL THYREOTOXICOSIS

V.V. Zdor, E.V. Markelova

Vladivostok State Medical University, Vladivostok

In view of abundance of autoimmune diseases of thyroid gland, Graves' disease in particular, the role of immune regulation and the possibility of controlling it by estimating the function of regulatory T-lymphocytes are important questions today.

Available for practical estimation of T- and B- lymphocytes tolerance disorder in GBD are serum levels of Th1- and Th2-marker cytokines. Experimental exogenous thyreotoxicosis in Wistar rats showed significant increase in serum IL-1 β , IFN- γ and IL-10 depending on the increase of thyroid hormones, as well as significant changes in correlation between pro-and anti-inflammatory cytokines with the shift towards Th1-marker cytokines in supernatant thyroid glands of the animals with thyreotoxicosis.

Key words: experiment, rats, thyreotoxicosis, cytokines

Болезнь Грейвса (БГ) — системное органоспецифическое аутоиммунное заболевание, сопровождающееся выработкой аутоантител к рецептору тиреотропного гормона, клинически проявляющееся синдромом тиреотоксикоза в сочетании с экстратиреоидной патологией [1, 4, 5]. В течение последних десятилетий сделано несколько очень важных открытий в изучении основных этапов патогенеза аутоиммунного тиреотоксикоза. В исследованиях представлены данные о роли генетически детерминированного нарушения иммунологического регулирования и возможности его контроля с помощью регуляторных Т-лимфоцитов (Трег) [7, 10, 11]. Однако, существование различий в свойствах и структуре регуляторных клеток [8, 9] не позволяет специфически применять в клинической практике препараты для усиления функциональной или пролиферативной активности Трег из-за неопределенности в генезе нарушения толерантности у Т- и В-лимфоцитов при гипертиреозе. Для комплексного мониторинга течения БГ, адекватности проводимого лечения необходимы дополнительные достоверные критерии оценки развития и прогнозирования течения болезни.

Таковыми доступными для применения критериями оценки могут быть секретируемые Трег цитокины, которые, как представлено в многочисленных исследованиях, ни только являются продуктами функционирования Т-клеток, но и сами

образуют самостоятельную систему регуляции всего гомеостаза [2, 6]. Особый интерес на наш взгляд представляют такие аспекты проблемы, как особенности влияния функциональной активности щитовидной железы на избыточную продукцию Th1- и Th2-маркерных цитокинов и возможности оценки взаимодействия иммунной и эндокринной систем при наличии антигенной стимуляции Т-лимфоцитов, в том числе без специфической стимуляции аутоантителами.

Целью работы явилась оценка влияния экзогенного тиреотоксикоза у белых крыс Вистар на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови и локально в ткани щитовидной железы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на взрослых (6-месячных) белых крысах-самках породы Вистар с массой тела 245 ± 15 г. В первой части эксперимента животные были разделены на три группы: у животных первой группы (в количестве 6 голов) вызывался экспериментальный гипертиреоз путем введения натошак за час до утреннего кормления с помощью внутрижелудочного зонда гормона щитовидной железы лиотиронина (трийодтиронина) в дозе 50 мкг/кг массы тела, растворенного в 1 мл физиологического раствора, длительность эксперимента — 30 суток. Вторая группа (6 голов)

получала аналогичным путем растворенный левотироксин (тетрайодтиронин) в дозе 50 мкг/кг массы тела также в течение 30 суток. У первой и второй групп, помимо лабораторных показателей, были оценены: ректальная температура и масса тела до начала и в конце исследования. Третья группа (6 голов) была контрольной.

Животные содержались до начала эксперимента в условиях вивария Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН РФ (г. Владивосток) в течение 6 месяцев без каких-либо манипуляций в стандартных условиях обитания и питания. Применяемые методы обезболивания животных при взятии крови и декапитации проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755 и приложение к приказу Министерства высшего и среднего специального образования СССР от 13.11.84 г. № 742). У всех животных исходно и в конце эксперимента оценивались показатели сывороточного уровня цитокинов: ИЛ-1 β , ИФН- γ и ИЛ-10 (видоспецифичные диагностические наборы «R&D Diagnostics Inc.», США) методом твердофазного ИФА и определялись показатели сывороточного уровня свободных Т3, Т4 (fТ3; fТ4) методом иммуноферментного анализа (с помощью диагностических наборов фирмы «F. Hoffmann-La Roche», Швейцария). Данные цитокины (ИЛ-1 β , ИФН- γ , ИЛ-10) определялись также в супернатанте щитовидной железы, полученном после декапитации наркотизированных крыс при окончании эксперимента. Анализ полученных результатов проводился при помощи программы SPSS v.16, выборки проверялись на нормальность распределения при помощи критерия Шапиро – Уилка, применяли U-критерий. Критический уровень значимости был 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При осмотре и обследовании животных из контрольной группы (3-я группа) выявлено, что их масса тела (247 ± 12 г) и ректальная температура

($37,8 \pm 0,1$ °C) как исходно, так и по завершению эксперимента существенно не изменились. В отличие от контрольной группы, у животных, получавших лиотиронин и левотироксин (1-я и 2-я группы) отмечалось снижение массы тела в динамике в среднем на 15 ± 6 г (6,3 % от исходной массы тела) за 30 дней эксперимента. Ректальная температура в группах с гипертиреозом была достоверно выше, чем в контрольной группе, и составила к концу эксперимента $39,1 \pm 0,2$ °C ($p < 0,05$). Не было выявлено статистически значимых различий ректальной температуры у животных 1-й и 2-й группы.

Определение уровней циркулирующих fТ3 и fТ4 у крыс Вистар показал, что в контрольной группе концентрация тиреоидных гормонов находилась в следующих пределах: уровень свободного Т3 составил $5,25 \pm 1,65$ пмоль/л, свободного Т4 – $15,73 \pm 2,29$ пмоль/л, что достоверно отличалось от показателей в опытных группах, принимавших тиреоидные гормоны. В 1-й группе аналогичные показатели были выше (fТ3 = $7,25 \pm 1,05$ пмоль/л и fТ4 = $52,43 \pm 12,17$ пмоль/л), чем во второй группе – $6,90 \pm 1,85$ пмоль/л и $48,13 \pm 11,60$ пмоль/л соответственно, но статистически достоверной разницы между опытными группами не было установлено ($p > 0,05$).

Особенно интересными, на наш взгляд, были показатели про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИФН- γ и ИЛ-10) в сыворотке крови экспериментальных животных, а также содержание указанных медиаторов в супернатанте щитовидных желез крыс (табл. 1).

Наиболее значимые различия в уровне провоспалительных цитокинов у опытных животных и контрольной группы отмечались в сыворотке крови (табл. 1).

Так, содержание ИЛ-1 β в сыворотке крови животных при экзогенном тиреотоксикозе достоверно превышало показатели здоровых крыс – $26,98 \pm 8,81$ против $6,75 \pm 1,59$ пг/мл ($p < 0,05$). При расчете – U-критерий (Манна – Уитни) был равен 46. Сравнивая показатели в группах, принимавших лиотиронин и левотироксин:

Таблица 1
Показатели уровня оппозиционных цитокинов в сыворотке крови и супернатанте щитовидных желез крыс Wistar

Показатели, пг/100 мкг белка		Медиана показателей цитокинов у групп (Ме)	
		Контрольная группа, n = 6	Группа с тиреотоксикозом, n = 12
Сыворотка, пг/мл	ИЛ-10	5,62 (2,68–18,20)	16,59 (11,80–28,08)**
	ИЛ-1 β	1,90 (0,01–8,98)	15,42 (0,80–38,20)*
	ИФН- γ	5,96 (4,41–10,06)	19,58 (10,06–68,32)**
Супернатант, пг/100 мкг белка	ИЛ-10	25,07 (1,94–40,52)	8,19 (5,39–20,48)
	ИЛ-1 β	17,31 (16,69–64,24)	19,26 (12,83–42,82)
	ИФН- γ	16,55 (14,87–163,28)	92,91 (29,84–133,13)

Примечание: * – статистическая значимость различий между показателями ($p < 0,05$ по U- критерию Манна – Уитни).
** – $p < 0,01$ по U-критерию Манна – Уитни.

$Me^1 = 21,80$ ($15,42 - 38,20$) против $Me^2 = 10,09$ ($0,80 - 17,87$) пг/мл, ($p < 0,01$). Сравнивая с группой контроля — $Me^3 = 1,90$ ($0,01 - 8,98$) пг/мл, ($p < 0,05$).

При анализе содержания провоспалительного ИЛ-1 β в супернатанте щитовидных желез животных в конце эксперимента получена другая картина: при достоверно более высоком, чем в сыворотке крови, уровне ИЛ-1 β в супернатанте ($37,65 \pm 7,30$ пг/100 мкг белка против $6,75 \pm 1,59$ пг/мл; $p < 0,05$) группы контроля, в группах с гипертиреозом (1-я и 2-я группы) как в супернатанте, так и в сыворотке крови определялись соизмеримые значения ИЛ-1 β : $29,97 \pm 5,25$ пг/100 мкг белка и $26,98 \pm 11,75$ пг/мл сыворотки; $p > 0,05$.

При рассмотрении результатов в двух опытных группах, более высокие значения цитокина в супернатанте зафиксированы в 1-й группе: $Me^1 = 42,82$ ($12,83 - 52,76$) против $Me^2 = 17,31$ ($13,38 - 19,26$) пг/100 мкг. Сравнивая с группой контроля — $Me^3 = 17,31$ ($16,69 - 64,29$) пг/100 мкг ($p > 0,05$), можно предположить, что продукция ИЛ-1 β осуществляется при экспериментальном тиреотоксикозе в основном экстрагиреодными лимфоцитами, стимулированными также экстрагиреодными гормонами (в основном трийодтиронином), вводимыми *per os*.

В результате нашего эксперимента были получены интересные данные о сывороточном уровне ИФН- γ — он был достоверно более высок в группе животных с гипертиреозом ($54,56 \pm 11,67$ пг/мл против $7,41 \pm 0,90$ пг/мл) по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$). При расчете — U-критерий (Манна — Уитни) был равен 34; $p < 0,01$.

При анализе содержания ИФН- γ в супернатанте щитовидных желез крыс Wistar достоверных отличий между гипертиреодными животными и контрольной группой выявлено не было: $Me^{1'2} = 92,91$ ($29,84 - 133,13$) пг/100 мкг белка против $Me^3 = 16,55$ ($14,87 - 163,28$) пг/100 мкг ($p > 0,05$). Однако если при сравнении медиан показателей ИФН- γ здоровых животных в сыворотке и супернатанте было установлено достоверное превышение показателей в супернатанте ($16,55$ ($14,87 - 163,28$) пг/100 мкг против $5,96$ ($4,41 - 10,06$) пг/мл, ($p < 0,01$); при тиреотоксикозе показатели ИФН- γ были сравнимы — $92,91$ ($29,84 - 133,13$) пг/100 мкг и $19,58$ ($10,06 - 68,32$) пг/мл ($p > 0,05$).

Интерлейкин-10 (ИЛ-10) у грызунов в большей степени отвечает за иммуносупрессивную роль при гиперактивности воспалительных реакций и синтезируется активированными Th2 [2, 3, 6]. При тиреотоксикозе у животных отмечалось достоверное превышение уровня сывороточного ИЛ-10 — $19,43 \pm 2,84$ пг/мл в контрольной группе ($p < 0,05$), что подтверждалось проверкой критерия Манна — Уитни ($22,5$; $p < 0,01$). Между показателями в первой и второй группах достоверных различий в уровне ИЛ-10 не выявлено ($p > 0,05$).

В супернатанте щитовидных желез существенных отличий содержания ИЛ-10 выявлено

не было, как и при сравнении количества цитокина при тиреотоксикозе в супернатанте и в сыворотке опытных групп: $13,23 \pm 2,31$ пг/мл и $19,43 \pm 2,83$ пг/100 мкг белка ($p > 0,05$). Достоверными были различия в содержании ИЛ-10 в группе контроля между супернатантом и сывороткой крови животных ($p < 0,01$), что свидетельствует в пользу прямой связи содержания тиреоидных гормонов и цитокинов, в данном случае противовоспалительного ИЛ-10.

Для уточнения вышесказанных предположений был проверен коэффициент соотношения содержания ИФН- γ / ИЛ-10 в сыворотке крови и супернатанте щитовидных желез животных: у здоровых животных данный показатель составил в сыворотке крови 1,1; в супернатанте 0,66; при тиреотоксикозе данные коэффициенты резко изменились (1,2 и 11,35 соответственно) в сторону повышения в супернатанте, что свидетельствует об активации Th1 в щитовидной железе у крыс при создании искусственного тиреотоксикоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований позволяют сделать ряд предварительных выводов:

1. Увеличение уровня сывороточных цитокинов в ответ на повышение содержания тиреоидных гормонов свидетельствует о вторичных изменениях в иммунитете, которые, вероятно, по закону обратной связи поддерживают имеющиеся изменения в гормональном статусе, влияя на Т-хелперы и стимулируя выработку антител.

2. Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов в норме у млекопитающих в сыворотке крови и в щитовидной железе приближено к 1, с незначительным преобладанием Th2-маркерных цитокинов *in situ*, тогда как при тиреотоксикозе происходит изменение соотношения на органном уровне в сторону Th1-маркерных цитокинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кандрор В.И. Механизмы развития болезни Грейвса и действия тиреоидных гормонов // Клиническая и эксперим. тиреодология. — 2008. — Т. 1. — С. 26 — 35.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — СПб.: ООО Изд-во Фолиант, 2008. — 552 с.
3. Клиническая иммунология и аллергология / под ред. А.В. Караулова. — М.: ООО Мед. информ. агентство, 2002. — 651 с.
4. Маркелова Е.В., Лазанович В.В. Аутоантитела и цитокиновый профиль у пациентов с болезнью Грейвса-Базедова и их динамика на фоне терапии тиронамидами // Мед. иммунология. — 2008. — Т. 10, № 2 — 3. — С. 245 — 250.
5. Фадеев В.В. Болезнь Грейвса // Рус. мед. журн. — 2002. — № 27. — С. 1262 — 1265.
6. Ярилин А.А. Иммунология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.
7. Fehervari Z., Sakaguchi S., Fehervari Z., Sakaguchi S. Cd4 + tregs and immune control // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 114. — P. 1209 — 1217.

8. Jiang H., Chess L. An integrated view of suppressor T cells subsets in immunoregulation // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 1114. — P. 1198–1208;
9. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses // Annu. Rev. Immunol. — 2004. — Vol. 22. — P. 532–562.
10. Volpe R. Immunoregulation in Autoimmune Thyroid disease // Thyroid. — 1994. — Vol. 4, N 3. — P. 373–377.
11. Weetman A.P. Autoimmune thyroid disease // Autoimmunity. — 2004. — Vol. 37. — P. 337–340.

Сведения об авторах

Здор Виктория Владимировна – врач-эндокринолог высшей категории, ассистент кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития, кандидат медицинских наук (690106, г. Владивосток, ул. Башидзе, 14, кв. 32; тел.: +79147919625; 84232446080)

Маркелова Елена Владимировна – заведующая кафедрой патофизиологии ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития, врач-иммунолог высшей категории, доктор медицинских наук, профессор (690088, г. Владивосток, ул. Жигура, 40, кв. 57; тел. моб.: +79147078559)

М.А. Княжева, С.Л. Рыжикова, Т.Г. Рябичева, Е.В. Маркова

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОБРАБОТАННЫХ КОФЕИНОМ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК НА ПАРАМЕТРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

В настоящем исследовании продемонстрировано, что обработка in vitro кофеином спленоцитов мышей (СВАхС57В1/6)F1 с пассивным типом поведения в «открытом поле» влияет на функциональную активность указанных клеток, изменяя спонтанную и стимулированную продукцию цитокинов; а внутривенное введение этих клеток мышам с указанным типом поведения сопровождается модуляцией параметров их моторной и исследовательской активности, характер которой зависит от использованной дозы препарата. При этом регистрируются определенные изменения в синтезе цитокинов клетками головного мозга мышей-реципиентов. Обсуждаются возможные механизмы модулирующего поведения животных-реципиентов влияния обработанных кофеином трансплантированных иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: кофеин, иммунокомпетентные клетки, ориентировочно-исследовательское поведение, цитокины

EFFECT OF TRANSPLANTATION OF IMMUNOCOMPETENT CELLS TREATED WITH CAFFEINE ON THE PARAMETERS OF THE NERVOUS SYSTEM FUNCTIONAL ACTIVITY

M.A. Knyazheva, S.L. Rizikova, T.G. Ryabicheva, E.V. Markova

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

It was demonstrated that in vitro treatment with caffeine splenocytes of mice (CBAxС57В1 / 6) F1 with a passive type of behavior in «open field» modifies the functional activity of these cells, manifested in changes in spontaneous and induced cytokine production; the intravenous injection of these cells is accompanied by modulation of the parameters of the motor and exploratory activity of recipients, the nature of which depends on the dose of caffeine. At the same time were shown some changes in the synthesis of cytokines by brain cells of mice -recipients. Possible mechanisms for modulating effect of transplanted immune cells on recipient's behavior were discussed.

Key words: caffeine, immune cells, exploratory behavior, cytokines

Новая интегративная наука, психонейроиммунология, появившаяся в последней трети XX века, с каждым годом все больше привлекает внимание исследователей. Это обусловлено тем, что понимание функционального единства иммунной и нервной систем, характера взаимодействия между ними открывает впечатляющие перспективы в самых различных областях экспериментальной и клинической медицины, позволяет пересмотреть лечебную тактику при борьбе со многими заболеваниями.

Нами изучается афферентное звено нейроиммунных взаимодействий, механизмы ответа мозга на активацию иммунной системы, участие иммуногенных факторов и клеточных элементов иммунной системы в регуляции его физиологических функций, в частности поведенческих реакций. Актуальность исследования афферентной организации взаимодействия иммунной и нервной систем, участия клеточных элементов иммунной системы и их цитокинов в регуляции поведенческих реакций, определяется как наличием широкого спектра неврозоподобных, аффективно-личностных, когнитивных и поведенческих нарушений, возникающих при вторичных иммунодефицитах вследствие повторных и хронически действующих экологических и социальных стрессоров, так и довольно активным

проведением в настоящее время различных иммунотерапевтических мероприятий, в том числе и клеточной терапии при различной патологии.

Ранее нами была продемонстрирована способность иммунокомпетентных клеток с определенными функциональными характеристиками направленно изменять уровень ориентировочно-исследовательского поведения у экспериментальных животных [3, 4, 5, 6, 12].

Целью настоящего исследования было изучение влияния трансплантации иммунокомпетентных клеток, обработанных экстракорпорально кофеином, на параметры поведения и синтез цитокинов в головном мозге животных-реципиентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Работа выполнена на мышах-самцах (СВАхС57В1/6)F1 в возрасте трех месяцев; средний вес животных составлял 18–20 грамм. Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 10 особей в каждой, не менее 2-х недель до начала эксперимента на стандартной диете, при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме. Исследования проводились в соответствии с правилами принятыми Европейской кон-

венцией по защите позвоночных животных используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и правилами лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 N 267).

Выделение культивирование и трансплантация спленоцитов

Животных забивали путем цервикальной дислокации; в стерильных условиях вскрывали брюшную полость, извлекали селезенки, очищали их от соединительной ткани и помещали во флаконы с охлажденной до 4 °С средой 199 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор») в объеме 5 мл на селезенку. Выделенные селезенки измельчали на мельчайшие кусочки при помощи ножниц. Образовавшуюся в результате измельчения суспензию клеток осторожно ресуспендировали с помощью шприца, для того, чтобы распались оставшиеся скопления клеток, центрифугировали 8 мин при 150 g. После удаления надосадочной жидкости, находящиеся в осадке спленоциты ресуспендировали в среде RPMI-1640. Жизнеспособность клеток определяли при помощи окраски трипановым синим.

Клетки селезенки обрабатывали *in vitro* кофеином из расчета 15 × 10⁶ клеток / 10 мкг/100 мкг/500 мкг/1000 мкг/2000 мкг кофеина в присутствии 3% FCS (Hyclone) в течение 25 минут. Затем, после 3-кратного отмывания, прекультивированные с кофеином спленоциты внутривенно вводили мышам-реципиентам в концентрации 15 × 10⁶ клеток в объеме 0,3 мл физиологического раствора на одно животное. В контрольной группе животных подготовка и трансплантация спленоцитов проводилась в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что последние культивировались без присутствия кофеина.

Изучение поведения животных в тесте «открытое поле»

Ориентировочно-исследовательское поведение животных оценивали в тесте «открытое поле» [2]. Для этого использовалась большая прямоугольная камера (100 × 100 см) с пластмассовыми стенками высотой 40 см. Полком служил лист белого пластика, на который черной краской нанесена решётка, делящая поле на 100 (10 × 10) равных квадратов. Освещение проводилось бестеневой лампой мощностью 100 Вт, расположенной на высоте 100 см над центром поля. Животное помещалось в угол камеры и регистрировалась его моторная и исследовательская активность в течение 5 минут с интервалом в 1 минуту. Для каждого животного подсчитывалось число пересеченных центральных и периферических квадратов, число вертикальных стоек (свободных и с опорой на стенку поля), суммарная горизонтальная и вертикальная двигательная активность. С целью определения степени эмоциональной реактивности регистрировалось число фекальных болюсов. Все эксперименты проводились в период времени с 10 до 14 часов.

В экспериментах использовались животные, характеризующиеся пассивным типом поведения в «открытом поле».

Определение цитокинов

Количественное содержание цитокинов определяли в образцах культуральных супернатантов трансплантируемых клеток, а также в лизатах головного мозга животных — реципиентов. Для этого спленоциты культивировали в концентрации 2 × 10⁶/мл в объеме 2 мл в 24-луночных планшетах для иммунологических исследований (Linbro) в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone), 2 mM L-глутамина (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»), 10 mM HEPES-буфера (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицина («Синтез») при добавлении к части спленоцитов (для стимуляции продукции ИФН-γ, ИЛ-4, и ИЛ-10) конканавалина А (Pharmacia) в концентрации 5 мкг/мл, а к части (для стимуляции продукции ФНОα, ИЛ-1β и ИЛ-6) липополисахарида *Escherichia coli* Serotype 055:B5 (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл.

Клетки культивировали в течение 24 часов для исследования продукции ИЛ-1β и ФНОα; 48 часов для ИЛ-4 и ИЛ-6 и 72 часов для исследования продукции ИФН-γ. По окончании периода культивирования клеточную суспензию собирали, клетки осаждали центрифугированием, а культуральный супернатант использовали для исследования.

Лизаты головного мозга животных получали путем гомогенизирования тканей в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) с добавлением 0,1% Triton X-100 (GERBU Biotechnik GmbH), с последующим центрифугированием в течение 3 минут при 10000 об./мин. Надосадочную жидкость использовали для исследования.

Содержание цитокинов в исследуемых образцах оценивали методом ИФА (ELISA) с использованием специфических компонентов к цитокинам мыши производства фирмы «R&D Systems» (Великобритания). Принцип анализа «sandwich» — вариант твердофазного трехстадийного иммуноферментного анализа на планшетах (моноклональные антитела на подложке, конъюгат поликлональных антител с биотином) по технологии, разработанной в ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) для определения цитокинов.

Статистическая обработка результатов

Результаты обрабатывались с применением парного критерия Манна — Уитни (компьютерная программа Statistica 6.0). Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансплантация спленоцитов, обработанных кофеином, сопровождалась неоднозначными изменениями параметров ориентировочно-исследовательского поведения мышей — реципиентов, характер которых определялся используемой концентрацией препарата (табл. 1).

Стимуляция моторного и исследовательского компонентов указанного поведения регистрировалась после трансплантации клеток, прекульти-

Таблица 1

Параметры ориентировочно-исследовательского поведения животных – реципиентов после трансплантации спленоцитов, прекультивированных с кофеином ($M \pm SD$)

Группы животных-реципиентов	Горизонтальная двигательная активность			Вертикальная двигательная активность		
	периферическая	центральная	суммарная	свободная	с опорой на стенку	суммарная
контроль ($n = 29$)	1,9 $\pm$ 2,8	0	0,9 $\pm$ 2,8	0	0,4 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,7
опыт 1 ($n = 21$)	72,5 $\pm$ 89,1*	0,8 $\pm$ 2,8*	73,3 $\pm$ 88,6*	3,6 $\pm$ 4,9*	0,8 $\pm$ 1,9*	4,4 $\pm$ 6,1*
опыт 2 ($n = 21$)	98,5 $\pm$ 126,0*	0,2 $\pm$ 0,6	93,9 $\pm$ 127,4*	0,3 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 3,1*	3,0 $\pm$ 3,1*
опыт 3 ($n = 12$)	25,5 $\pm$ 26,6*	0	25,5 $\pm$ 26,6*	0,3 $\pm$ 1,2	0,7 $\pm$ 1,2	1,0 $\pm$ 2,1
опыт 4 ($n = 14$)	6,2 $\pm$ 13,9	0	6,2 $\pm$ 13,9	0,5 $\pm$ 1,2	0	0,5 $\pm$ 1,2
опыт 5 ($n = 19$)	0,8 $\pm$ 2,9	0	0,8 $\pm$ 2,9	0,1 $\pm$ 0,5	0,01 $\pm$ 0,2	0,16 $\pm$ 0,68

Примечание: опыт 1 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрациях 10 мкг на одно животное; опыт 2 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрации 100 мкг на одно животное; опыт 3 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрации 500 мкг на одно животное; опыт 4 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрации 1000 мкг на одно животное; опыт 5 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрации 2000 мкг на одно животное.
* – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных.

вированных с кофеином в низких концентрациях (10 мкг, 100 мкг/мышь), о чем свидетельствует повышение параметров горизонтальной и вертикальной двигательной активности реципиентов в тесте «открытое поле». При трансплантации спленоцитов, обработанных кофеином в концентрации 500 мкг/мышь наблюдалась достоверная стимуляция только моторного компонента поведения за счет повышения показателей периферической горизонтальной двигательной активности. Трансплантация спленоцитов, обработанных кофеином в концентрации 1000 мкг/мышь и выше, вызывала у реципиентов дезорганизацию поведения.

Учитывая полученные результаты, в дальнейших экспериментах, для обработки трансплантируемых иммунокомпетентных клеток использовалась оптимальная концентрация кофеина, стимулирующая поведение мышей-реципиентов в «открытом поле», которая составляла 100 мкг/мышь.

При трансплантации указанных клеток у реципиентов наряду с повышением параметров ориентировочно-исследовательского поведения регистрировались определенные изменения уровня провоспалительных цитокинов в головном

мозге – снижение содержания ФНО α , ИЛ-1 β и ИНФ γ (табл. 2).

При оценке функциональной активности спленоцитов, обработанных *in vitro* кофеином в концентрации 100 мкг/мышь, было установлено, что указанное воздействие модулирует продукцию клетками цитокинов. Так, наблюдалось достоверное повышение спонтанной (6,77 $\pm$ 0,4 и 11,91 $\pm$ 1,3 пг/мл в супернатантах спленоцитов контрольной и опытной группы соответственно; $p < 0,05$) и стимулированной ЛПС продукции ФНО α (10,28 $\pm$ 3,0 и 17,14 $\pm$ 4,8 пг/мл в культуральных супернатантах спленоцитов контрольной и опытной группы соответственно; $p < 0,05$); а также ИЛ-6 (2,08 $\pm$ 0,3 и 4,90 $\pm$ 2,5 пг/мл в супернатантах спленоцитов контрольной и опытной группы соответственно; $p < 0,05$).

Известно, что циркулирующие цитокины способны проникать через гематоэнцефалический барьер и модулировать когнитивные функции, воздействуя на нейроны, нейрональное проведение сигнала и активность нейромедиаторных систем головного мозга. [7, 11, 13]. Ранее нами было показано, что трансплантация спленоцитов с высокой продукцией ИЛ-6 сопровождается у сингенных

Таблица 2

Содержание цитокинов (пг/мл) в лизатах головного мозга животных-реципиентов после трансплантации спленоцитов, прекультивированных с кофеином ($M \pm SD$)

Цитокины	Группы животных – реципиентов	
	Контрольная группа ($n = 10$)	Опытная группа ($n = 9$)
ФНО α	792,6 $\pm$ 22,3	53,6 $\pm$ 13,3*
ИЛ-1 β	705,8 $\pm$ 55,5	591,5 $\pm$ 73,0*
ИЛ-6	108,39 $\pm$ 11,2	102,11 $\pm$ 10,5
ИЛ-4	182,69 $\pm$ 27,2	183,21 $\pm$ 21,3
ИНФ γ	425,5 $\pm$ 65,3	307,6 $\pm$ 65,2*
ИЛ-10	366,11 $\pm$ 38,6	345,40 $\pm$ 34,1

Примечание: * – $p < 0,05$ между контрольной и опытной группами животных.

мышей-реципиентов стимуляцией исследовательского компонента поведения посредством усиления экспрессии гена рецептора эритропоэтина в головном мозге [3]. Полученный эффект может быть также следствием стимулирующего влияния указанного цитокина на активность дофаминергической системы головного мозга [10, 14], равно как и его способности индуцировать в мозге синтез антагонистов рецептора ИЛ-1 и растворимого рецептора ФНО — р55 [11, 14]. Последнее может также нивелировать супрессирующий эффект на поведение реципиентов ФНО α , продукция которого также повышена трансплантируемыми клетками. Существенное значение в модуляции параметров ориентировочно-исследовательского поведения животных после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* кофеином, имеет и выявленное в настоящем исследовании снижение в головном мозге реципиентов локального синтеза провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6, оказывающих депрессивные эффекты на поведенческие реакции [7, 8, 13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящем исследовании, продемонстрировано модулирующее влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток, обработанных экстракорпорально кофеином, на параметры поведения экспериментальных животных. Стимулирующий поведение реципиентов эффект, сопровождающийся снижением содержания ряда провоспалительных цитокинов в головном мозге, достигался при трансплантации иммунокомпетентных клеток, обработанных кофеином в низкой концентрации. Можно полагать, что в качестве триггерных факторов, приводящих к изменениям функциональной активности ЦНС у животных-реципиентов при этом выступают продуцируемые трансплантируемыми клетками цитокины. По всей видимости, головной мозг реагирует на изменение цитокинового профиля на периферии и отвечает на этот стимул модуляцией собственного локального синтеза цитокинов и активности нейромедиаторных систем, следствием чего и являются регистрируемые изменения параметров ориентировочно-исследовательского поведения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М., 1991. — 399 с.
2. Маркова Е.В., Абрамов В.В., Козлов В.А. Влияние трансплантации лимфоидных клеток селезенки на функциональную активность иммунной

и нервной систем у экспериментальных животных // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2009. — Т. 147, № 4. — С. 435 — 441.

3. Маркова Е.В., Абрамов В.В., Козлов В.А. Регуляция ориентировочно-исследовательского поведения у животных путем трансплантации иммунокомпетентных клеток // Успехи современ. биологии. — 2009. — Т. 129, № 4. — С. 348 — 355.

4. Маркова Е.В., Козлов В.А. Механизмы регуляции ориентировочно-исследовательского поведения мышей (СВАхС57Bl/6)F1 иммунокомпетентными клетками // Вестн. уральской мед. акад. науки. — 2010. — № 2/1. — С. 49 — 51.

5. Маркова Е.В., Абрамов В.В., Короткова Н.А., Козлов В.А. Влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток на ориентировочно-исследовательское поведение и экспрессию генов цитокинов в головном мозге животных // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2006. — Т. 142, № 9. — С. 309 — 313.

6. Ader Robert. Psychoneuroimmunology. — University of Chicago Press, 2007. — Vol. 1. — 1269 p.

7. Dantzer R. Expression and action of cytokines in the brain: mechanisms and pathophysiological implications // In: Psychoneuroimmunology (4-th ed.). San Diego (Ca): Elsevier Academic Press (ed. Ader R.), 2007. — Vol. 1. — P. 271 — 280.

8. Dunn A.J. Mechanisms by which cytokines signal the brain // Int. Rev. Neurobiol. — 2002. — Vol. 52. — P. 43 — 65.

9. Dunn A.J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry // In: Psychoneuroimmunology, eds. R. Ader, D.L. Felten, N. Cohen. — New York, 2001. — P. 649 — 666.

10. Hopkins S.J. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration // Acta Biomed. — 2007. — Vol. 78, N 1. — P. 231 — 247.

11. Markova E.V., Abramov V.V., Kozlov V.A. Proceedings of the 2nd European Congress of Immunology // Free Papers. Editors Reinhold E. Schmidt. MED-IMOND S.r.l. — Bologna, Italy, 2009. — P. 551 — 555.

12. Siegel A., Zalcman S.S. The Neuroimmunological Basis of Behavior and Mental Disorders // Springer Science and Business Media LLC, 2009. — 438 p.

13. Tilg H., Trehu E., Atkins M.B., Dinarello C.A. et al. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor // Blood. — 1994. — Vol. 83. — P. 113 — 118.

14. Zalcman S., Green-Johnson J.M., Murray L. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6 // Brain Res. — 1994. — Vol. 643. — P. 40 — 49.

Сведения об авторах

Княжева Мария Александровна — младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383) 222-06-72)

Рыжикова Светлана Леонидовна — научный сотрудник лаборатории стабилизации ЗАО «Вектор-Бест»

Рябичева Татьяна Григорьевна — ведущий научный сотрудник лаборатории стабилизации ЗАО «Вектор-Бест», кандидат биологических наук

Маркова Евгения Валерьевна — ведущий научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН, доктор медицинских наук

О.В. Лебединская ¹, Н.К. Ахматова ², М.Б. Бродовский ¹, Е.А. Ильиных ¹, Н.Б. Егорова ²,
Е.А. Курбатова ², С.В. Мелехин ¹

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВВЕДЕНИЯ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹ Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера (Пермь)

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН (Москва)

Исследованы иммунофенотипические и морфологические особенности формирования иммунных реакций при интраназальном, пероральном и подкожном способах введения поликомпонентной вакцины Иммуновак ВП-4, содержащей группу антигенов условно патогенных бактерий. Выявлено, что исследуемый препарат вызывает выраженную активацию эффекторов врожденного иммунитета как при парентеральной, так и при мукозальной иммунизации. Это проявляется в экспрессии дифференцировочных, костимулирующих, адгезивных молекул на поверхности мононуклеарных лейкоцитов, в пролиферации ключевых эффекторов мукозального иммунитета ($\gamma\delta$ - и B_1 -лимфоцитов, NK клеток), в изменениях структуры, клеточного состава иммунокомпетентных органов и региональных к месту введения, и удаленных от него. Совокупность имеющихся в настоящее время данных об эффекте и механизме действия мукозальных методов введения вакцин и иммуномодуляторов позволяет считать разработку мукозальных моно- и ассоциированных вакцин приоритетным направлением современной вакцинологии.

Ключевые слова: мукозальный иммунитет, Иммуновак ВП-4, иммунофенотип, морфологические изменения, мукозальная иммунизация, парентеральная иммунизация

MORPHOFUNCTIONAL PECULIARITIES OF MUCOSAL IMMUNITY DEPENDING ON METHODS OF OPPORTUNISTIC MICROBIAL INTRODUCTION

O.V. Lebedinskaya ¹, N.K. Akhmatova ², M.B. Brodovsky ¹, E.A. Ilinykh ¹, N.B. Egorova ²,
E.A. Kurbatova ², S.V. Melekhin ¹

¹ E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm

² I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera RAMS, Moscow

Immunophenotypic and morphological peculiarities of immune reactions under intranasal, peroral and subcutaneous introduction of multicomponent vaccine Immunovac VP-4 containing a group of opportunistic bacterial antigens were investigated. The investigated preparation was found to cause marked activation of congenital immunity effectors both in parenteral and mucosal immunization. It is manifested in the expression of differential, costimulatory, adhesive molecules on the surface of mononuclear leukocytes, in proliferation of key mucosal immunity effectors ($\gamma\delta$ T, B_1 , NK cells), and changes in structure, cellular composition of immunocompetent organs both regional and distant as to the site of introduction. Currently existing data on effects and mechanisms of vaccine and immunomodulator mucosal introduction allows considering the development of mucosal mono- and associated vaccines as the priority direction in modern vaccinology.

Key words: mucosal immunity, Immunovac VP-4, immunophenotype, morphological changes, mucosal immunization, parenteral immunization

Значительную роль на первичных этапах распознавания микробных антигенов играет метод введения их в макроорганизм, определяющий набор рецепторов, взаимодействующих с лигандами микроорганизмов, и, соответственно, сигнальные пути дальнейшего развития врожденного и адаптивного иммунитета. Активация различных сигнальных путей обуславливает индукцию целого комплекса защитных реакций [9, 10].

Теоретическими и экспериментальными исследованиями последних лет установлено, что важнейшими компонентами, обеспечивающими особенности функциональной активности мукозальной иммунной системы, являются $\gamma\delta$ лимфоциты и B_1 -лимфоциты, заселяющие эпителий слизистых оболочек. Данные клетки обладают способностью усвоения патоген-ассоциированных структур микроорганизмов (pathogen-associated molecular patterns — PAMPs) без костимуляторных

сигналов и предварительного процессинга другими эффекторами иммунитета [5, 6, 8, 11]. В процессе реализации мукозального иммунитета, наряду с его ключевыми эффекторами, большое значение приобретают и другие иммунокомпетентные клетки, взаимодействие которых с $\gamma\delta$ и B_1 -лимфоцитами обеспечивает активацию мукозальной иммунной системы и способность развития при этом не только местного, но и системного иммунитета к антигенам/патогенам [7, 11].

Актуальность таких исследований очевидна, однако молекулярно-клеточные механизмы активации врожденного и адаптивного иммунитета при мукозальных методах введения иммуномодуляторов и вакцин остаются малоизученными.

Цель исследования — сравнительная характеристика морфологических и иммунофенотипических особенностей формирования иммунитета при интраназальном, пероральном и подкожном

методах введения комплекса антигенов условно патогенных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты

Для изучения особенностей мукозального иммунитета использовалась поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4® (ФГУП «НПО «Микроген»), обладающая широким набором РАМРPs. Это обуславливает высокую активность данного препарата в отношении врожденного иммунитета, установленную на молекулярно-клеточном уровне при подкожном введении мышам [1] и на различных инфекционных моделях [2, 3]. Поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4 из антигенов условно патогенных микроорганизмов (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) предназначена для иммунотерапии хронических воспалительных и аллергических заболеваний. Она содержит липополисахариды (ЛПС), ассоциированные с белком наружной мембраны грамотрицательных микроорганизмов, пептидогликан, тейхоевые кислоты, липопотеины, являющиеся лигандами для Толл-подобных рецепторов.

Экспериментальные животные

Использовались мыши (80 животных линии СВА весом 16 — 18 г), полученные из питомника НЦ Биомедицинских технологий РАМН «Андреевка» и содержащиеся в условиях вивария НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Экспериментальным животным вводили Иммуновак-ВП-4 подкожным, интраназальным или пероральным методами. Мукозальную иммунизацию проводили трехкратно с интервалом в 2 — 3 дня. Интраназально препарат вводили в разовой дозе 500 мкг в объеме 30 мкл (1-я группа). Пероральная разовая доза составляла 2 мг в объеме 0,5 мл (2-я группа). Подкожно препарат вводили двукратно с интервалом в 7 суток дозой 200 мкг на каждое введение (3-я группа). Контрольную — 4-ю — группу составляли интактные животные. Через сутки после последнего введения вакцины мышам выводили из опыта эфирным наркозом; извлекали селезенку, лимфатические узлы, ассоциированные с носовой полостью и бронхами (Nasal Associate Lymphoid Tissue — NALT, Broncho Associate Lymphoid Tissue — BALT), а также с тонкой кишкой (Gut Associate Lymphoid Tissue — GALT) и тонкую кишку.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов (МЛ)

Мононуклеарные лейкоциты лимфоидных органов мышам выделяли с помощью одноступенчатого градиента плотности фикола-урографина по методу A. Boyum.

Определение экспрессии поверхностных маркеров проводили при помощи моноклональных антител («Caltag Laboratories», США) против соответствующих антигенов. Результаты учитывали на проточном цитометре FACS Calibur («Beckman Coul-

ter F-500», США). На МЛ селезенки, лимфатических узлов и слизистой оболочки тонкой кишки мышам исследовали уровни экспрессии CD3, NK 1.1, CD3/NK, CD4, CD25, CD4/CD25, CD8, CD19, МНС II класса, CD5.2.

Морфологические исследования

Проведены морфогистохимические исследования центральных (костный мозг и тимус) и периферических (селезенка, лимфатические узлы, лимфоидная ткань кишечника) органов мышам. Для доказательства отсутствия токсического действия применяемого иммуномодулирующего препарата исследовали паренхиматозные органы (печень, легкие, почки). Материал фиксировали в спирт-формол-уксусной кислоте по Телленискому [4]. Серийные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, азуром II и эозином, а также метиловым зеленым и пиронином по Браше с контролем РНК-азой для оценки содержания РНК. Проводили ШИК-реакцию по Шабадшу с контрольной обработкой срезов амилазой для выявления гликогена и нейтральных гликозаминогликанов (ГАГ) и использовали альциановый синий с целью определения кислых ГАГ.

Фотосъемку и анализ изображения с гистологических препаратов органов проводили с помощью цифровой системы регистрации и анализа изображения AxioVision 4.2 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Excel (Microsoft Corporation, США), интегрированным пакетом статистического анализа StatSoft 8.0 с применением параметрических и непараметрических методов сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения иммунофенотипа лимфоцитов мышам в селезенке, NALT/ BALT и GALT при многократной иммунизации экспериментальных животных представлены в таблице и на диаграммах (табл. 1, рис. 1).

При интраназальном введении вакцины существенно увеличивалось содержание поверхностных маркеров на клетках-эффекторах лимфатических узлов NALT/BALT (рис. 1). В NALT/ BALT относительное содержание T_H лимфоцитов повысилось в 32 раза, B₁ — в 8 раз, CD19 и CD4 — в 39 и 3,9 раза соответственно. В селезенке уровень T_H возрастал в 16 раз, B₁ — в 11 раз. В селезенке в большей степени, чем в NALT/BALT, увеличивалось число CD4 (в 28 раз). В GALT все исследованные показатели изменялись в меньшей степени, чем в селезенке и лимфатических узлах NALT/ BALT. Следует учесть, что при интраназальном введении препарата мыши получали небольшую дозу (суммарная доза вакцины 1500 мкг), которая всего в 3,75 раза превышала дозу, вводимую подкожно (суммарная доза 400 мкг).

Пероральное трехкратное введение вакцины приводило к выраженным изменениям количественного состава популяций лимфоцитов во всех

Таблица 1

Экспрессия маркёров на клетках-эффекторах иммунитета при разных методах введения бактериальных антигенов

Метод иммунизации	Содержание клеток, %*								
	Селезенка			NALT/BALT			GALT		
	Маркер	Интактные	Иммунизированные	Маркер	Интактные	Иммунизированные	Маркер	Интактные	Иммунизированные
Интраназально 3-хкратно	CD3	6,3 ± 0,61	47,4 ± 4,1 (7)	CD3	1,2 ± 0,6	7,6 ± 0,3 (6,4)	CD3	0,3 ± 0,16	2,7 ± 0,06 (9,0)
	CD3/NK	1,13 ± 0,65	3,63 ± 0,17 (3)	CD3/NK	0,4 ± 0,6	1,19 ± 0,16 (3)	CD4	0,34 ± 0,15	1,9 ± 0,02 (5,6)
	CD4	2,1 ± 1,2	58,6 ± 1,8 (28)	CD4	3,5 ± 0,8	13,7 ± 1,1 (3,9)	CD8	0,24 ± 0,09	3 ± 0,03 (12,5)
	CD4/CD25/Foxp3	0,8 ± 0,26	4,48 ± 1,1 (5,6)	MHCII	1,6 ± 0,4	72,0 ± 4,5 (45)	B1	0,15 ± 0,06	0,53 ± 0,03 (3,5)
	CD8	4,7 ± 0,74	34,2 ± 4,6 (7,3)	CD19	0,63 ± 0,2	25,2 ± 1,5 (39)			
	Tγδ	0,17 ± 0,02	2,8 ± 1,1 (16)	Tγδ	0,05 ± 0,02	1,6 ± 0,06 (32)			
	B1	0,08 ± 0,03	0,9 ± 0,02 (11,3)	B1	0,21 ± 0,15	1,7 ± 0,06 (8)			
Перорально 3-хкратно	CD3/NK	1,13 ± 0,65	5,8 ± 0,6 (5,2)	CD3	1,2 ± 0,6	34 ± 5,5 (28)	CD3	0,3 ± 0,16	4,3 ± 0,9 (14)
	CD4	2,1 ± 0,2	13,3 ± 1,3 (6)	CD4	3,5 ± 0,8	40,1 ± 3,1 (11)	NK	0,7 ± 0,03	33,3 ± 1,2 (46)
	CD25	1,6 ± 0,65	12,6 ± 0,8 (7,8)	CD8	1,8 ± 0,08	31,9 ± 5,1 (17)	CD4	0,34 ± 0,15	7,3 ± 1,1 (21)
	CD4/CD25/Foxp3	0,8 ± 0,2	2,44 ± 0,04 (3)	CD19	0,6 ± 0,2	8,2 ± 0,6 (13)	CD25	0,7 ± 0,16	5,4 ± 0,5 (7,6)
	Tγδ	0,17 ± 0,02	1,43 ± 0,1 (3,7)	MHCII	1,6 ± 0,4	4,8 ± 0,8 (3)	CD8	0,24 ± 0,09	2,2 ± 0,15 (10)
	B1	0,08 ± 0,03	0,5 ± 0,06 (6,2)	Tγδ	0,05 ± 0,02	9,3 ± 1,8 (186)	CD19	0,4 ± 0,1	39,9 ± 0,8 (97)
				B1	0,21 ± 0,15	2 ± 0,3 (9,4)	CD3/NK	1,1 ± 0,16	13,7 ± 0,9 (12)
							MHCII	5,0 ± 0,9	51,7 ± 1,0 (10)
							Tγδ	0,2 ± 0,1	9,0 ± 0,8 (45)
							B1	0,15 ± 0,06	11,7 ± 0,9 (117)
Подкожно 2-хкратно				CD3	1,2 ± 0,6	10,4 ± 1,2 (8,8)	CD3	0,3 ± 0,16	2,4 ± 0,2 (8,8)
	CD4	2,1 ± 1,2	14,3 ± 2,26 (7)	CD4	3,5 ± 0,8	12,6 ± 1,0 (3,5)	CD4	0,34 ± 0,15	1,9 ± 0,16 (5,5)
	CD25	1,6 ± 0,15	5,6 ± 0,57 (3,5)	CD8	1,8 ± 0,	12,4 ± 1,9 (7)	CD8	0,24 ± 0,09	1,5 ± 0,2 (6)
	CD4/CD25/Foxp3	0,8 ± 0,26	2,8 ± 0,14 (3)	CD19	0,6 ± 0,02	2,3 ± 0,12 (3,5)	MHCII	5,16 ± 0,9	25,9 ± 0,7 (5)
	Tγδ	0,17 ± 0,02	5,3 ± 0,5 (31,2)	Tγδ	0,05 ± 0,02	12,0 ± 1,6 (240)	CD19	0,4 ± 0,1	1,75 ± 0,2 (4,3)
	B1	0,08 ± 0,03	4,9 ± 1,2 (62)	B1	0,2 ± 0,15	12,2 ± 1,6 (58)			

Примечание: * – представлены только данные, которые после иммунизации увеличивались в 3 и более раз.

исследованных органах (табл. 1, рис. 1). В GALT относительное число Tγδ лимфоцитов увеличилось в 45 раз. Количество B₁ лимфоцитов возросло в 117 раз. Только при этом методе вакцинации отмечена положительная динамика популяции NK, которая возросла в 47,5 раза. Значительно увеличивалось также содержание клеток с маркерами CD3, CD4, CD8, CD19. В NALT/BALT резко возросло содержание Tγδ-лимфоцитов, B₁ лимфоцитов (в 9,5 раза), что сопоставимо с результатами при интраназальном методе введения вакцины. Уровни дифференцировочных антигенов CD4, CD8, CD19 были увеличены в 11,5; 17,0 и 12,9 раза соответственно. При пероральном методе введения, в отличие от

интраназального, менее выражены изменения в селезенке иммунизированных мышей: процентное содержание CD4⁺, CD25⁺, Tγδ, B₁-клеток увеличилось всего в 6–8 раз.

При подкожном методе введения бактериальных антигенов происходила заметная активация клеток эффекторов врожденного иммунитета в селезенке и лимфатических узлах NALT/BALT (табл. 1, рис. 1). При данном методе вакцинации наблюдалось повышение числа Tγδ лимфоцитов в NALT/BALT в 240 раз, в селезенке – в 31,2 раза. Также выявлен высокий уровень количества B₁ лимфоцитов в этих органах при низкой степени увеличения других показателей. Значительно

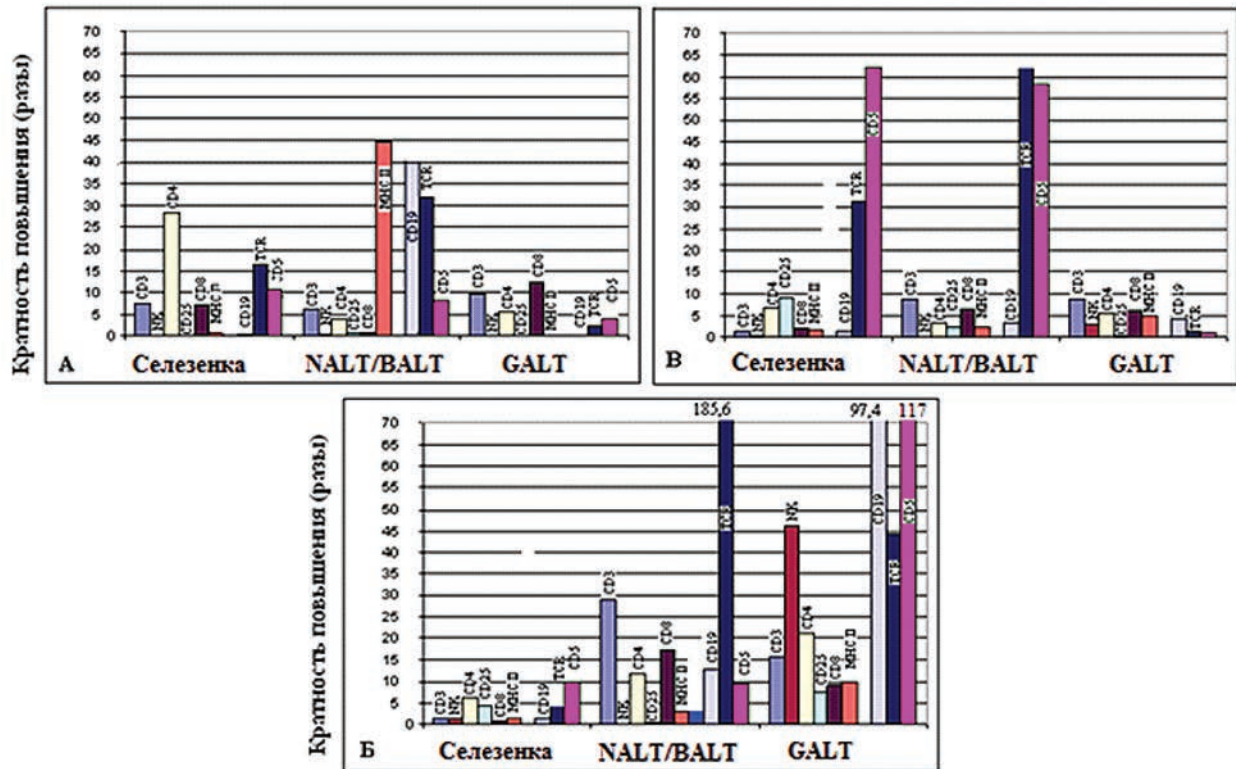


Рис. 1. Увеличение количества клеток-эффекторов в лимфоидных органах мышей, иммунизированных вакциной Иммуновак ВР-4. **А** – интраназальный метод иммунизации; **Б** – пероральный метод иммунизации; **В** – подкожный метод иммунизации. По оси абсцисс – исследуемые лимфоидные органы мышей, по оси ординат – кратность повышения (разы) процентного содержания клеток, экспрессирующих маркеры дифференциации и антигенного представления, в лимфоидных органах иммунизированных мышей по сравнению с интактными.

меньшее изменение этих показателей, как и при интраназальном методе введения, выявлялось в лимфоидной ткани тонкой кишки.

Для всех методов оказалось характерным наибольшее увеличение экспрессии маркеров V_{α} и $T_{\gamma\delta}$ лимфоцитов. Это связано, видимо, не только с методом введения, но и с характером использованных антигенов, которые в этих клетках подвергаются процессингу без предварительного участия в данном процессе МНС класса II и CD4 лимфоцитов. Интересно, что экспрессия NK маркеров происходила в значительной степени только при пероральном введении антигенов. Важно также отметить, что при непарентеральных методах, наряду с активацией лимфоцитов в NALT/BALT и GALT, наблюдалось значительное увеличение экспрессии поверхностных маркеров на клетках селезенки, что свидетельствует о развитии при этих методах не только мукозального, но и системного иммунитета.

Данные морфологических исследований служат подтверждением иммунофенотипического анализа количественного состава популяций лимфоидных клеток в органах региональных к месту введения антигенов и отдаленных от него. При интраназальном введении Иммуновак ВР-4 наиболее ярко выраженная реакция наблюдается в органах, региональных к месту введения препарата (рис. 2).

В легких выявляются многочисленные перибронхиальные, периваскулярные и перенхима-

тозные лейкоцитарные инфильтраты, содержащие большое количество клеток лимфоцитарного ряда и макрофагов (рис. 2а). Корковое вещество в перибронхиальных лимфатических узлах расширено, содержит крупные, иногда сливающиеся лимфоидные узелки (В-зависимые зоны). В некоторых узелках выявляются реактивные центры (рис. 2б). Межузелковые участки плотно заполнены лимфоцитами и макрофагами. Паракортикальная зона практически отсутствует. Мозговые тяжи расширены, в них выявляются многочисленные бластные формы и плазмциты (рис. 2в). За счет расширения мозговых тяжей сужаются лимфатические синусы, в которых в большом количестве определяются макрофаги, лимфоциты, гранулоциты, делящиеся и стромальные клетки (рис. 2г).

При пероральном введении вакцины Иммуновак наблюдается выраженная активизация лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (рис. 2д, 2е). Агрегированные лимфоидные узелки (пейеровы бляшки) в подвздошной кишке многочисленны и занимают большую площадь, чем у интактных животных, сливаясь в конгломераты. Количество узелков с куполами (В-зоны) в составе бляшки увеличивается до 4–5. Межузелковые (Т-зависимые) зоны плотно заполнены лимфоцитами (рис. 2д). Между криптами тощей кишки можно обнаружить диффузную лимфоцитарную инфильтрацию. Строма ворсинок тонкого кишечника

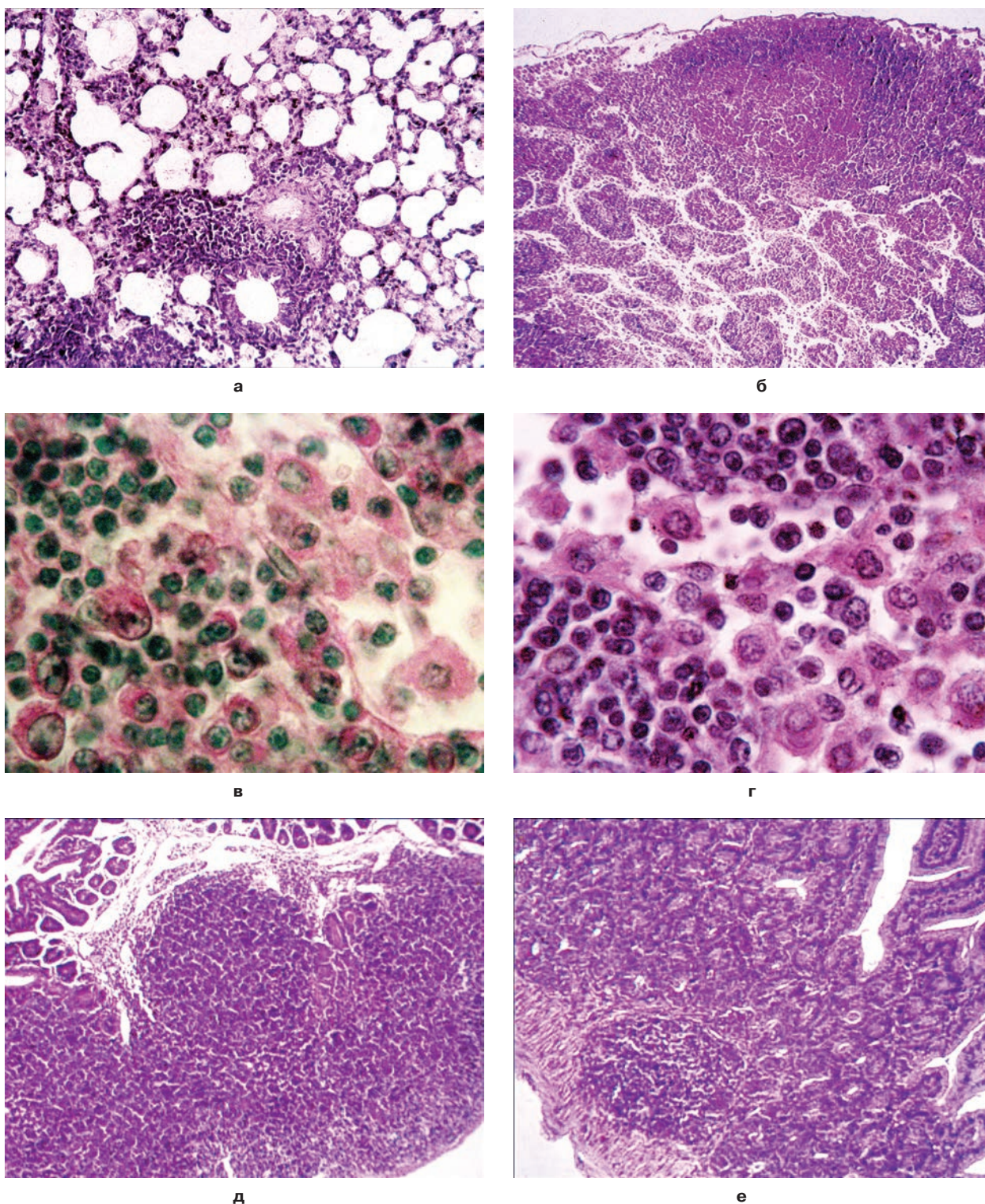


Рис. 2. Лимфоидная ткань региональная к месту введения антигена у мышей, иммунизированных Иммуновак ВП-4: **а, б, в, г** – интраназальная иммунизация; **д, е** – пероральная иммунизация; **а** – легкое; ув. 200; **б** – лимфатический узел; ув. 100; **в** – мозговой синус лимфатического узла; ув. 1000; **г** – мозговой синус лимфатического узла; ув. 1000; **д** – групповые лимфоидные узелки в подвздошной кишке; ув. 100; **е** – солитарный лимфоидный узелок в месте перехода тонкой кишки в толстую; ув. 200; **а, д, е** – окр. гематоксилином и эозином; **б, в** – окр. метиловым зеленым и пиронином по Браше; **г** – окр. шифф-йодной кислотой и гематоксилином по Шабдашу с контрольной обработкой амилазой.

заполнена лейкоцитами, но интраэпителиальные лимфоциты встречаются редко. В месте перехода тонкой кишки в толстую видны солитарные лимфоидные узелки (рис. 2е).

Особое внимание следует обратить на лимфоидную ткань селезенки при различных методах аппликации бактериальных антигенов (рис. 3).

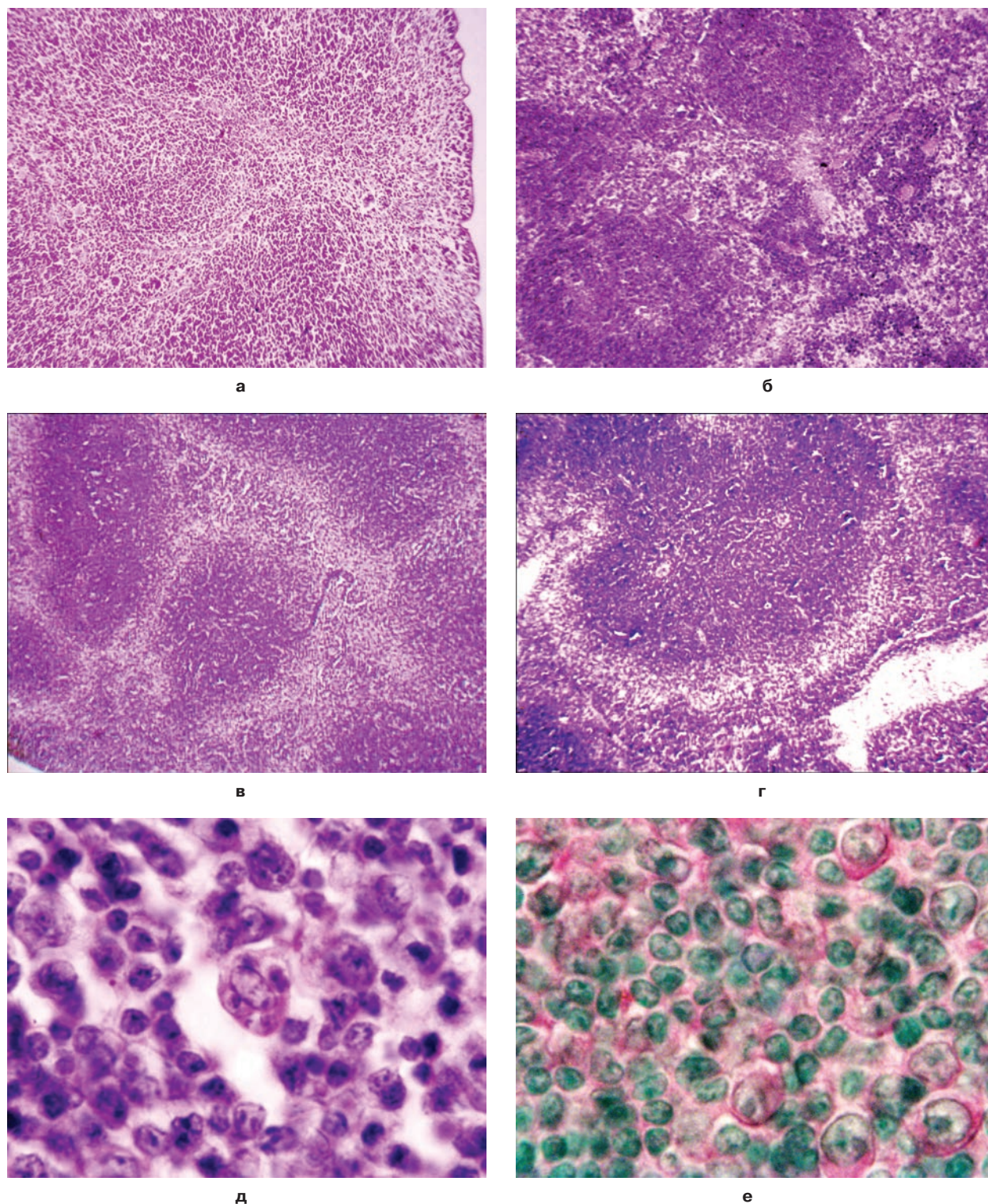


Рис. 3. Селезенка intactных и иммунизированных Иммуновак ВП-4 мышей: **а** – intactная мышь; **б** – интраназальная иммунизация; **в** – пероральная иммунизация; **г, д, е** – подкожная иммунизация; **а, в, г** – окр. гематоксилином и эозином; **б, д** – окр. шифф-йодной кислотой и гематоксилином по Шабдашу; **е** – окр. метиловым зелёным и пиронином по Браше; **а, б, в, г** – ув. 100; **д, е** – ув. 1000.

У intactных животных белая пульпа в селезенке занимает меньшую площадь, чем красная. Лимфатические узелки малых и средних размеров, не разделены на типичные зоны (рис. 3а). Интраназальное введение вакцины приводит к расширению площади белой пульпы, лимфоидные узелки при-

обретают тенденцию к слиянию, увеличиваются в размерах, в них появляются реактивные центры и маргинальные зоны (рис. 3б). При пероральной иммунизации размеры лимфоидных узелков белой пульпы также увеличены, и некоторые приобретают тенденцию к слиянию, т.е. структура селезенки

напоминает картину, выявляемую в предыдущей группе (рис. 3в). И, наконец, при подкожной инъекции антигенов бактериальной природы наблюдается слияние лимфоидных узелков белой пульпы, они приобретают самую разнообразную конфигурацию (рис. 3г). Во многих из них отчетливо различаются все хорошо развитые отделы (периартериальная муфта, центр размножения, мантийная и маргинальные зоны). В реактивных центрах выявляются макрофаги, фагоцитирующие клеточный детрит и апоптотные тела (рис. 3д) и многочисленные бластные формы (рис. 3е).

Таким образом, установлено, что антигены условно патогенных бактерий независимо от пути введения являются активными стимуляторами эффекторной системы врожденного иммунитета. В реализации функции слизистых оболочек, как первой линии защиты от патогенов, наиболее значительную роль играют $T\delta$ и B_1 -лимфоциты, являющиеся важнейшими компонентами мукозальной иммунной системы. В данном исследовании выявлено, что после многократного введения Иммуновак ВП-4 происходит значительное увеличение количества $T\delta$ - и B_1 -лимфоцитов при всех методах введения. Маркеры $T\delta$ и B_1 -лимфоцитов наиболее активно экспрессируются на поверхности лимфоцитов: при интраназальном введении — в NALT/BALT и в селезенке; при пероральном — в GALT и NALT/BALT; при подкожном введении — в селезенке и NALT/BALT. Как известно, данные клетки обладают свойством усвоения PAMPs микроорганизмов без предварительного их процессинга и представления в комплексе с МНС II Т-лимфоцитам. Это обстоятельство обеспечивает быструю защиту от различных патогенов и вносит свой вклад в расшифровку механизма меньшей сенсибилизирующей активности антигенов при мукозальном введении, поскольку при взаимодействии этих клеток вырабатываются антитела классов IgM и IgA, но не IgE.

Из представленных данных видно, что при контакте с комплексом антигенов условно патогенных бактерий происходит экспрессия маркеров почти всех популяций лимфоцитов. Однако выявлены некоторые иммунофенотипические отличия в зависимости от методов введения группы антигенов условно патогенных микроорганизмов. При интраназальной аппликации наблюдалась активация (в 10 и более раз) иммунокомпетентных клеток ($T\delta$, B_1 , CD3, CD4, CD8, CD19) в NALT/BALT и в селезенке. Пероральное введение приводило к увеличению количества иммуноцитов ($T\delta$, B_1 , CD3, CD4, CD19, NK) в GALT и NALT/BALT. Подкожная иммунизация препаратом Иммуновак вызывала активацию $T\delta$, B_1 в селезенке и в NALT/BALT. Обращает на себя внимание, что только пероральный метод характеризовался значительным повышением NK-клеток, являющихся важнейшим компонентом врожденного и адаптивного иммунитета.

В данном исследовании подтверждено также положение о том, что происходит интенсивный обмен лимфоцитами не только между лимфо-

идными образованиями, ассоциированными со слизистыми оболочками респираторного и желудочно-кишечного трактов, но и с селезенкой, что обеспечивает при мукозальных методах иммунизации развитие, наряду с местным, и системного иммунитета. Это показано также с помощью морфологических методов исследования, которые выявляют активацию лимфоидной и макрофагальной систем, бласттрансформацию и пролиферацию клеток лимфоидной ткани и плазмцитогенез как в иммунокомпетентных органах, региональных к месту введения вакцины, так и в селезенке при всех методах аппликации антигенов условно патогенных микроорганизмов. Следовательно, проведенные исследования подтверждают представление о единстве системы слизистых оболочек [6, 7], в соответствии с которым активированные клетки-эффекторы иммунитета циркулируют, проникая даже в отделы, отдаленные от места введения антигенов. Это подтверждает положение о том, что мукозоассоциированная лимфоидная ткань (mucosal-associated lymphoid tissue — MALT) является важнейшим органом иммунитета, имеющим функциональную связь с системным иммунитетом [6, 7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в исследовании результаты свидетельствуют о высокой степени активации эффекторов врожденного иммунитета как при парентеральной, так и при мукозальной иммунизации комплексом антигенов условно патогенных микроорганизмов. Это подтверждается появлением значительного числа клеток с экспрессированными дифференцировочными, костимулирующими, адгезивными маркерами, пролиферацией ключевых эффекторов мукозального иммунитета ($T\delta$ и B_1 , NK клеток), морфологическими изменениями в иммунокомпетентных органах и региональных к месту введения, и удаленных от него. Совокупность имеющихся в настоящее время данных об эффекте и механизме действия мукозальных методов введения вакцин и иммуномодуляторов позволяет считать разработку мукозальных моно- и ассоциированных вакцин приоритетным направлением современной вакцинологии.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-96037p_урал_a и Администрацией Пермского края.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противомикробный. — М.: Практ. медицина, 2008. — 256 с.
2. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А. Иммунотерапевтическая концепция использования микробных антигенов при атопии и патологии, ассоциированной с условно-патогенной микрофлорой (на примере поликомпонентной вакцины Иммуновак ВП-4 // Мед. иммунология. — 2008. — Т. 10, № 1. — С. 13 — 20.
3. Курбатова Е.А. Разработка поликомпонентной вакцины из антигенов условно-патогенных

микроорганизмов (Экспериментальное и клинико-иммунологическое исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1997. — 50 с.

4. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. — М., 1969. — С. 128 — 131.

5. Сидорова Е.В. Королевство В-лимфоцитов // Мед. иммунология. — 2004. — Т. 6, № 3—5. — С. 176 — 185.

6. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунная система желудочно-кишечного тракта: особенности строения и функционирования в норме и при патологии // Иммунология. — 1997. — № 5. — С. 4 — 7.

7. Asanuma H., Thompson A.H., Jwasaki T., Sato Y. et al. Isolation and characterization of mouse

nasal-associated lymphoid tissue // J. Immunol. Met. — 1997. — Vol. 202. — P. 123 — 131.

8. Biossmenu R. Function of intestinal gammadelta T-cells // Immunol. Res. — 2000 — N 2—3. — P. 123 — 127.

9. Harris G., KuoLee R., Chen W. Role of Toll-like receptors in health and disease of gastrointestinal tract // World J. Gastroenterol. — 2006. — N 12. — P. 2149 — 2160.

10. Porrett P.M., Yuan X., La Rosa D.F., Walsh P.T. et al. Yang J. Mechanisms underlying blockade of allograft acceptance by TLR ligands // J. Immunol. — 2008. — Vol. 181, N 3. — P. 1692 — 1699.

11. Xiong N., Raulet D.H. Development and selection of gammadelta T cells // Immunol. Res. — 2007. — Vol. 215. — P. 15 — 31.

Сведения об авторах

Лебединская Ольга Витальевна — доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития, доктор медицинских наук (614039, г. Пермь, ул. П. Осипенко, д. 61, кв. 74; e-mail: lebedinska@mail.ru)

Ахматова Нелли Кимовна — заведующая лабораторией регуляции иммунитета ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, доктор медицинских наук

Бродовский Максим Борисович — заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития

Ильиных Елизавета Анатольевна — заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития.

Егорова Надежда Борисовна — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН

Курбатова Екатерина Алексеевна — заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Н.Г. Плехова^{1,2}, И.Н. Ляпун¹, Л.М. Сомова¹, Г.Г. Компанец¹, И.Н. Смирнов²

РЕАКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (Владивосток)

² Дальневосточный федеральный университет (Владивосток)

В статье представлены доказательства того, что восприимчивость моноцитарных клеток к хантавирусной инфекции возрастает при достижении ими последней стадии дифференцировки. В силу филогенетической однородности этих клеток, данные, полученные при исследовании их взаимодействия с хантавирусами, можно экстраполировать на клетки моноцитарного происхождения класса млекопитающих. Указано, что хантавирусы резистентны к воздействию моноцитов/макрофагов и способны к внутриклеточной репродукции в них, преодолевая, таким образом, биологический барьер, препятствующий распространению возбудителя из первичного очага инфекции и защищающий от заражения чувствительные клетки различных органов. В отношении нейтрофилов установлено, что хантавирус проявляет цитопатогенные свойства, на что указывает появление апоптотически измененных клеток и уменьшение периода жизнеспособности клеточной культуры.

Ключевые слова: моноциты, макрофаги, нейтрофилы, вирусные инфекции, метаболизм клеток

REACTIVITY OF CELLS INNATE IMMUNITY IN THE PATHOGENESIS OF HANTAVIRAL INFECTION

N.G. Plekhova^{1,2}, I.N. Lyapun², L.M. Somova², G.G. Kompanets², I.N. Smirnov¹

¹ Research Institute of Epidemiology and Microbiology SB RAMS, Vladivostok

² Far Eastern Federal University, Vladivostok

The paper presents evidence that the susceptibility of monocyte-derived cells to the Hantaviral infection increases when they reach the final stage of differentiation. In view of the phylogenetic homogeneity of these cells, the data obtained in the study of their interaction with Hantavirus can be extrapolated to monocytic cells of origin of mammals. It is indicated that Hantaviruses are resistant to the effects of monocytes/macrophages and are capable of intracellular replication in them, breaking thus the biological barrier preventing the spread of the pathogen from the primary site of infection and protects against infected sensitive cells of various organs. With respect of neutrophils revealed that hantavirus showing cytopathogenic properties, as indicated by the appearance of apoptotic cells and modified periods of reduced viability of the cell culture.

Key words: monocytes, macrophages, neutrophils, viral infection, ultrastructure, metabolism of cell

В защите организма от вирусных заболеваний принимают участие клеточные элементы врожденного иммунитета — моноциты/макрофаги и нейтрофилы, которые играют ключевую роль в развитии раннего противoinфекционного ответа. Иммунная функция нейтрофилов при инфекционных заболеваниях ассоциируется с фагоцитозом, главным образом, и продукцией цитотоксических компонентов, в том числе нитроокисных и кислородных радикальных соединений [8]. Тогда как функциональные свойства клеток моноцитарного происхождения настолько многообразны, что их неполноценность, как следствие или причина патологического процесса, со временем неизбежно формирует системное поражение организма, сопровождающееся иммунологической недостаточностью. Они являются клетками-эффекторами и модуляторами различных воспалительных процессов, и вирулицидные свойства мононуклеарных фагоцитов относятся к важным элементам устойчивости организма при многих вирусных инфекциях [9]. Причем различные вирусы могут проникать как в нативные, так и в стимулированные макрофаги, и источником инфекции в организме могут становиться даже фагоциты, которые являются непермиссивной системой для вируса.

Присутствие в периферической крови достаточного количества нейтрофилов и моноцитов, а также их наличие во многих органах обуславливает вероятность этих клеток одними из первых взаимодействовать с вирусами. В настоящее время различными исследователями определено, что многие вирусы способны размножаться в моноцитах/макрофагах, в том числе возбудители геморрагических лихорадок, такие как вирусы Денге, Хунин, Хантаан [13]. При этом функциональное состояние клеток макрофагального ряда оказывает влияние на развитие резистентности организма [2, 10, 15]. Немаловажно, что при размножении в макрофагах различных вирусов, в частности, вирусов иммунодефицита человека, их цитопатическое воздействие на клетку морфологически не выявляется, но определяется снижение ее бактерицидного потенциала и синтезирующей активности. Это, в последующем, может выражаться в реализации потенциала макрофагов как инициаторов иммунного ответа организма [20]. В отношении нейтрофилов сообщалось об их способности взаимодействовать с вирусом иммунодефицита человека, вирусом гриппа и Эпштейн — Барра [4, 5].

В современной вирусологии к хантавирусам относят этиологические агенты двух тяжелых заболеваний человека: геморрагическая лихорадка

с почечным синдромом (ГЛПС) и хантавирусный легочный синдром (ХЛС). Хантавирусы являются серологически родственными членами семейства Bunyaviridae. Это вирусы с отрицательным геномом РНК, разделенной на три сегмента В, С и М, которые соответствуют вирусной транскриптазе, гликопротеинам и белкам нуклеокапсида. Первой стадией инфицирования является адгезия вирусных частиц к специфическим рецепторам на клеточной поверхности и для проникновения в клетки-мишени хантавирус использует гликопротеины — интегрины, состоящие из различных комбинаций α и β -цепей [7], наличие которых также отмечается на поверхности моноцитов/макрофагов [6].

Цель исследования — дать морфофункциональную характеристику нейтрофилов и моноцитов/макрофагов при их взаимодействии с хантавирусом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью сравнительного изучения способности моноцитов/макрофагов адсорбировать на своей поверхности хантавирусы мы применяли первичные культуры невосприимчивых для *геморрагической лихорадки с почечным синдромом* животных — взрослых мышей и морских свинок. Так, мы использовали первичную культуру моноцитов крови, которую предварительно до заражения вирусами инкубировали в течение 18 ч и 6 с, и популяцию перитонеальных клеток, которая включала в себя преимущественно макрофаги. По данным литературы [14], предварительная инкубация в течение 3 с соответствует окончанию периода созревания моноцитов в резидентные макрофаги, которое происходит в результате адгезии этих клеток к поверхности. Таким образом, из разнородной популяции клеток перитонеального экссудата мы получали равноценные по функциональным свойствам резидентные макрофаги, которые впоследствии заражали хантавирусом.

Первичная культура перитонеальных макрофагов беспородных белых мышей была получена по методу Simonet с соавт. [12]. Использованная нами концентрация клеточной суспензии составляла 4×10^6 кл./мл в среде 199 с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (НПО «Вектор», пос. Кольцово). Для адгезии взвесь клеток оставляли в CO_2 инкубаторе, через 40 мин монослой отмывали дважды от неадгезированных клеток. Полученный монослой макрофагов инкубировали в течение 2 с при 37°C в атмосфере с присутствием 5% CO_2 . Также использовали популяцию моноцитов крови морских свинок, полученную методом градиентной плотности, доводили до концентрации 4×10^6 кл./мл и для достижения различной степени дифференцировки инкубировали в течение 18 ч и 6 с. Первичную культуру нейтрофилов животных получали, вызывая внутрибрюшинное воспаление, путем введения стерильного 1% мясоепонного бульона (5 мл). Через 18 ч клетки извлекались и концентрацию доводили до 4×10^6 кл./мл.

Для заражения клеток использовали культуральным штамм № 60343 вируса Хантаан, выделенным на клетках Vero-6 из суспензии легких дикой

полевой мыши. К монослою клеток добавляли культуральную жидкость, содержащую не менее 10^{-2} ТКИД/50 вируса в объеме 0,2 мл, что составляло примерно 5 инфекционных единиц на клетку. Время контакта клеток с вирусосодержащей жидкостью составило 60 мин, после чего монослой дважды отмывался средой 199 для удаления внеклеточных вирусных частиц, и инкубация продолжалась.

Предметные стекла с адгезированными на них клетками высушивали на воздухе и фиксировали в течение 30 сек, по собственной модификации, в холодном 96° этаноле. Это позволило сохранить вирусный антиген на плазматической мембране клеток. Затем применяли стандартную постановку непрямого метода флуоресцирующих антител (нМФА). Интенсивность специфического свечения оценивали в условных единицах. Для определения вирусного антигена обработку монослоя зараженных клеток, проводили с использованием гомологичной иммуно-асцитической жидкости к штамму штамму ПМ-Т79-95 хантавируса (ХВ), в разведении 1:64 и объеме 5-20 мкл. В качестве флуоресцирующей сыворотки для выявления антигена вируса использовали Zenon Labeling Kit Alexa Fluor 546 против иммуноглобулина мыши IgG1 (Sigma).

Для выявления апоптотически измененных клеток применяли метод окрашивания клеточного осадка красителем Hoechst 333258 (Sigma, USA). Препараты исследовали в системе конфокального лазерного микроскопа LSM510META при возбуждении 546 нм для выявления вирусного антигена и 405 нм для определения апоптотически измененных клеток.

Проводили биохимические исследования клеток, зараженных ХВ. Определение активности АМФ (аденозин моно-5'-нуклеотидазы) проводили путем добавления к монослою клеток 20 мкл субстрата для АМФ (4 мг АТФ на 1 мл трис-HCl-буфера pH = 7,8, содержавшего 87 мг NaCl, 70 мг MgCl_2 на 6 H_2O). Выявление активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) проводили по методу Лойда в собственной модификации [1].

Определение активности миелопероксидазы (МПО) проводили путем добавления к монослою клеток 100 мкл раствора (4 мг o-phenylenediamine, ICN, на 10 мл фосфатно-цитратного буфера pH = 5,0 с добавлением 500 мкл 0,33% перекиси водорода). Выявление активности катионных белков (КБ) проводили путем добавления к монослою клеток 50 мкл раствора зеленого прочного (1 мг прочного зеленого на 1 мл метанолового трис-буфера pH = 8,0–8,2).

Количество продуктов реакции определяли по поглощению раствора на спектрофотометре «Labsystem Multiscan RC» (Финляндия) при соответствующих для определяемых субстратов длинах волн. Результаты спектрофотометрического исследования выражали в виде индекса стимуляции (Т), который вычислялся как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции зараженных ХВ и ВКЭ нейтрофилов и интактных клеток, к среднему показателю оптической плотности раствора для интактных клеток, в процентах.

Для изучения ультраструктуры клеток использовали метод сканирующей и трансмиссионной микроскопии. Для исследования методом сканирующей микроскопии клетки на покровных стеклах подвергали специальной обработке и изображения образцов получали на электронном микроскопе Ultra 55 с ускоряющим напряжением 800 В — 1 кВ. Обработку материала для электронной микроскопии производили согласно традиционным методам и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью метода флюоресцирующих антител, при внесении в первичную культуру макрофагов хантавируса, определена цитоплазматическая локализация специфического антигена. При этом помимо наружной цитоплазматической мембраны антиген выявлялся в перинуклеарном пространстве цитоплазмы макрофагов. Необходимо отметить изменение количества антигенсодержащих клеток в зависимости от сроков инкубации: повышение их числа через 15 мин и 4 ч инкубации и снижение через 2 и 3 ч. Процент таких клеток составил $53,5 \pm 4,6 \%$, $49,0 \pm 2,8$ и $36,0 \pm 7,07$; $24,0 \pm 1,8 \%$ соответственно.

При титровании вирусосодержащей жидкости до заражения клеток и в последующие периоды инкубации нами было установлено снижение титра ТКИД 50/0,2 мл в опытных пробах на 2,0 lg через 15, 30 и 60 мин контакта. Это свидетельствовало об активной адсорбции вируса на поверхности макрофагов уже после 15 минут контакта.

При сравнении динамики накопления специфического антигена в первичных культурах резидентных макрофагов, полученных от мышей и морских свинок, выявлено статистически недостоверное различие в количестве антигенсодержащих клеток. Результаты этого исследования указывают на способность ХВ в одинаковой степени заражать популяцию макрофагов, независимо от их принадлежности к различным видам животных.

Интерес представляют полученные нами данные о динамике накопления специфического антигена в популяции моноцитов крови животных в зависимости от времени предварительной, до заражения вирусом, инкубации клеток. В случае заражения моноцитов без предварительной инкубации отмечался низкий процент антигенсодержащих клеток, тогда как после предварительной инкубации моноцитов в течение 18 ч количество подобных клеток возрастало, а после 6 с достигало максимальных цифр. Так, через 15 мин после заражения хантавирусом процент антигенсодержащих клеток в популяции моноцитов без предварительной инкубации составлял $2 \pm 0,6 \%$, при инкубации монослоя клеток в течение 18 ч до инфицирования — $35 \pm 1,7 \%$ и при инкубации в течение 6 с — $52,3 \pm 3,2 \%$.

Таким образом, полученные нами данные выявили, что восприимчивость моноцитарных клеток к хантавирусной инфекции возрастает при достижении ими последней стадии дифференцировки.

Подобные результаты были получены другими исследователями [9] при заражении ХВ перевиваемой линии клеток — ТНР-1, являющейся предшественником моноцитов, и моноцитов/макрофагов первичной культуры. В последнем случае цитокин- и хемокинпродуцирующая активность клеток после их инфицирования хантавирусом была выше. По мнению авторов, эти данные указывает на повышенную способность более зрелых клеток к реакции в ответ на введение инфекта, что позволяет применять первичную культуру моноцитов/макрофагов как модель для изучения хантавирусной инфекции.

Специфическое свечение цитоплазмы нейтрофилов, преимущественно диффузного характера, выявлялось после 1 ч контакта с ХВ. Через 2 ч инкубации определялось внутриклеточное свечение в виде глыбок, и его интенсивность достигала $42,6 \pm 5,6$ усл. ед., максимальные показатели составили $234,56 \pm 15,7$ усл. ед. после 4 ч инкубации, затем они кратковременно снижались (5 ч) и вновь нарастали, в динамике наблюдения до 24 ч, оставаясь значительно выше уровня контроля. В дальнейшем, к 2 с наблюдения количество антигенпозитивных нейтрофилов было минимальным вследствие деградации культуры клеток.

Исследование методом сканирующей электронной микроскопии показало, что после 15 мин контакта с ХВ обнаруживается стимуляция нейтрофилов. Это проявлялось появлением многочисленных округлой формы складок на поверхности клеток, которые свидетельствовали об их специфической активации, также в этот период на поверхности нейтрофилов определялись вирусные частицы. Через 45 мин специфическая стимуляция клеток была более выражена, складчатость поверхности нейтрофилов увеличивалась, а также усиливалась адгезия клеток к поверхности, что приводило к их уплощению и появлению ветвящихся псевдоподий. С течением времени определялись нейтрофилы с наличием на поверхности экзоцитированных компонентов, количество клеток со сглаженной поверхностью увеличивалось, помимо этого появлялись уплощенные клетки, где обнаруживалось большое количество вирусных частиц. После 6 ч контакта с ХВ все нейтрофилы округлялись, в результате появления многочисленных выемок их поверхность приобретала пенистый вид, между клетками обнаруживались фибриллоподобные псевдоподии. После 18 — 24 ч инфицирования ХВ, общее количество клеток падало вследствие их деградации, оставшиеся нейтрофилы были округленной формы без псевдоподий.

С помощью электронной микроскопии установлено, что после адсорбции на поверхности фагоцита ХВ проникает в клетку путем слияния его оболочки с плазмалеммой, не нарушая ее. В дальнейшем, наблюдались патологические изменения в макрофагах. К ним относились: образование микрофиламентов, микротрубочек, виропластов; дислокализация клеточных органелл в перинуклеарное пространство цитоплазмы; вакуолизация ее периферической части; гипертрофия шероховатого и гладкого эндоплазматического ретикулама

и образование многослойных миелоноподобных структур. Выход ХВ из макрофагов осуществлялся путем почкования на поверхности фагоцита. Таким образом, ХВ, как и все вирусы, содержащие суперкапсид, осуществлял вход и выход из клетки-мишени, не разрушая ее плазмалеммы, что и определяет их способность к длительной репродукции в макрофагах без цитопатического эффекта.

В нейтрофилах, после 15 мин контакта с ХВ, обнаружено изменение плазмалеммы, характерное для стимуляции клеток в ответ на внедрение инфекта. Это выражалось в появлении многочисленных псевдоподий округлой формы с электронноплотным содержанием. С течением времени в $35 \pm 3,1\%$ клеток выявлялись морфологические признаки, характерные для апоптоза (2 ч). Клетки округлялись, количество псевдоподий резко сокращалось, уменьшалась площадь цитоплазмы, обнаруживался кариорексис.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о цитопатогенном воздействии ХВ на нейтрофилы. В отношении макрофагов, установлено, что при отсутствии выраженных деструктивных изменений эти клетки могут выступать в роли длительного источника вируса и принимать определенное участие в процессе его диссеминации в организме.

Фермент аденозин моно-5'-нуклеотидаза (АМФ) является основным компонентом пуринового катаболизма, играющего важную роль в восприятии клетками внешних сигналов. Он локализуется на наружной мембране клеток и является регулятором уровня циклического аденозинмонофосфата. Нами установлено повышение активности АМФ в нейтрофилах после заражения ХВ в течение всего периода наблюдения, что указывало на выраженную стимуляцию клеток. Показатели активности этого фермента составили от $1,5 \pm 0,51$ до $51,2 \pm 1,3\%$ относительно контроля, который принят за 0. Определено, что на фоне увеличения числа антигенно-положительных макрофагов выявлялось понижение активности 5'-нуклеотидазы. Минимальные показатели активности этого фермента наблюдались через 30 мин после заражения ($-46,7 \pm 2,7\%$), несколько повышались через 7 ч ($-16,7 \pm 1,6$) и вновь снижались до конца срока наблюдения ($-40,8 \pm 2,7\%$).

АТФаза клеточных мембран ответственна за расщепление аденозинтрифосфата, т.е. гидролизует богатые энергией фосфатные связи с освобождением энергии. При изучении активности этого фермента в нейтрофилах и макрофагах, зараженных ХВ, выявлено, что динамика изменения активности АТФазы совпадала с таковой для 5'-нуклеотидазы. При этом на протяжении всего срока наблюдения значения активности АТФазы не достигали контрольных, и наименьшая активность фермента отмечалась через 30 мин после заражения ($-24,14 \pm 1,7\%$ для нейтрофилов и $-15,4 \pm 1,6\%$ для макрофагов).

Характерной особенностью метаболизма фагоцитирующих клеток — нейтрофилов и макрофагов — является их способность под влиянием различных факторов мгновенно генерировать кислородные радикалы. В образовании реактивных

продуктов кислорода при переносе водорода от субстрата, подвергающегося окислению — «донора водорода», на другой субстрат — «акцептор водорода» принимают участие ферменты — дегидрогеназы. При заражении хантавирусами нейтрофилов и макрофагов, динамика показателей активности лактатдегидрогеназы носила волнообразный характер. Индекс стимуляции достигал минимального значения через 45 мин и 4 ч после заражения и составил $-8,8 \pm 0,65\%$. Максимального значения индекс стимуляции для лактатдегидрогеназы достиг через 5 ч и составил $19,56 \pm 0,45\%$.

Миелопероксидаза (МПО) — это гемопротейн, присутствующий в азурофильных гранулах нейтрофилов, выходящий при активации клетки в фаголизосому. Нами выявлено, что при заражении нейтрофилов ХВ, показатели активности МПО имели высокие значения на протяжении всего срока наблюдения. Так, в начальные сроки после заражения (45 мин, 2 ч) выявлялся максимальный индекс стимуляции $100 \pm 2,3\%$, затем отмечалось его снижение до $25,6 \pm 0,2\%$ (4 ч) и вновь увеличение к 9 ч, когда индекс стимуляции составил $58,4 \pm 0,65\%$.

Итак, в нейтрофилах и макрофагах, зараженных хантавирусом, нами обнаружено волнообразное изменение активности исследованных ферментов. При этом бактерицидная активность фагоцитов повышалась параллельно с нарастанием внутриклеточного содержания вирусного антигена. Установленное нами постепенное повышение и последующее понижение показателей активности компонентов кислородзависимой системы к концу срока наблюдения объясняется активацией плазматической мембраны клеток в ответ на проникновение ХВ, что коррелировало с активностью эктоферментов плазматической мембраны (5'-нуклеотидазы и АТФ-азы). Это становится понятным, так как известно, что фермент, окисляющий НАДФ-оксидазу, находится в плазматической мембране и мембранных фагосомах, образующихся из ее инвагинатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патологические процессы, развивающиеся в клетках под влиянием вирусов, принципиально отличаются от всех других форм ее патологии. Некоторый период времени инфицированные вирусом клетки могут оставаться жизнеспособными как при проявлении цитопатических изменений, так и без них. Внутриклеточные изменения тесно связаны с метаболизмом и изучение ферментативного профиля инфицированных вирусом клеток позволяет дифференцировать характер взаимоотношений клетка-вирус. При исследовании патогенеза хантавирусных инфекций к важному и на настоящий момент нерешенному вопросу относится определение мест кодирования главных детерминант вирусов в начальный период заболевания. Это включает: 1) выявление локализации рецепторов, используемых этими вирусами для адгезии на поверхность клеток; 2) обнаружение типа клеток, поддерживающих первичное размножение вирусов; 3) раскрытие механизмов тропизма хантавирусов к

различным тканям. В свете решения этих вопросов значение клеток системы врожденного иммунитета в патогенезе хантавирусных инфекций приобретает особый смысл, который усиливается фактом повсеместного распространения этих клеток в организме человека. Причем ХВ относятся к той группе вирусов, которая резистентна к действию фагоцитов и способна к внутриклеточной репродукции в них, преодолевая, таким образом, биологический барьер, препятствующий распространению возбудителя из первичного очага инфекции и защищающий от заражения чувствительные клетки различных органов. Необходимо также учитывать, что источником инфекции в организме могут стать и те макрофаги, которые являются непермиссивной системой для ХВ, потому что с адсорбированным на мембране вирусом эти фагоциты могут быть источником его дальнейшего распространения.

Полученные в настоящей работе результаты указывают на то, что при невосприимчивости к вирусным инфекциям организма в целом (например, взрослых мышей к возбудителю геморрагической лихорадки с почечным синдромом [3]), к этим инфекциям могут быть чувствительны его отдельные клеточные компоненты, а именно, — макрофаги. Это определяет макрофаги в качестве мишеней для ХВ, особенно в случае их размножения. С позиции имеющейся концепции противовирусного иммунитета [11], на начальном этапе заболевания инфицированные вирусами моноциты/макрофаги способны инициировать иммунный ответ организма, даже в случае, если вирусы в них не размножаются. Что же касается нейтрофилов, то в отношении этих клеток ХВ проявляет цитопатогенные свойства, на что указывает появление апоптотически измененных клеток и уменьшение периода жизнеспособности клеточной культуры.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.740.11.0182).

ЛИТЕРАТУРА

1. Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И. Изменение метаболической активности макрофагов под влиянием вируса клещевого энцефалита // Биохимия. — 2007. — Т. 72, Вып. 2. — С. 236 — 246.
2. Скрипченко А.А. Вирус Марбург и мононуклеарные фагоциты: изучение взаимодействия // Терапевт. архив. — 1997. — № 3. — С. 214 — 217.

Сведения об авторах

Плехова Наталья Геннадьевна — заведующая лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии ФБГУ «НИИЭМ» СО РАМН, ведущий научный сотрудник междисциплинарной лаборатории электронной микроскопии и обработки изображений Института физики и информационных технологий ДВФУ, доктор биологических наук (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1; тел. раб.: 4232 442 434, факс: 4232 441 147; e-mail: pl_nat@hotmail.com)

Ляпун Ирина Николаевна — целевой аспирант второго года обучения лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии ФБГУ «НИИЭМ» СО РАМН

Сомова Лариса Михайловна — директор ФБГУ «НИИЭМ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Компанец Галина Геннадьевна — ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагической лихорадки с почечным синдромом ФБГУ «НИИЭМ» СО РАМН

Смирнов Илья Николаевич — целевой аспирант третьего года обучения Междисциплинарная лаборатория электронной микроскопии и обработки изображений ДВФУ

3. Смородинцев А.А. Основы противовирусного иммунитета. — М.: Медицина, 1975. — 86 с.

4. Elbim C., Monceaux V., Mueller Y.M., Lewis M.G. et al. Early divergence in neutrophil apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates // J. Immunol. — 2008. — Vol. 181, N 12. — P. 8613 — 8623.

5. Engelich G., White M., Hartshorn K.L. Role of the respiratory burst in co-operative reduction in neutrophil survival by influenza A virus and Escherichia coli // J. Med. Microbiol. — 2002. — Vol. 51, N 6. — P. 484 — 490.

6. Helmy K.Y., Katschke K.J. Jr., Gorgani N.N., Kljavin N.M. et al. CRIg: A macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens // Cell. — 2006. — Vol. 124. — P. 915 — 927.

7. Jin M., Park J., Lee S., Park B. et al. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis // Virology. — 2002. — Vol. 294, N 1. — P. 60 — 99.

8. Kennedy A.D., DeLeo F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection // Immunol. Res. — 2009. — Vol. 43, N 1. — P. 25 — 61.

9. Markotić A., Hensley L., Daddario K., Spik K. et al. Pathogenic hantaviruses elicit different immunoreactions in THP-1 cells and primary monocytes and induce differentiation of human monocytes to dendritic-like cells // Coll. Antropol. — 2007. — Vol. 31, N 4. — P. 1159 — 1167.

10. Mogensen S.C. Macrophages and natural resistance to virus infection. In: The Reticuloendothelial System: A Comprehensive Treatise. — London, 1988. — 10 p.

11. Schrier R.D., McCutchan J.A., Wiley C.A. Mechanisms of immune activation of human immunodeficiency virus in monocytes/macrophages // J. Virol. — 1993. — Vol. 67, N 10. — P. 5713 — 5720.

12. Simonet M., Fauchere J.L., Berche P. Role of virulence-associated plasmid in the uptake and killing of Yersinia pseudotuberculosis by resident macrophages // Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. — 1985. — Vol. 136. — P. 283 — 294.

13. Temonen M., Lankinen H., Vapalahti O. Effect of Interferon- α and cell differentiation on Puumala virus infection in human monocyte/macrophages // Virol. — 1994. — Vol. 206. — P. 8 — 15.

14. Waldo S.W., Li Y., Buono C., Zhao B. et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques // Am. J. Pathol. — 2008. — Vol. 172, N 4. — P. 1112 — 1126.

15. Wu L., Morahan P.S. Macrophages and other nonspecific defenses: role in modulating resistance against herpes simplex virus // Curr. Top. Microbiol. — 1992. — Vol. 179. — P. 89 — 110.

Е.В. Половников ¹, В.В. Ступак ¹, А.Г. Самохин ¹, И.А. Васильев ¹, О.Б. Добрякова ¹,
Е.Я. Шевела ², Е.Р. Черных ²

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА В МОДЕЛИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У КРЫС

¹ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии (Новосибирск)

² НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Настоящая работа посвящена оценке эффектов трансплантации МСК костного мозга (КМ-МСК) и жировой ткани (ЖТ-МСК) в модели очагового повреждения головного мозга у крыс. Исследования проводили на крысах линии Вистар (самцы и самки в равном соотношении; масса тела 250–270 г; n = 50). Травматическое повреждение головного мозга моделировали с использованием оригинального пружинного механизма, позволяющего дозировать силу удара. Неврологические нарушения оценивали с помощью шкалы по Chen, теста вертикальной сетки и водного лабиринта Морриса. При введении КМ-МСК и ЖТ-МСК в первые сутки отмечается статистически значимое снижение неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой. ЖТ-МСК характеризовались несколько большей эффективностью по сравнению с КМ-МСК.

Ключевые слова: модель контролируемого коркового повреждения, неврологический дефицит, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, жировая ткань

HUMAN BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELL INFLUENCE ON NEUROLOGICAL DEFICIT RECOVERY IN A MODEL OF SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY IN RATS

E.V. Polovnikov ¹, V.V. Stupak ¹, A.G. Samokhin ¹, I.A. Vasiliev ¹, O.B. Dobryakova ¹,
E.Ya. Shevela ², E.R. Chernykh ²

¹ Research Institute of Traumatology and Orthopedics (Новосибирск)

² Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

In the present study we characterized the effect of transplantation of bone marrow and adipose tissue MSCs in the model of brain injury in rats. This study was performed on Wistar rats (males and females in equal proportions, with body weight of 250–270 g; n = 50). Traumatic brain injury was produced by original spring-loaded mechanism to precise dosing of impact force. Neurological disorders were assessed by Chen scale, a vertical grid test and a Morris water maze. MSC injections on day 1 were accompanied by a significant reduction in neurological deficit in compare with the control group. Adipose tissue derived MSCs were found to have a more pronounced effectiveness than MSCs obtained from bone marrow.

Key words: controlled cortical injury model, neurological deficit, mesenchymal stem marrow, adipose cells

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из наиболее актуальных проблем неотложной нейрохирургии, что обусловлено сложностью диагностики и лечения, частотой инвалидизации пострадавших, а также преимущественным поражением наиболее активной части трудоспособного населения [1]. Поэтому поиск новых способов лечения травматических очаговых повреждений головного мозга, способствующих более быстрому восстановлению мозговых функций, остается весьма сложной и актуальной задачей.

Низкая эффективность лечения черепно-мозговой травмы (ЧМТ) в значительной степени обусловлена недостаточным пониманием патогенеза данной патологии и отсутствием адекватных экспериментальных моделей для оценки эффективности новых терапевтических стратегий [1]. Известно, что важная роль в патогенезе ЧМТ отводится системной воспалительной реакции, которая является причинным фактором развития и прогрессии вторичных повреждений. Поэтому

повышение эффективности лечения ЧМТ связывают с регуляцией воспалительной реакции, в частности, подавлением избыточного воспаления в раннем посттравматическом периоде. Кроме того, ключевыми факторами, обеспечивающими эффективную посттравматическую репарацию в нервной ткани, являются формирование новых сосудов и генерация нервных клеток. С этой точки зрения, трансплантация стволовых клеток, способных активировать ангио- и нейрогенез и модулировать иммунный ответ, представляется перспективным направлением в лечении ЧМТ [2, 4].

Действительно, многочисленные экспериментальные исследования в моделях повреждения ЦНС у животных показали эффективность трансплантируемых стволовых клеток в восстановлении неврологического дефицита [2, 6, 7, 8]. Среди различных типов клеток, значительный интерес в последнее время привлекают мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), обладающие выраженной иммуносупрессорной и

противовоспалительной активностью и способные продуцировать широкий набор факторов с проангиогенной и нейропротективной активностью [4, 5, 10]. Данный тип клеток легко генерируется из прилипающих ядросодержащих клеток костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ). Ранее было показано, что МСК, полученные из разных тканевых источников, могут различаться по своим биологическим свойствам [3]. Нами была разработана модель стандартизированного по силе удара повреждения головного мозга, характеризующейся развитием стойкого тяжелого неврологического дефицита. Целью настоящей работы стало сравнительное исследование влияния КМ-МСК и ЖТ-МСК человека на восстановление неврологического дефицита в разработанной модели ЧМТ у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на 50 животных (крысы линии Вистар с массой тела 250–270 г). Травматическое повреждение головного мозга моделировали с использованием оригинального

пружинного механизма, позволяющего дозировать силу удара. Все животные были разделены на 5 групп и наблюдались в течение 21 дня. Группу 1 составили 17 контрольных животных, которым наносили повреждение головного мозга и вводили физиологический раствор в хвостовую вену на 1-е и 7-е сутки в отсутствие клеточной терапии. Группу 2 ($n = 11$) составили животные, которым на 1-е сутки после повреждения вводили 1 млн КМ-МСК в хвостовую вену. Группу 3 ($n = 3$) составили животные, которым КМ-МСК (1 млн клеток на животное) вводили на 7-е сутки. Группу 4 ($n = 17$) и 5 ($n = 4$) составили животные, которым после нанесения повреждения вводили ЖТ-МСК (1 млн клеток на животное в/в, соответственно, на 1-е и 7-е сутки). Во всех группах животным на 1-е сутки проводили противоотечную терапию дексаметазоном в дозе 0,05 мг, в/м однократно. Зону повреждения интраоперационно орошали антибиотиком (Sol. Enghili 5% – 0,05 мг). Кормление животных до момента восстановления способности к самостоятельному приму пищи осуществлялось детским питанием

Таблица 1

Сравнительная характеристика экспериментальных групп (1)

	Введение физраствора (контроль) $n = 17$	ММСК 1-е сутки $n = 11$	ММСК 7-е сутки $n = 3$	ЖТ 1-е сутки $n = 17$	ЖТ 7-е сутки $n = 4$
Chen 1-е сутки	15,1 ± 0,26	14,1 ± 0,37	14,7 ± 0,33	14,8 ± 0,23	15,0 ± 0,71
Chen 7-е сутки	9,3 ± 0,39	7,9 ± 0,48 *	8,7 ± 0,33	7,5 ± 0,34 **	8,8 ± 1,03
Chen 14-е сутки	6,1 ± 0,34	4,3 ± 0,45 **	4,3 ± 0,33	3,3 ± 0,27**, #	3,8 ± 0,48
Chen 21-е сутки	3,2 ± 0,29	1,8 ± 0,33 **	2 ± 0	1,1 ± 0,19 **	1,5 ± 0,29

Примечание: *, ** – $p < 0,05$ и $< 0,01$; достоверность различий по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ достоверность различий между КМ-МСК и ЖТ-МСК; (Ри-критерий Вилкоксона-Манна – Уитни).

Таблица 2

Сравнительная характеристика экспериментальных групп (2)

	Введение физраствора (контроль) $n = 17$	ММСК 1-е сутки $n = 11$	ММСК 7-е сутки $n = 3$	ЖТ 1-е сутки $n = 17$	ЖТ 7-е сутки $n = 4$
Morris 1-е сутки	–	–	–	–	–
Morris 7-е сутки	53,3 ± 1,8	48 ± 2,2	48 ± 4,2	55 ± 2,1	53 ± 5,1
Morris 14-е сутки	35,5 ± 2,6	33 ± 1,8	35 ± 4,4	36 ± 1,6	37 ± 5,8
Morris 21-е сутки	24,8 ± 2,2	22 ± 1,3	22 ± 3,8	24 ± 1,0	26 ± 3,8

Примечание: *, ** – $p < 0,05$ и $< 0,01$; достоверность различий по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ достоверность различий между КМ-МСК и ЖТ-МСК; (Ри-критерий Вилкоксона – Манна – Уитни).

Таблица 3

Сравнительная характеристика экспериментальных групп (3)

	Введение физраствора (контроль) $n = 17$	ММСК 1-е сутки $n = 11$	ММСК 7-е сутки $n = 3$	ЖТ 1-е сутки $n = 17$	ЖТ 7-е сутки $n = 4$
Сетка 1-е сутки	–	–	–	–	–
Сетка 7-е сутки	169 ± 9,9	193 ± 8,4	201 ± 15	170 ± 11	185 ± 28
Сетка 14-е сутки	217 ± 8,1	236 ± 7,9	239 ± 20	225 ± 7	228 ± 20
Сетка 21-е сутки	251 ± 4,0	266 ± 5,7	257 ± 8	225 ± 5	248 ± 18

Примечание: *, ** – $p < 0,05$ и $< 0,01$; достоверность различий по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ достоверность различий между КМ-МСК и ЖТ-МСК; (Ри-критерий Вилкоксона – Манна – Уитни).

«Нутрикомп» или «Фрезубим» через пипетку. Животные, неспособные к приему пищи через пипетку, получали инъекции физиологического раствора внутримышечно в дозе 3–4 мл/сутки.

КМ- и ЖТ-МСК были получены от условно здоровых доноров при проведении стерильной пункции и процедуры липосакции. Для получения КМ-МСК мононуклеарные клетки костного мозга инкубировали в пластиковых флаконах для культур тканей («Nunclo», Дания) в питательной среде MEM («БиолоТ», Санкт-Петербург), дополненной 100 мкг/мл гентамицина и 20 % FCS, при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Через 48 ч неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток культивировали до получения конфлюентного слоя. Отделение МСК от поверхности флакона при пассировании осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина/0,02% раствора ЭДТА. Жировую ткань подвергали ферментативной диссоциации с использованием 0,1% раствора коллагеназы I типа (Sigma-Aldrich, США) в течение 30–40 мин при 37 °C. После инактивации фермента средой αMEM/2 % FCS, клетки пропускали через фильтр (размер пор 100 мкм) для удаления клеточного дебриса. В завершении определяли количество и жизнеспособность ядродержащих клеток. Дальнейшее культивирование и пассирование проводили аналогично костномозговому клеткам.

Неврологический статус оценивали на 1, 7, 14 и 21-е сутки с помощью шкалы тяжести неврологических нарушений (ОТНН, Chen et al., 2001) [6, 7]. 13–18 баллов соответствовало выраженному, 7–12 – умеренному и 0–7 – легкому неврологическому дефициту. Помимо шкалы Chen et al., физические и когнитивные функции оценивались с помощью «вертикальной сетки» и водного лабиринта Морриса [1]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0, используя непараметрические критерии для зависимых ($P_{\text{кз}}$, критерий знаков) и независимых ($P_{\text{вм}}$, критерий Вилкоксона – Манна – Уитни) выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование очагового повреждения головного мозга сопровождалось развитием грубых неврологических нарушений в первые сутки послеоперационного периода. Сумма баллов по шкале ОТНН в контрольной группе составила $13,9 \pm 0,36$, что свидетельствовало о развитии выраженных повреждений головного мозга. К 7-м суткам у животных данной группы регистрировалось спонтанное снижение неврологических расстройств до $8,4 \pm 0,22$ и к 14-м суткам – до $5,3 \pm 3,2$ балла. Тем не менее, даже через 3 недели полного купирования неврологических расстройств не наблюдалось ($3,2 \pm 0,29$ балла).

Тяжесть неврологических нарушений на 1-е сутки послеоперационного периода во всех опытных группах животных была сходной с показателями в контрольной группе, однако восстановление

неврологического статуса в этих группах было достоверно более выраженным по сравнению с животными, которым не проводилась клеточная терапия. Это проявлялось в виде достоверных различий в группах с введением КМ-МСК и ЖТ-МСК на 1-е сутки и тенденции в группах животных, которым МСК вводили на 7-е сутки. Так, в группе 2 неврологический дефицит к 7-м суткам уменьшался до $7,9 \pm 0,48$ (против $8,4 \pm 0,22$ в контрольной группе), а к 14-м суткам – до $4,3 \pm 0,45$ (против $5,3 \pm 3,2$ в контроле). Причем к исходу 3-й недели степень неврологических нарушений уменьшалась до $1,8 \pm 0,33$ (в контрольной группе – $3,2 \pm 0,29$). Животные, которым вводили клетки, были активнее и уже через сутки могли самостоятельно принимать пищу. В контрольной группе животные начинали самостоятельно питаться с 3–4-х суток.

При сравнении двух типов МСК отмечается лучшая динамика восстановления неврологического статуса при введении ЖТ-МСК в первые сутки после травмы. Так, эффективность неврологического восстановления на 14-е сутки у животных 4-й группы была достоверно выше, чем у животных 2-й группы.

В то же время трансплантация МСК, независимо от их типа и сроков введения клеток, не сопровождалась более эффективным восстановлением статической активности и когнитивных функций.

В литературе накоплено достаточное количество убедительных фактов, что введение МСК в модели ЧМТ у крыс или мышей приводит к регрессу неврологических расстройств. Полученные нами данные продемонстрировали способность КМ-МСК и ЖТ-МСК человека позитивно влиять на функциональное восстановление у крыс с грубым неврологическим дефицитом в модели очагового повреждения головного мозга. Сравнение эффектов КМ-МСК и ЖТ-МСК показали, что введение ЖТ-МСК в 1-е сутки после травмы оказывает большее влияние на восстановление неврологического дефицита. Анализ эффективности клеточной терапии в зависимости от сроков введения КМ-МСК и ЖТ-МСК не выявил существенных различий в уровне двигательной активности. Тем не менее, животные с введением клеток на 1-е сутки отличались более быстрым восстановлением способности к самостоятельному приему пищи.

Позитивное влияние МСК при их внутримышечном введении позволяет предполагать, что в указанные сроки МСК способны эффективно мигрировать в зону повреждения, и для реализации их эффекта не требуется локальной имплантации клеток. С другой стороны, эффективность внутримышечного введения МСК свидетельствует в пользу гипотезы, что эффект МСК может опосредоваться через паракринную регуляцию воспалительного и иммунного ответа при взаимодействии МСК с клетками иммунной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белошицкий В.В. Современные принципы моделирования черепно-мозговой травмы в

эксперименте // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. — 2005. — Т. 1, № 1. — С. 18–20.

2. Григорян А.С. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на развитие посттравматических процессов в головном мозге крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — 21 с.

3. Останин А.А., Петровский Я.Л., Шевела Е.Я., Черных Е.Р. Мультиплексный анализ цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, MMP-9 и TIMP-1, продуцируемых мезенхимальными стромальными клетками костного мозга, жировой ткани и плаценты человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2011. — № 1. — С. 29–38.

4. Южаков В.В., Конопляников А.Г., Цыб А.Ф., Рошаль Л.М. и др. Действие аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на репаративные процессы в нервной ткани при диффузной травме головного мозга крыс // Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении: тез. докл. Всерос. междунар. науч. конф., 30–31 мая 2007 г. — М., 2007. — С. 18.

5. Borlongan C.V, Hadman M., Sanberg C.D., Sanberg P.R. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required

for neuroprotection in stroke // Stroke. — 2004. — Vol. 35. — P. 2385–2389.

6. Chen J., Li Y., Wang L, Zhang Z. et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats // Stroke. — 2001. — Vol. 32. — P. 1005–1011.

7. Chen J., Sanberg P.R., Li Y., Wang L. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats // Stroke. — 2001. — Vol. 32. — P. 2682–2688.

8. Corti S., Locatelli F., Strazzer S., Guglieri M. et al. Neuronal Generation from Somatic Stem Cells: Current Knowledge and Perspectives on the Treatment of Acquired and Degenerative Central Nervous System Disorders // Current Gene Therapy. — 2003. — Vol. 3. — P. 247–272.

9. Nakada A., Fukuda S, Ichihara S., Sato T. et al. Regeneration of Central Nervous Tissue Using a Collagen Scaffold and Adipose-Derived Stromal Cells // Cells tissues organs. — 2009. — Vol. 190, N 6. — P. 256–258.

10. Parr A.M., Tator C.H., Keating A. Bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury // Bone marrow transplantation. — 2007. — Vol. 40. — P. 609–619.

Сведения об авторах

Половников Евгений Владимирович — врач-нейрохирург, аспирант ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17; тел. раб.: 224-47-13; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Ступак Вячеслав Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением, нейрохирург, врач высшей категории ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (тел. раб.: 224-47-13; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Самохин Александр Геннадьевич — старший научный сотрудник, руководитель функциональной группы экспериментальной хирургии ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (тел. раб.: 224-45-58; email: asamohin@niito.ru)

Васильев Игорь Анатольевич — врач-нейрохирург, аспирант ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (тел. раб.: 224-47-13, сот. тел.: 8-960-792-15-78; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Добрякова Ольга Борисовна — пластический хирург, доктор медицинских наук, директор Сибирского института красоты (тел. 228-21-01; e-mail: ct_lab@mail.ru)

Шевела Екатерина Яковлевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ Клинической иммунологии СО РАМН (тел. раб.: 236-03-29; e-mail: shevelak@mail.ru)

Черных Елена Рэмовна — доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, заместитель директора НИИКИ СО РАМН по науке НИИ Клинической иммунологии СО РАМН (тел. раб.: 236-03-29; e-mail: ct_lab@mail.ru)

И.В. Савкин, Э.А. Кашченко, Г.В. Селедцова

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОПУХОЛЕВОМ ПРОЦЕССЕ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Иммунизация организма ксеногенными тканевыми антигенами способна прерывать врожденную иммунологическую толерантность, препятствующую развитию иммунных реакций к их аутологичным аналогам. Известно, что значительная часть общих опухолеассоциированных антигенов относятся к классу дифференцировочных антигенов, и в норме экспрессируются на клетках многих органов, в том числе и яичка. Так, противораковая вакцина на основе лизированных клеток сперматогенного эпителия яичка барана обладает заметным протективным эффектом в эксперименте.

В ходе данной работы мы решили исследовать иммунологические аспекты вакцинации тестикулярным антигеном, приводящие к увеличению продолжительности жизни мышей-опухоленосителей. В результате работы было установлено, что вакцинация мышей-опухоленосителей тестикулярным антигеном помимо увеличения продолжительности жизни вызывает заметный прирост субпопуляции хелперных и регуляторных клеток памяти, стимулирует выход нейтрофилов в кровоток и усиливает нейтрофильный инфильтрат опухоли.

Ключевые слова: опухоль, вакцина, клетки памяти, нейтрофилы

SPECIFIC AND NONSPECIFIC IMMUNOREACTIVITY
AT THE EXPERIMENTAL TUMOR PROCESS

I.V. Savkin, E.A. Kaschenko, G.V. Seledtsova

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

Immunization with xenogeneous tissue antigens is able to interrupt innate immune tolerance interfering immune response to autologous analogues. The main part of the differentiation antigens is known to be normally expressed on the surface of numerous organs cells including testis. Thus, anticancer vaccine based on sheep testis spermatogenic epithelium lysed cells reveals notable protective effect in experiment.

In this work we decided to investigate immunological aspects of the vaccination resulting in tumor mice lifetime increase. Following, testicular antigen vaccination of the tumor mice is established in addition to the lifetime increase to cause substantial helper and regulatory cells subpopulation increase, to stimulate neutrophil release and to intensify tumor neutrophil infiltrate.

Key words: tumor, vaccine, memory cell, neutrophil

Многочисленными исследованиями показано, что иммунизация организма ксеногенными тканевыми антигенами способна прерывать врожденную иммунологическую толерантность, препятствующую развитию иммунных реакций к их аутологичным аналогам [4, 7, 8]. Ранее нами показано, что средняя продолжительность жизни мышей с меланомой B16, иммунизированных ксеногенной вакциной, состоящей из лизированных опухолевых клеток человеческой меланомы BRO, достоверно увеличивается по сравнению с продолжительностью жизни мышей, иммунизированных сингенной (меланома B16) вакциной [1]. Этот эффект связан с наличием на клетках опухолей опухолеассоциированных антигенов различного происхождения, на которые направлена индукция эффективного специфического противоопухолевого ответа. Известно, что значительная часть общих опухолеассоциированных антигенов (Mage, Vage и др.) относятся к классу дифференцировочных антигенов, и в норме экспрессируются на клетках многих органов, в том числе и яичка. Нами было показано, что противораковая вакцина на основе лизированных клеток сперматогенного эпителия яичка барана обла-

дает заметным протективным эффектом в эксперименте [2]. В ходе данной работы мы решили детализировать иммунологические корреляты вакцинации тестикулярным антигеном, приводящие к увеличению продолжительности жизни мышей-опухоленосителей.

Ксеновакцинам, как и многим другим полиантигенным препаратам, часто приписывают как специфические, так и неспецифические механизмы действия. Так достоверно установлен факт выработки специфических цитотоксических клеток памяти, в ответ на стимуляцию опухолевыми полиантигенами [4, 6, 9, 11]. Однако не последнюю роль в ответе на опухоль играют и нейтрофилы [3, 5, 10]. Нейтрофилы проявляют как противоопухолевые неспецифическую, опосредованную различными активными формами кислорода и азота, и цитотоксическую активность, так и иммуносупрессорную, вероятно, связанную также с продукцией активного кислорода [3, 10].

Нами выполнена экспериментальная работа, задачей которой было исследование особенностей лимфоцитарного и нейтрофильного ответов на вакцинацию тестикулярным антигеном мышей-опухоленосителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Для индукции опухолевого роста клетки меланомы B16 (5×10^5 клеток/мышь) имплантировали под кожу передней брюшной стенки мышей. На 7–9 сутки после перевивки у всех животных был замечен опухолевый рост. Подкожную вакцинацию проводили трижды, начиная с 3-х суток после инокуляции опухоли с интервалом 7 суток. Одна доза вакцины была эквивалентна 5×10^6 клеток/мышь. Было сформировано 2 группы животных по 25 мышей в каждой. 1 группа (контроль) — мыши с опухолью, без воздействия; 2 группа — мыши с опухолью, получавшие вакцину. Забор крови и селезенки для определения концентрации цитокинов и проведения цитофлуориметрии осуществляли на 21 день после привития опухоли. Забор опухолевой массы осуществляли на 14 и 28 день после привития опухоли. Субпопуляционный состав клеток селезенки и опухолевой массы определяли по следующим маркерам: CD4(CD8)/CD44/CD62L, CD4/CD25/FoxP3 (внутриклеточный), а также по параметрам фронтального и бокового рассеяния.

Животные

Эксперименты проводили на взрослых (4–5 месяцев) апатогенных мышах линии C57BL/6 (B6, H-2^b), полученных из питомника СО РАМН (г. Новосибирск). Мыши содержались в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных целей. По окончании эксперимента животных забивали методом цервикальной дислокации с соблюдением «Правил работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказом МЗ России.

Культивирование опухолевых клеток

Клетки опухолевой линии меланомы мыши B16 (H-2b) были получены из Онкологического научного центра РАМН (г. Москва). Опухолевые клетки сохраняли пассированием *in vitro* в пластиковых флаконах («Costar», США) в среде RPMI 1640, содержащей 5 mM HEPES, 2 mM L-глутамин и антибиотики (Sigma, США), а также 10% инaktivированной фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Gibco» BRL, США) в атмосфере с 5% CO₂, при 37 °C.

Приготовление вакцины

В качестве вакцинального антигена использовали клетки сперматогенного эпителия яичка барана, подвергнутые многократному замораживанию и оттаиванию с последующей лиофилизацией (тестикулярный антиген) в вакуумной сушке (VIRTIS, USA) при $t = -80^\circ$ в течение 4–6 часов, полученный препарат далее использовали в качестве вакцины в дозе, эквивалентной 5×10^6 клеток/мышь.

Получение клеточных суспензий и проточная цитофлуориметрия

Суспензии клеток селезенки и опухолевой массы получали посредством мягкого выдавливания клеток из тканевых кусочков в охлажденную среду с использованием стеклянного гомогенизатора. После осаждения недиссоциированных клеточных

конгломератов, клетки отмывали средой RPMI 1640. Определение количества клеток в суспензии проводился в камере Горяева. Окраску клеток для цитофлуориметрии проводили стандартно с использованием меченых антител (BD Bioscience, USA), в соответствии с указаниями фирмы-производителя. В работе были использованы меченые антитела: antiCD4-FITC, antiCD8-FITC, antiCD44-PE, antiCD62L-APC, antiCD25-PE, antiFoxP3-APC.

Определение концентрации цитокинов в культуральной жидкости

Уровень цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-10) был оценен в культуральных супернатантах спленоцитов нестимулированных и стимулированных меланомным антигеном (в течение 36 часов), которые затем хранились при температуре -18°C . Определение концентрации цитокинов проводили стандартно с помощью иммуноферментных тест-систем (BioSource, Intrenational, Inc. USA) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Гистологическое исследование опухолевых образцов

Фрагменты опухоли, размером не более $5 \times 5 \times 5$ мм забирали на 21-е сутки после привития и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина не менее 24 часов, обезжировали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Для гистологического исследования срезы опухоли толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты исследовали на световом микроскопе «Triton» (Seti, Бельгия) при увеличении X 600.

Статистика

Для всех выборок рассчитывали параметры среднего и ошибки среднего для нормального распределения. Сравнение выборок осуществляли на основе рангового критерия Манна — Уитни. Обработку данных по выживаемости проводили с использованием критерия Каплана-Мейера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вакцинация меланомных мышей тестикулярным антигеном приводит к статистически значимому ($p = 0,003$) увеличению средней продолжительности жизни на 22 % по сравнению с контролем (33 и 27 суток соответственно). Эти данные указывают на то, что иммунизация препаратами низкодифференцированных ксеногенных клеток может запускать иммунологические процессы, направленные на сдерживание опухолевого роста.

В результате вакцинации (табл. 1) в клетках селезенки статистически достоверно увеличилась доля центральных хелперных Т-клеток памяти (CD4 + /CD44 + /CD62L +) до 67,7 % и периферических цитотоксических Т-клеток памяти (CD8 + /CD44 + /CD62L-) до 8,3 %, что свидетельствует о формировании долгосрочных Т-клеточных реакций, связанных с Т-клетками памяти у мышей-опухоленосителей, иммунизированных тестикулярным антигеном. В этой же системе наблюдался прирост индуцибельных (CD4 + /CD25 + /FoxP3 +) регуляторных Т-клеток. Помимо стимуляции лим-

фоцитарного звена вакцинация вызывала также значительный рост концентрации нейтрофилов в кровяном русле, что свидетельствует о комплексном ответе на вакцину, включающем как специфические, так и неспецифические звенья иммунитета.

Таблица 1
Субпопуляционная структура лимфоцитарной фракции спленоцитов опухолевых мышей, не получавших (контрольная группа) и получавших (вакцинированная группа) вакцину

Субпопуляция лимфоцитов (%)	Контрольная группа	Вакцинированная группа
CD4+	35,53 ± 1,06	23,42 ± 0,85*
CD4+/CD44+/CD62L+, (% от CD4+)	2,32 ± 1,03	67,70 ± 2,54*
CD4+/CD44+/CD62L-, (% от CD4+)	0,06 ± 0,26	8,31 ± 1,21*
CD8+	41,07 ± 2,53	25,71 ± 1,62*
CD8+/CD44+/CD62L+, (% от CD8+)	0,01 ± 0,05	2,53 ± 0,05*
CD8+/CD44+/CD62L-, (% от CD8+)	0,06 ± 0,08	24,03 ± 0,56*
CD4+	35,53 ± 1,06	23,42 ± 0,85*
CD4+/CD25+/FoxP3+, (% от CD4+)	0,00	4,61 ± 0,65*
Нейтрофилы, %	6,10 ± 1,23	17,70 ± 2,05*

Примечание: * – достоверное различие между контрольной и вакцинированной группами, уровень значимости $p < 0,05$.

Цитофлуориметрический анализ гомогената опухолевой массы по параметрам фронтального и бокового рассеяния показал динамику клеточных популяций, инфильтрирующих ткань опухоли. Обнаружено, через две недели после привития опухоли в обеих группах опытных животных опухоль заметно инфильтрирована лимфоцитами, однако к концу четвертой недели лимфоциты из опухоли практически полностью элиминируются.

Ксеновакцинация резко усиливала способность спленоцитов продуцировать ИФН-гамма

в ответ на воздействие меланомным антигеном (табл. 2).

Таблица 2
Концентрации ИФН-γ и ИЛ-10 в сыворотках крови и супернатантах, нестимулированных и стимулированных антигеном мышинной меланомы, спленоцитов опухолевых мышей, не получавших (контрольная группа) и получавших (вакцинированная группа) вакцину

Цитокины	Контрольная группа, пг/мл	Вакцинированная группа, пг/мл
ИФН-γ, супернатант, пг/мл	760 ± 78	976 ± 186
ИЛ-10, супернатант, пг/мл	79 ± 23	52 ± 20
ИФН-γ, супернатант стимулированных спленоцитов, пг/мл	21 ± 5	789 ± 46*
ИЛ-10, супернатант стимулированных спленоцитов, пг/мл	0	0

Примечание: * – достоверное отличие между контрольной и вакцинированной группами, уровень значимости $p < 0,05$.

Оптическая микроскопия (рис. 1) показала выраженную инфильтрацию опухоли нейтрофилами на поздних стадиях и практически полное отсутствие лимфоцитов, что согласуется с данными цитофлуориметрии и подтверждает активное участие в процессе нейтрофилов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленных в работе данных следует, что вакцинация тестикулярным антигеном достоверно увеличивает продолжительность жизни мышей-опухоленосителей. Протективность вакцины, вероятно, обеспечивается целым рядом факторов. На начальных стадиях ведущую роль играют цитотоксические лимфоциты, специфичные к перекрестным антигенам низкодифференцированных клеток. Активный специфический иммунный противоопухолевый ответ сопровождается форми-

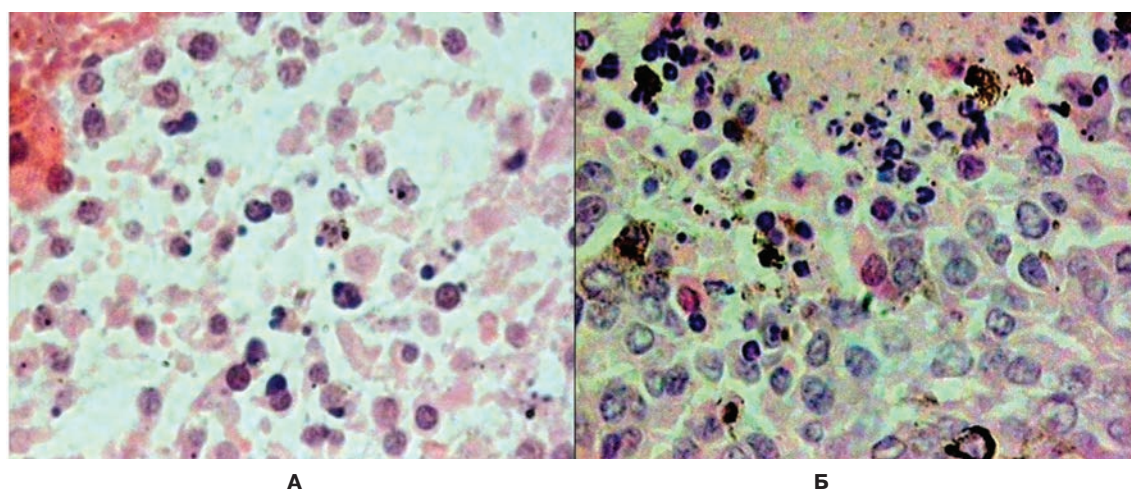


Рис. 1. А – контрольная группа, единичные лимфоциты, нейтрофилы и моноциты среди клеток опухоли. Б – вакцинированная группа, большое количество нейтрофилов и единичные лимфоциты среди клеток опухоли, признаки апоптоза в клетках меланомы.

рованием Т-клеток памяти различного фенотипа, которые, возможно, оказывают позитивную роль в поддержании долгосрочных противоопухолевых Т-клеточных реакций. В нашей экспериментальной системе мы обнаружили прирост Т-регуляторных клеток у вакцинированных мышей-опухоленосителей, что, в конечном итоге, не привело к уменьшению продолжительности жизни вакцинированных мышей.

Исследование цитокинового спектра и неспецифического звена иммунитета позволили сделать вывод о важности в противоопухолевой защите не только Т-клеточных, но и неспецифических гранулоцитарных иммунных реакций. На последних стадиях развития опухоли на передний план выступает гранулоцитарный сегмент иммунной системы, а именно нейтрофилы, не подверженный непосредственно действию регуляторных клеток. Механизмы рекрутмента нейтрофилов в опухолевый очаг нами в полной мере не изучен, однако, возможно существование нескольких механизмов. Так, на начальных стадиях, активация Т-лимфоцитов, очевидно вызывает продукцию макрофагами ИЛ-8, основного хемоаттрактанта нейтрофилов, что увеличивает локальную концентрацию нейтрофилов в очаге процесса.

На поздних стадиях, продукция ИЛ-8, уже не может служить основным механизмом привлечения нейтрофилов, так как лимфоциты в опухолевой массе практически отсутствуют. Тем не менее, нейтрофильный инфильтрат опухоли сохраняется, что возможно является следствием В-клеточного ответа на опухоль. Нейтрофилы, имея рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, очевидно, обладают повышенной тропностью к тканям, связывающим сывороточные иммуноглобулины. Следовательно, на поздних стадиях процесса, акцент смещается с ИЛ-8-опосредованного хемотаксиса на антигелозависимую цитотоксичность. Косвенным подтверждением наличия В-клеточного ответа на опухоль может служить как раз повышение концентрации нейтрофилов в кровотоке. Активация В-клеточного звена всегда сопровождается усиленным созреванием и выходом в кровоток большого числа нейтрофилов.

В итоге можно сказать, что вакцинация мышей-опухоленосителей тестикулярным антигеном барана приводит к существенному увеличению продолжительности жизни. Что в свою очередь обусловлено как непосредственно специфическим ответом на перекрестные антигены, так и локальной активацией нейтрофилов.

Сведения об авторах

Савкин Иван Владимирович – научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14)

Кащенко Эрика Александровна – ФГБУ НИИ Клинической Иммунологии СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14)

Селедцова Галина Викторовна – заведующая лабораторией клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИ клинической иммунологии СО РАМН», доктор медицинских наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14)

ЛИТЕРАТУРА

1. Кащенко Э.А., Белогородцев С.Н., Селедцова Г.В. и др. Ксеновакциноterapia меланомы в эксперименте // Сибир. онколог. журн. — 2009. — № 1. — С. 28–31.
2. Кащенко Э.А., Савкин И.В., Белогородцев С.Н., Селедцов Д.В. Влияние вакцины на основе ксеногенных дифференцировочных антигенов на иммунологические показатели и выживаемость мышей-носителей меланомы. // Вестн. Уральской мед. академ. науки: темат. вып. по аллергологии и иммунологии. — 2011. — № 2/2. — С. 31–32.
3. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднородность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 6. — С. 467–474.
4. Москалева Е.Ю., Родина А.В., Гукасова Н.В. Индукция меланомспецифического клеточного иммунного ответа у мышей после ксеногенной вакцинации клетками меланомы человека, введенными в предварительно имплантированный под кожу полиакриламидный гель // Иммунология. — 2006. — № 6. — С. 329–336.
5. Побезинский Л.А., Побезинская Е.Л., Звездова Е.С. Накопление нейтрофилов в селезенке мышей, иммунизированных клетками аллогенных опухолей // Докл. АН. — 2005. — Т. 402, № 3. — С. 421–426.
6. Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А., Силаева Ю.Ю. Кросс-реактивность Т-клеточного рецептора клон клеток памяти CD8⁺, полученного в ответе на иммунизацию клетками аллогенной опухоли // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2004. — Т. 137, № 5. — С. 563–568.
7. Селедцов В.И., Фельде М.А., Самарин Д.М. Иммунологические и клинические аспекты применения ксеновакцинотерапии в лечении меланомы // Рос. онколог. журн. — 2006. — № 4. — С. 23–29.
8. Фельде М.А., Самарин Д.М., Ницца Н.А. Оценка клеточной иммунореактивности при ксеновакцинотерапии пациентов с IV стадией колоректального рака // Мед. иммунология. — 2006. — № 1. — С. 67–72.
9. Graf N., Adam C., Mocikat R. Persistence of xenogenized vaccine cells in vivo // International journal of cancer. — 2003. — Vol. 105. — P. 217–220.
10. Gregory A.D., McGarry Houghton A. Tumor-associated neutrophils: new target for cancer therapy // Cancer research. — 2011. — Vol. 71, N 7. — P. 1–6.
11. Luo F., Wei Y., Kan B. Anti-tumor immune response against mouse melanoma to xenogeneic vaccination // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. — 2001. — Vol. 23. — P. 118–121.

С.Н. Серебренникова ¹, И.Ж. Семинский ¹, И.В. Клименков ², Н.В. Семенов ¹**КЛЕТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ И МЕХАНИЗМЫ ИХ РЕГУЛЯЦИИ В ОЧАГЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ**¹ Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)² Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)

В статье представлены показатели клеточных фаз экспериментального асептического воспаления с определением уровней интерлейкина-1 β , интерлейкина-10, кортикостерона. Выявлено, что очаг асептического воспаления характеризуется последовательной сменой клеточных популяций, регуляцию которых осуществляют IL-1 β , IL-10, кортикостерон, и к 20 суткам процесс воспаления завершается образованием плотной соединительнотканной капсулы.

Ключевые слова: асептическое воспаление, интерлейкины, кортикостерон, регуляция

**THERE ARE CELL'S REACTIONS AND REGULATORY MECHANISMS
AT THE EXPERIMENTAL ASEPTIC INFLAMMATION**S.N. Serebrennikova ¹, I.Zh. Seminsky ¹, I.V. Klimenkov ², N.V. Semenov ¹¹ Irkutsk State Medical University, Irkutsk² Institute of Limnology SB RAS, Irkutsk

The characteristics of cell's phases experimental aseptic inflammation with indicate levels of interleukin-1 β , interleukin-10, corticosterone are presented. The area of aseptic inflammation have logical relay of cell's populations, IL-1 β , IL-10, corticosterone are regulate cell's processes. And by 20 days inflammatory process complete formation dense connective capsule.

Key words: aseptic inflammation, interleukins, corticosterone, regulation

Воспаление является универсальной защитно-приспособительной компенсаторной реакцией, развивающейся в ответ на повреждение [2, 5] и относящейся к филогенетически старейшим типам защитных реакций организма [3]. Воспалительный процесс относится к адаптивным и индуктивным процессам, зависящим от суммы клеточных и гуморальных факторов, образование которых требует активной работы клеток, проявляющейся в синтезе молекул, направленных на возбуждение, развитие и купирование воспалительной реакции [4]. Цитокины являются важнейшими медиаторами воспалительного ответа [6], мощными иммунорегуляторными, про- и противовоспалительными агентами [1], изучение которых в последнее время приобретает особую актуальность.

Целью настоящей работы явилось изучение основных показателей клеточных реакций в очаге экспериментального асептического воспаления и механизмов их регуляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 120 беспородных белых крысах-самцах массой 180–220 г в осенне-зимний период. Асептическое воспаление у животных, находящихся под легким эфирным наркозом, моделировали с помощью введения под кожу бедра диффузионной камеры собственной конструкции (патент № 5030684(010989) от 04.03.1992), заполненной физиологическим раствором и изготовленной из миллипорового фильтра (SYNPOR, Чехия) размером 1 × 3 мм, объемом 2,5 мм³. Через 12 ч, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 60 суток от начала воспаления

у крыс производился забор образцов тканей с камерами для изготовления гистологических препаратов, окрашиваемых гематоксилин-эозином. На микропрепаратах на светооптическом уровне при помощи окуляра-микрометра и сетки Автандилова морфологически оценивали динамику клеточных реакций. Количественно регистрировали толщину лейкоцитарного вала вокруг стенки камеры, концентрацию клеток в вале, толщину фибробластической капсулы вокруг лейкоцитарного вала, число слоев фибробластов, концентрацию фибробластов в капсуле. У животных определяли уровень интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-10 (IL-10), кортикостерона через 12 ч, 1, 2, 3, 5 суток от начала воспалительного процесса с помощью иммуноферментного анализа. Для определения цитокинов у крыс использовались тест-наборы «Rat IL-1 β ELISA BMS630» и «Rat IL-10 ELISA BMS629» (Bender MedSystems, Vienna, Austria), кортикостерона — «Reagents for rat corticosterone ELISA» (Sigma, USA). Группу сравнения составили 10 здоровых интактных белых крыс-самцов.

Работа проводилась с учетом требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях, и была одобрена этическим комитетом ИГМУ.

Статистический анализ результатов производили с помощью пакета компьютерных программ BioStat, Microsoft Excel 2003, 2007 для Windows XP. Для показателей определялись среднее арифметическое (M), среднее квадратичное отклонение (s), коэффициенты корреляции (r). Сравнение средних

значений независимых выборок при их нормальном распределении осуществляли по t-критерию Стьюдента и F-критерию Фишера. Для проверки соответствия распределения выборочных значений закону нормального распределения применяли критерий Колмогорова-Смирнова. В условиях неподчинения закону нормального распределения применяли U-критерий Манна — Уитни. Различия величин признавали статистически значимыми при критическом уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение первых суток экспериментального асептического воспаления вокруг стенок камер формировался лейкоцитарный вал толщиной 150 ± 8 мкм с плотностью клеток 28 ± 4 на 1000 мкм² с преобладанием нейтрофилов. Нейтрофилы интенсивно захватывали продукты разрушенных тканей с последующим их массовым аутолизом вследствие незавершенного фагоцитоза. На 2—3-е сутки воспалительного процесса происходило уменьшение толщины лейкоцитарного вала вокруг стенок камер до 62 ± 6 мкм. В нем начинали преобладать макрофаги, которые активно фагоцитировали нейтрофильный детрит, очищая зону повреждения и подготавливая ее к дальнейшему фиброзированию. Начиная с 3-х суток асептического воспаления происходило постепенное замещение макрофагов в клеточном вале на фибробласты, которые формировали соединительнотканную капсулу вокруг стенок камер, достигшую максимальной толщины к 10-м суткам — 100 ± 15 мкм. Капсула имела 8—10 слоев фибробластов, синтезировавших коллаген и гликозаминогликаны. В дальнейшие сроки наблюдения происходила организация фибробластической капсулы: уменьшалась ее толщина до 50 ± 7 мкм, фибробласты превращались в фиброциты, снижалась их синтетическая активность, внутрь капсулы прорастали новые капилляры.

Через 12 ч после введения камер с физиологическим раствором содержание IL-1 β в плазме крови крыс составляло $1,7 \pm 0,4$ пг/мл с дальнейшим падением его уровня: через 1 сутки — $1,2 \pm 0,2$, через 2 суток — $0,8 \pm 0,2$ пг/мл. Начиная с 3-х суток IL-1 β в плазме крови не определялся. Концентрация IL-10 через 12 ч от начала асептического воспаления в плазме крови животных снижалась относительно фоновых показателей до $3,6 \pm 0,6$ пг/мл ($p < 0,05$), в последующие сроки исследования уровень IL-10 медленно повышался, однако к 5-м суткам не достигал фоновых показателей (1-е сутки — $10,3 \pm 1,4$; 2-е сутки — $13,1 \pm 1,7$; 3-и сутки — $15,2 \pm 1,6$; 5-е сутки — $15,6 \pm 3,2$ пг/мл). Подъем уровня кортикостерона в плазме крови животных, по сравнению с фоновыми показателями, до $47,8 \pm 4,3$ нмоль/л регистрировался через 12 ч после имплантации камер с физиологическим раствором. Затем концентрация кортикостерона плавно снижалась к 5-м суткам: 1-е сутки — $39,2 \pm 3,7$; 2-е сутки — $40,9 \pm 4,1$; 3-е сутки — $34,2 \pm 7,2$; 5-е сутки — $28,0 \pm 5,6$ нмоль/л.

Фоновые показатели исследуемых регуляторных веществ в плазме крови здоровых

интактных крыс составляли: IL-1 β — 0 пг/мл, IL-10 — $22,9 \pm 4,3$ пг/мл, кортикостерон — $37,2 \pm 3,2$ нмоль/л.

С 12 ч от начала экспериментального асептического воспаления регистрировалась противоположная картина в уровнях интерлейкинов: IL-1 β снижался на фоне увеличения IL-10. Можно предположить, что такая взаимосвязь между одними из ведущих про- и противовоспалительных цитокинов при остром асептическом воспалении является оптимальной для своевременного завершения воспалительного процесса. Максимум концентрации кортикостерона в плазме крови крыс с асептическим воспалением имелся также на срок 12 ч от начала воспалительного процесса с последующим снижением до фоновых показателей. На этом же сроке определялся самый высокий уровень IL-1 β в плазме крови крыс, следовательно, можно предположить, что продукция данного цитокина индуцировала синтез кортикостерона. В дальнейшем, по-видимому, проявилось ингибирующее действие глюкокортикоида на образование IL-1 β , который через 3 суток от момента имплантации камер в плазме крови крыс уже не обнаруживался. Со стороны IL-10 и кортикостерона регистрировалась другая картина. По нашему мнению, усиленное образование кортикостерона привело к активации синтеза противовоспалительного IL-10, концентрация которого в плазме крови стала увеличиваться с момента максимального уровня глюкокортикоида у экспериментальных животных.

Корреляционный анализ между показателями клеточных реакций в очаге асептического воспаления и содержанием в плазме крови интерлейкинов и кортикостерона показал, что толщина лейкоцитарного вала зависит от уровня IL-1 β ($r = 0,6$; $p < 0,05$), толщина фибробластической капсулы взаимосвязана с уровнем IL-10 ($r = 0,7$; $p < 0,05$). IL-1 β и IL-10 являются антагонистами ($r = -0,9$; $p < 0,05$). Чем выше уровень кортикостерона, тем меньше толщина фибробластической капсулы ($r = -0,9$; $p < 0,05$).

Таким образом, в очаге экспериментального асептического воспаления лейкоцитарная фаза протекает в течение 1-х суток, макрофагическая — 2—3 суток, фибробластическая — 3—20 суток от момента повреждения, следовательно, происходит своевременная смена клеточных популяций, оптимально выполняющих свои функции, что обеспечивается регулирующим действием IL-1 β , IL-10, кортикостерона на формообразовательные процессы в очаге воспаления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борщикова Т.И., Епифанцева Н.Н., Чурляев Ю.А. Функциональный профиль цитокинов и иммунологическая дисфункция у нейрореанимационных больных // Цитокины и воспаление. — 2011. — Т. 10, № 2. — С. 42—49.
2. Куликова А.Н. Роль воспаления в атерогенезе при сахарном диабете // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, № 3. — С. 14—20.

3. Лысикова М., Вальд М., Масиновски З. Механизмы воспалительной реакции и воздействие на них с помощью протеолитических энзимов // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 3. — С. 48–53.

4. Маянский А.Н., Маянский Н.А., Заславская М.И. Нуклеарный фактор-κВ и воспаление // Цитокины и воспаление. — 2007 — Т. 6, № 2. — С. 3–9.

5. Семинский И.Ж. Закономерности развития разных форм воспаления // Вестн. ИрГТУ. — 2003. — № 2 (14). — С. 54–58.

6. Таджиханова Д.П. Эффективность комплексной терапии у детей с микоплазменной пневмонией, ассоциированной с герпесвирусной инфекцией // Цитокины и воспаление. — 2010. — Т. 9, № 4. — С. 41–46.

Сведения об авторах

Серебренникова Светлана Николаевна – ассистент кафедры патологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ИГМУ (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел.: (3952) 24-07-65, сот. тел.: 89086476376; e-mail:)

Семинский Игорь Жанович – заведующий кафедрой патологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ИГМУ, доктор медицинских наук, профессор (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел.: (3952) 24-07-65; e-mail: igorsemin59@mail.ru)

Клименков Игорь Викторович – старший научный сотрудник отдела «Ультраструктуры клетки» ЛИН СО РАН, кандидат биологических наук, доцент (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; тел.: (3952) 42-32-80; e-mail: iklimen@mail.ru)

Семенов Николай Владимирович – старший преподаватель кафедры нормальной физиологии ИГМУ, кандидат медицинских наук, доцент (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 3; тел.: (3952) 24-07-72)

С.Н. Серебренникова¹, И.Ж. Семинский¹, И.В. Клименков², Н.В. Семенов¹

РОЛЬ АЗОКСИМЕРА БРОМИДА В МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ В ОЧАГЕ МИКРОБНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

¹ Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)² Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)

В статье представлен механизм регулирующего действия азоксимера бромида на показатели клеточных фаз микробного воспаления с определением концентраций интерлейкина-1 β , интерлейкина-10, кортикостерона. Выявлено, что стафилококковое воспаление имеет тенденцию к хронизации процесса, однако применение азоксимера бромида сокращает длительность клеточных фаз воспаления, активизирует функции клеток, реализующих воспалительный процесс, оптимизирует синтез интерлейкинов и кортикостерона, препятствуя хронизации воспаления.

Ключевые слова: стафилококк, воспаление, интерлейкины, кортикостерон, азоксимера бромид

THE ROLE OF AZOXIMERA BROMIDE IN REGULATORY MECHANISMS OF CELL'S REACTIONS AT THE MICROBIC INFLAMMATION

S.N. Serebrennikova¹, I.Zh. Seminsky¹, I.V. Klimenkov², N.V. Semenov¹¹ Irkutsk State Medical University, Irkutsk² Institute of Limnology SB RAS, Irkutsk

The regulatory mechanisms of azoximera bromide on the characteristics of cell's phases experimental microbic inflammation with indicate concentrations of interleukin-1 β , interleukin-10, corticosterone are presented. The inflammation of staphylococcus is a chronic process, however azoximera bromide shorten time cell's phases of inflammation, activate functions of inflammatory cells, optimize synthesis of interleukins and corticosterone, preclude from chronization inflammation.

Key words: staphylococcus, inflammation, interleukins, corticosterone, azoximera bromide

В нормальных условиях острое воспаление завершается быстро, но воспалительный процесс может переходить в хроническую форму, если нарушены механизмы его регуляции или если патоген не полностью удален [5]. Некоторые микроорганизмы, в том числе *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), имеют в клеточной оболочке компоненты, обуславливающие резистентность к фагоцитозу [13], что приводит к преобладанию деструктивных форм лейкоцитов в очаге воспаления, незавершенному фагоцитозу и хронизации воспалительного процесса [3]. К патогенным факторам *S. aureus* относятся микрокапсула [14], компоненты клеточной стенки [2], токсины [9] и ферменты [15].

Азоксимера бромид является высокомолекулярным химически чистым иммуномодулятором, полученным с помощью направленного химического синтеза [7, 12], обладающий широким спектром фармакологического действия на организм — иммуномодулирующего, детоксицирующего, антиоксидантного, мембранопротективного [6, 8, 11]. Однако, конкретный механизм действия азоксимера бромида на все фазы воспалительного процесса: лейкоцитарную, макрофагическую и, особенно, фибробластическую, и на регуляторные механизмы, определяющие кооперацию клеток в очаге воспаления на разных стадиях процесса, до конца не изучен.

В связи с вышеизложенным целью нашего исследования было выявление закономерностей изменения клеточных реакций и механизмов их

регуляции в очаге экспериментального микробного воспаления под влиянием азоксимера бромида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 230 беспородных белых крысах-самцах массой 180 — 220 г. Экспериментальное микробное воспаление у лабораторных крыс (1-я серия) было смоделировано путем введения под кожу бедра диффузионной камеры размером 1 × 3 мм, объемом 2,5 мм³, заполненной водной взвесью 24-часовой культуры *S. aureus* № 25943 (F-49) АТСС в дозе 10⁷ микробных тел на 1 мл, полученной по стандарту мутности. Животным 2-й серии аналогично моделировался микробный воспалительный процесс с последующим внутримышечным введением 0,06 мл иммуномодулятора азоксимера бромида в течение 7 дней. У крыс производился забор образцов тканей с камерами через 12 ч, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 60 суток от начала воспаления для количественной оценки клеточных реакций с помощью морфологических методов исследования. В очагах воспаления регистрировали толщину лейкоцитарного вала вокруг стенки камеры, концентрацию клеток в вале, толщину фибробластической капсулы вокруг лейкоцитарного вала, число слоев фибробластов, концентрацию фибробластов в капсуле.

В течение первых 5 суток воспалительного процесса у животных осуществлялся забор крови для определения интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-10 (IL-10), кортикостерона с помощью иммуно-

ферментного метода исследования. Интерлейкины исследовались с помощью тест-наборов «Rat IL-1 β ELISA BMS630» и «Rat IL-10 ELISA BMS629» (Bender MedSystems, Vienna, Austria), кортикостерон — «Reagents for rat corticosterone ELISA» (Sigma, USA). Для определения фагоцитарных числа (ФЧ) и индекса (ФИ) у крыс использовалось содержимое диффузионных камер. Группу сравнения составили 10 здоровых интактных белых крыс-самцов.

Работа проводилась с учетом требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях, и была одобрена этическим комитетом ИГМУ.

Статистический анализ результатов производили с помощью пакета компьютерных программ BioStat, Microsoft Excel 2003, 2007 для Windows XP. Для показателей определялись среднее арифметическое ($\bar{M}$), среднее квадратичное отклонение (s), коэффициенты корреляции (r). Сравнение средних значений независимых выборок при их нормальном распределении осуществляли по t -критерию Стьюдента и F -критерию Фишера. Для проверки соответствия распределения выборочных значений закону нормального распределения применяли критерий Колмогорова — Смирнова. В условиях неподчинения закону нормального распределения применяли U -критерий Манна — Уитни. Различия величин признавали статистически значимыми при критическом уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Лейкоцитарная фаза при моделировании микробного воспаления регистрировалась с 1-х по 7-е сутки воспалительного процесса. Толщина лейкоцитарного вала постепенно нарастала с максимумом на срок 3 суток — $349,4 \pm 40,3$ мкм, плотность клеток в вале была 20–25 клеток на 1000 мкм² с преобладанием нейтрофилов, характеризующихся незавершенным фагоцитозом и значительным аутолизом. ФЧ составляло 4–6 микробных тел на клетку, ФИ — 60–70 %. Начиная с 7-х суток от начала воспаления в лейкоцитарном вале начинали преобладать макрофаги, клеточный вал становился менее плотным — $18,9 \pm 0,7$ на 1000 мкм². Толщина вала снижалась до $208,7 \pm 28,4$ мкм. Часть макрофагов подвергалась деградации и аутолизу. Формирующаяся по периферии лейкоцитарного вала фибробластическая капсула имела толщину $245,0 \pm 37,8$ мкм, 4–5 слоев фибробластов образовывали параллельные ряды. В капсуле преобладали малодифференцированные формы фибробластов, синтез коллагена осуществлялся слабо. Только к 20-м суткам воспалительного процесса произошло уменьшение толщины лейкоцитарного вала до $167,5 \pm 46,2$ мкм. Фибробластическая капсула медленно уплотнялась и до 60-х суток оставалась незрелой с толщиной 250–350 мкм, недостаточным количеством коллагена, маленькой плотностью фибробластов, наличием макрофагов.

У крыс этой серии было зарегистрировано интенсивное увеличение концентрации IL-1 β в плазме

крови с максимумом через 2 суток ($28,9 \pm 1,7$ пг/мл) от начала процесса и последующим резким его снижением, но фоновое нулевое значение на 5 сутки достигнуто не было. Полученная динамика IL-1 β согласуется с данными литературы, что факторы вирулентности стафилококка усиливают синтез IL-1 β макрофагами [2]. Со стороны противовоспалительного IL-10 регистрировалось падение его концентрации в плазме крови крыс на срок 12 ч ($4,4 \pm 1,0$ пг/мл) от начала микробного воспаления (фоновое значение IL-10 — $22,9 \pm 4,3$ пг/мл). Далее уровень IL-10 увеличивался с максимальным значением через 2 суток ($50,6 \pm 5,9$ пг/мл) от начала воспаления и последующим снижением вплоть до 5 суток исследования. С 12 часов от начала микробного воспаления оба интерлейкина имели схожую динамику: максимум концентраций в плазме крови через 2 суток с дальнейшим снижением их показателей. Можно предположить, что одновременный пик концентраций IL-1 β и IL-10 ($r = 0,7$; $p \leq 0,05$) связан с цитотоксическим действием факторов вирулентности стафилококка на фагоцитирующие клетки. В процессе повреждения и лизиса нейтрофилов и макрофагов под действием бактериальных токсинов, по-видимому, происходит параллельный выброс ими провоспалительного и противовоспалительного интерлейкинов.

Со стороны кортикостерона отмечено снижение его концентрации в плазме крови крыс, по сравнению с контрольными показателями ($37,2 \pm 3,2$ нмоль/л), на протяжении всех 5 суток определения. Только на срок 2 суток наблюдался незначительный подъем глюкокортикоида практически до контрольного значения на фоне максимального уровня IL-1 β в плазме крови, который, по-видимому, оказал небольшой стимулирующий эффект на выработку кортикостерона ($r = 0,3$; $p \leq 0,05$), так как из литературных данных известно, что IL-1 β стимулирует образование глюкокортикоидов в организме [1, 4, 10]. В дальнейшие сроки воспалительного процесса наблюдалось одновременное снижение в плазме крови концентраций кортикостерона, IL-1 β и IL-10.

Таким образом, по нашему мнению, при стафилококковом воспалении происходит нарушение эффективности и преемственности между про- и противовоспалительными регуляторными механизмами, что способствует формированию неполноценного затяжного воспалительного ответа.

У животных с микробным воспалением с коррекцией азоксимера бромидом, лейкоцитарная фаза воспаления протекала в течение 5 суток. Максимальная толщина лейкоцитарного вала регистрировалась на срок 1 сутки — $340,0 \pm 42,4$ мкм. Среди клеточных форм преобладали нейтрофилы, которые интенсивно фагоцитировали фрагменты разрушенных тканей, клетки стафилококка. Их фагоцитарная активность была выше ($p \leq 0,05$), чем в серии с микробным воспалением (ФЧ = 8–10 микробных тел на клетку; ФИ = 70–75 %). Начиная с 5-х суток, в очаге воспаления преобладали

макрофаги, которые к 15-м суткам от момента введения камер полностью очистили зону повреждения от стафилококка, нейтрофильного детрита, девитализированных тканей, что позволило фибробластам эффективно формировать соединительнотканную капсулу. Фибробластическая фаза воспаления началась с 3-х суток, когда вокруг камер по периферии клеточного вала появилась тонкая фибробластическая капсула, которая закономерно развивалась, достигнув максимальной толщины на 10-е сутки — $318,3 \pm 46,2$ мкм. Начиная с 10-х суток происходило уплотнение фибробластической капсулы, уменьшение ее толщины, снижение синтеза коллагена, трансформация фибробластов в фиброциты, образование новых капилляров.

Пик концентрации провоспалительного IL-1 β зарегистрирован через 1 сутки ($21,2 \pm 2,8$ пг/мл) от начала процесса, при этом значение его было ниже ($p \leq 0,05$), чем в серии с микробным воспалением, с дальнейшим снижением его уровня. Можно предположить, что более низкий уровень провоспалительного цитокина явился результатом протективного эффекта азоксимера бромида на фагоцитирующие клетки в отношении токсинов стафилококка, которые вызывают чрезмерную активацию и цитоллиз этих клеток с выбросом достаточно больших концентраций IL-1 β .

Подъем уровня IL-10 в плазме крови наблюдался через 12 ч после имплантации диффузионных камер крысам в отличие от стафилококкового воспаления ($p \leq 0,05$), где на этот срок регистрировалось снижение IL-10 в крови. Через 1 сутки от начала микробного воспаления с коррекцией азоксимера бромидом концентрация IL-10 снижалась, что соответствовало максимальному значению IL-1 β . Далее следовал пик концентрации IL-10 на 2-е сутки ($84,4 \pm 5,8$ пг/мл) с последующим уменьшением его значения, но, вплоть до 5 суток воспалительного процесса, IL-10 сохранял высокие цифры концентрации. Можно предположить, что азоксимера бромид активирует продукцию и оптимизирует сроки выработки противовоспалительного IL-10, чем способствует более быстрому затуханию воспалительного процесса.

У крыс этой серии наблюдалось увеличение уровня кортикостерона достаточно значительное на протяжении всех 5 суток исследования, по сравнению с фоновыми показателями и уровнями, полученными в серии микробного воспаления без применения иммуномодулятора ($p \leq 0,05$). Максимальная концентрация в плазме крови кортикостерона регистрировалась через 1 сутки от начала процесса ($64,6 \pm 4,7$ нмоль/л), что соответствовало пику IL-1 β ($r = 0,6$; $p \leq 0,05$) и падению уровня IL-10 ($r = -0,8$; $p \leq 0,05$) на этот срок. Далее содержание кортикостерона снижалось на фоне повышения уровня IL-10.

Таким образом, можно предположить, что при микробном воспалении токсины стафилококка привели к хронизации процесса, нарушив механизмы регуляции клеточных реакций. Кор-

ректирующее действие азоксимера бромида на клеточные реакции в очаге микробного воспаления предупредило механизмы хронизации, улучшило его течение и исход. Применение азоксимера бромида сократило течение всех фаз воспаления, оптимизировало выработку и соотношение IL-1 β , IL-10 и кортикостерона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г., Гриневич В.В. От нейроэндокринологии к нейроиммуноэндокринологии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2001. — Т. 131, № 1. — С. 22–33.
2. Белобородов В.Б., Митрохин С.Д. Стафилококковые инфекции // Consilium medicum. — 2003. — Т. 5, № 1. — С. 21–34.
3. Варюшина Е.А., Москаленко В.В., Симбирцев А.С. Ранозаживляющее и местное иммуностимулирующее действие рекомбинантного IL-1 β человека при применении у больных с длительно незаживающими ранами и трофическими язвами // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, № 2. — С. 54–62.
4. Василенко А.М., Захарова Л.А. Цитокины в сочетанной регуляции боли и иммунитета // Успехи современ. биологии. — 2000. — Т. 120, № 2. — С. 174–189.
5. Ильина Н.И., Гудима Г.О. Воспаление и иммунитет в общеклинической практике. Общая концепция // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 4, № 3. — С. 42–44.
6. Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Посисеева Л.В. Возможности использования полиоксидония в лечении больных миомой матки // Иммунология. — 2005. — № 4. — С. 225–228.
7. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В. Полиоксидоний — иммуномодулятор последнего поколения: итоги трехлетнего клинического применения // Аллергия, астма и клинич. иммунология. — 1999. — № 3. — С. 7–12.
8. Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Разживина Н.В. Эффективность применения полиоксидония в комплексном лечении герпетических поражений ротовой полости // Иммунология. — 2005. — № 4. — С. 211–214.
9. Сабирова Е.В., Гординская Н.А., Абрамова Н.В. Антибиотикорезистентность нозокомальных штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных в ожоговом центре в 2002 — 2008 гг. // Клинич. микробиология. и антимикробная химиотерапия. — 2010. — Т. 12, № 1. — С. 77–81.
10. Сибиряк С.В. Цитокины как регуляторы цитохром P450-зависимых монооксигеназ. Теоретические и прикладные аспекты // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 12–21.
11. Тузанкина И.А., Филимонкова Н.Н., Бердникова Э.Р. Применение полиоксидония в терапии вульгарного псориаза // Иммунология. — 2005. — № 4. — С. 239–243.
12. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. — 2000. — № 5. — С. 4–7.

13. Шичкин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии // Иммунология. — 1998. — № 2. — С. 9—13.
14. Cunnion K.M., Lee J.C., Frank M.M. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus* // Infect Immun. — 2001. — Vol. 69. — P. 6796—6803.
15. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* // Clinical Microbiology Reviews. — 2000. — Vol. 13, № 1. — P. 16—34.

Сведения об авторах

Серебренникова Светлана Николаевна – ассистент кафедры патологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ИГМУ (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел.: (3952) 24-07-65, сот. тел.: 89086476376; e-mail:)

Семинский Игорь Жанович – заведующий кафедрой патологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ИГМУ, доктор медицинских наук, профессор (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел.: (3952) 24-07-65; e-mail: igorsemin59@mail.ru)

Клименков Игорь Викторович – старший научный сотрудник отдела «Ультраструктуры клетки» ЛИИ СО РАН, кандидат биологических наук, доцент (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; тел.: (3952) 42-32-80; e-mail: iklimen@mail.ru)

Семенов Николай Владимирович – старший преподаватель кафедры нормальной физиологии ИГМУ, кандидат медицинских наук, доцент (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 3; тел.: (3952) 24-07-72)

М.М. Тарских, Л.Г. Климацкая, С.И. Колесников

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ АКРИЛАТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И У РАБОЧИХ АКРИЛОНИТРИЛЬНОГО ПРОИЗВОДСТВА

ФБГУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН» (Иркутск)

В эксперименте по интегральным критериям оценки изучалась нейротоксичность акрилатов — акрилонитрила и акриламида, причем показатели нейротоксичности акрилонитрила были более выраженными, чем аналогичные показатели акриламида. В условиях производства выявлено, что хроническая интоксикация акрилонитрилом вызывает развитие синдромов поражения нервной системы у людей. Установлена зависимость тяжести поражения от стажа профессионального контакта с ядом и содержания его в воздухе рабочей зоны, а также от содержания акрилонитрила, связанного с гемоглобином эритроцитов у данного контингента лиц.

Ключевые слова: акрилонитрил, акриламид, нейротоксичность, клинические неврологические синдромы

RESEARCH OF NEUROTOXICITY OF ACRYLATES IN EXPERIMENT AND IN WORKERS OF ACRYLONITRILE PRODUCTION

M.M. Tarskikh, L.G. Klimatskaya, S.I. Kolesnikov

Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction SB RAMS, Irkutsk

In the experiment on the integral evaluation criteria we studied neurotoxicity of acrylates — acrylonitrile and acrylamide; moreover the neurotoxicity indices of acrylonitrile were more expressed than those ones of acrylamide. Under production conditions it is revealed that the chronic intoxication by acrylonitrile causes the development of the syndromes of the defeat of nervous system in people. Is established the dependence of gravity of defeat on the period of professional contact with the poison and its content in air of working zone, and also on the content of acrylonitrile, connected with hemoglobin of erythrocytes in this birth cohort.

Key words: acrylonitrile, acrylamide, neurotoxicity, clinical neurologic syndromes

Акрилонитрил (АН) и акриламид (АА) широко используются в промышленности большинства развитых стран мира для синтеза полимеров, синтетических каучуков, для изготовления фотопластин, для очистки воды [1, 2]. Только в США в производственном контакте с акрилатами находятся несколько сотен тысяч человек [1, 2], а Россия вместе с США, Великобританией и Японией являются крупнейшими производителями акрилатов, их полимеров и сополимеров.

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение нейротоксичности АН и АА в эксперименте, а также возможных механизмов поражения нервной системы и клиники возникающих расстройств со стороны нервной системы у рабочих акрилонитрильного производства. Акрилаты известны как мембранотоксичные соединения, вызывающие тиолопривный и прооксидантный эффекты, в том числе в нервной ткани [5]. Однако в литературе отсутствуют данные, свидетельствующие о едином клинко-патогенетическом подходе к изучению механизмов повреждения нервной системы и клиники возникающих расстройств у лиц, профессионально подверженных воздействию АН, который, по нашим результатам, является наиболее нейротоксичным из акрилатов. Работа является продолжением Международной программы ВОЗ/ООН по химической безопасности [1, 2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение нейротоксичности АН и АА в сравнительном варианте проводилась по инте-

гральным критериям оценки нейротоксичности [8]. Так, осуществлялось скрининг-тестирование нейрогенных эффектов акрилатов по времени засыпания крыс (Тз) после введения им стандартного препарата гексенал (80 мг/кг), определяемого от начала введения препарата до принятия животными бокового положения [7]. Использовался также такой известный показатель нейротоксичности, как координационно-мышечная работоспособность (КМР), определяемая по времени удержания крыс на вращающемся с одинаковой скоростью стержне (100 об./мин), а также мышечная работоспособность, определяемая по времени плавания мышей при интоксикации акрилатами [8]. В этих опытах АА вводился в дозе 75 мг/кг (3/4 LD₅₀), а АН в дозе 20 мг/кг (~1/3 LD₅₀) внутрибрюшинно крысам и мышам в виде водных растворов. Контрольные животные получали эквивалентные растворы ксенобиотиков количества растворителя внутрибрюшинно. Всего было использовано 192 белые беспородные крысы самцы массой 150 — 200 г и 30 мышей самцов массой 18 — 20 г. Содержание АН в воздухе рабочей зоны крупнейшего в России Красноярского завода синтетического каучука определялось хроматографическим методом. Для этого у 24 человек основных профессий завода — слесарей и аппаратчиков, имевших жалобы со стороны нервной системы с помощью специальных воздухозаборников, содержащих 3 мл воды и прикрепленных к одежде вышеуказанных лиц, отбирались пробы воздуха на рабочем месте. Кроме того, у 18 человек данного контингента лиц, имевших контакт с АН от 1 до 10

лет, забирались образцы крови. В качестве контроля брались показатели крови 30 человек того же завода, не контактировавшие с АН. Способность АН связываться с макромолекулами оценивалась по методу В.В. Иванова и Л.Г. Климацкой путем определения АН в его аддуктах с гемоглобином [4] с использованием хроматографа Shimadzu 14А. Исследование неврологического статуса проводилось у 162 человек, имеющих различный по длительности профессиональный контакт с АН. Полученные в эксперименте результаты обрабатывались статистически с помощью вычисления средней арифметической (M) и стандартной ошибки средней арифметической (m). Достоверность различий сравниваемых параметров рассчитывали с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Математический расчет выполнялся с помощью статистической программы «Microsoft Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты экспериментальных исследований, острое отравление акрилатами вызывало развитие нейротоксических эффектов, выражавшихся в укорочении времени засыпания крыс (Тз) после введения гексенала по сравнению с контрольными животными на протяжении всего времени эксперимента (табл. 1). Аналогичная картина имела место при исследовании координационно-мышечной работоспособности (КМР), причем на ранних этапах опыта показатели КМР у крыс, отравленных АН были достоверно ниже по сравнению с животными, получавшими АА. На более поздних этапах острой затравки было достоверно укорочено время засыпания (Тз) у крыс, отравленных АН по сравнению с животными, получавшими АА (табл. 1). Далее опыты продемонстрировали укорочение времени плавания опытных животных по сравнению с контрольными (табл. 2), причем время плавания мышей, которые получали АН было достоверно меньше времени плавания животных, отравленных АА (табл. 2). Все эти данные свидетельствует о более выраженной нейротоксичности АН. Эти результаты послужили

логической основой для проведения клинического обследования лиц, профессионально подверженных воздействию этого промышленного яда, нацеленных на более глубокое понимание механизмов его повреждающего действия, а также на изучение характера поражений нервной системы, возникающих под его воздействием. Результаты проведенных клинических исследований представлены в таблице 3, где видно, что наибольшее количество астено-невротических расстройств падает на стаж работы 7–8 и более лет, а более тяжелые психоорганические нарушения, связанные с развитием органической церебральной дефицитарности и выраженных когнитивных нарушений возникают в результате более длительного контакта с мономером. При анализе полученных результатов, приведенных в таблице 1, обращает на себя внимание отсутствие здоровых лиц среди тех, кто работает в контакте с ядом при его концентрации в воздухе рабочей зоны равной 9 мг/м³. Лица, не имеющие отклонений в нервно-психической сфере, составляют 8 % от общего количества обследованных лиц данной группы (табл. 3) и выявлялись только при концентрации яда, не превышающей 4 мг/м³. Из таблицы 3 также видно, что чуть более половины лиц, составляющих группу, где определялась внутренняя доза АН, не имела аддуктов АН с гемоглобином и в ней преобладали здоровые люди. Другая же часть включала в себя лиц с поражением нервной системы различной степени тяжести, причем их больше было среди тех, кто имел большую концентрацию АН, связанного с гемоглобином эритроцитов – до 30 ммоль/моль. Следует отметить, что в крови здоровых людей, отнесенных к контрольной группе, аддуктов АН с гемоглобином не определялось. Психоорганические нарушения включали в себя как астенические проявления, так и аффективные нарушения в виде склонности к депрессии. Кроме того, у этих лиц наблюдались вегетативно-сосудистые кризы, оптико-вестибулярные расстройства. В неврологическом статусе обращали на себя внимание симптомы орального автоматизма, анизорефлексия на руках и ногах. Подобные нарушения на поздней стадии развития

Таблица 1
Влияние острого отравления крыс акриламидом (АА) и акрилонитрилом (АН) на развитие нейротоксических эффектов у крыс

Серия эксперимента	Исследуемый показатель	Время от начала введения акрилатов, час			
		1	3	12	24
Контроль	КМР (мин)	20,0 ± 2,0	20,0 ± 2,0	13,0 ± 1,5	14,0 ± 2,0
АА		18,0 ± 2,0	9,0 ± 1,0***	7,0 ± 2,0**	8,0 ± 1,0***
АН		6,0 ± 1,5*** ###	5,0 ± 1,0*** #	7,0 ± 2,0***	5,0 ± 1,5***
Контроль	Тз (мин)	4,0 ± 0,3	3,5 ± 0,4	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,3
АА		1,5 ± 0,3*	1,5 ± 0,2*	3,0 ± 0,3*	3,0 ± 0,2**
АН		1,0 ± 0,3***	1,2 ± 0,2*	1,8 ± 0,1*** ##	2,3 ± 0,2*** #

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – здесь и в таблице 2 достоверность различий по сравнению с контролем. # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – здесь и в таблице 2 достоверность различий АН по сравнению с АА.

интоксикационной патологии описаны вследствие воздействия различных вредностей химической природы [6].

Таблица 2
Влияние острого отравления мышей акриламидом (АА) и акрилонитрилом (АН) на время плавания мышей

Серия эксперимента	Время плавания мышей, (мин)
Контроль	110 ± 3,5
АА	70 ± 3,5***
АН	50 ± 5,0*** ##

Примечание: время плавания мышей определялось через 1 час после введения акрилатов.

Таблица 3
Степень выраженности поражений нервной системы у рабочих Красноярского завода синтетического каучука в зависимости от стажа работы, содержания АН в воздухе рабочей зоны и внутренней поглощенной дозы

	А	Б	В
Стаж работы:			
менее 1 года	3	–	–
1–2 года	7	6	–
3–4 года	9	9	1
5–6 лет	10	14	2
7–8 лет	7	15	4
9–10 лет	11	13	5
более 10 лет	10	20	16
Содержание АН в воздухе рабочей зоны:			
до 4 мг/м ³	2	14	–
до 9 мг/м ³	–	6	2
Содержание АН связанного с гемоглобином ммоль/моль гемоглобина:			
- 0	8	2	–
- до 12 ммоль/моль	1	2	1
- до 33 ммоль/моль	–	2	2

Примечание: А – количество здоровых лиц; Б – количество лиц с функциональными отклонениями (астеническими, астено-вегетативными, неврозоподобными); В – лица с психоорганическими нарушениями.

ПДК АН в воздухе рабочей зоны – 0,5 мг/м³ [1]. Соотношение между максимальной разовой и среднесменной предельно допустимыми концентрациями АН составляет 1,5 мг/м³:0,5 мг/м³ [3].

Сведения об авторах

Тарских Михаил Михайлович – (660017, г. Красноярск, ул. Горького, 18-78; дом. тел.: 8 (3912) 211-06-23; e-mail: mtarskih@mail.ru)

ВЫВОДЫ

1. В эксперименте по интегральным критериям была оценена нейротоксичность акрилатов – АН и АА, причем показатели нейротоксичности АН были достоверно более высокими по сравнению с показателями АА.

2. АН вызывает развитие клинически выраженных синдромов поражения нервной системы у профессионально подверженных его воздействию людей вследствие высокого содержания яда в воздухе рабочей зоны, причем степень тяжести поражения нервной системы зависела от стажа профессионального контакта с ядом, а также от содержания акрилонитрила, связанного с гемоглобином эритроцитов.

3. Одним из вероятных механизмов нейротоксичности акрилонитрила является образование связей исходной молекулы яда и его метаболитов с биомакромолекулами, в том числе и в клетках нервной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акриламид. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. – Женева, 1987.
2. Акрилонитрил. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. – Женева, 1987.
3. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. Государственные санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Раздел «Химические факторы производственной среды. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Гигиенические нормативы. ГН 2.2.5.1313-03. – Департамент Госсанэпиднадзора Минздрава РФ. – М., 2003.
4. Иванов В.В., Климацкая Л.Г. Биомониторинг в предупреждении экологических болезней. – Красноярск, 1996. – С. 43–44.
5. Иванов В.В., Котловский Ю.В., Климацкая Л.Г. и др. Молекулярно-клеточные механизмы токсичности ксенобиотиков, профессионально обусловленных и экологических заболеваний. – Новосибирск, 2004.
6. Измеров Н.Ф. Руководство по профессиональным заболеваниям. – М.: Медицина, 1983. – Т. 1.
7. Кукес В.Г. Клиническая фармакология. 2-е издание. – М.: ГЭОТАР-Медицина, 1999. – С. 250–251, С. 291–294.
8. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Программа ООН по окружающей среде. – М., 1986. – С. 142–150.

А.С. Трулев, И.В. Кудрявцев, П.Г. Назаров

ФАКТОРЫ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ КАК МОДУЛЯТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК И ФИБРОБЛАСТОВ*НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН (Санкт-Петербург)*

Исследовали влияние факторов острой фазы воспаления (очищенных анафилатоксинов C3a и C5a, пентраксина C-реактивного белка (СРБ) и агрегированного IgG (aIgG) — как аналога циркулирующих иммунных комплексов) на адгезивные взаимодействия тучных клеток (ТК) человека с фибробластами (ФБ). Использовали ТК линии НМС-1 и первичную линию ФБ крайней плоти человека. ТК или ФБ обрабатывали каждым из исследуемых белков воспаления в течение 24 ч, после чего исследовали изменение их адгезивных свойств. Адгезию клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Результаты показали, что адгезивность ТК повышали все исследованные белки, тогда как адгезивность ФБ — только анафилатоксины. Стимуляция адгезивных свойств ТК была связана с повышением экспрессии молекул CD11b и ICAM-1.

Ключевые слова: анафилатоксины, C-реактивный белок, тучные клетки, фибробласты

FACTORS OF THE ACUTE PHASE OF INFLAMMATION AS MODULATORS OF THE INTERACTION OF MAST CELLS AND FIBROBLASTS

S.A. Trulioff, I.V. Kudryavtsev, P.G. Nazarov

Institute of Experimental Medicine, North-West Branch RAMS, St. Petersburg

We investigated the influence of factors of the acute phase of inflammation (purified anaphylatoxins C3a and C5a, pentraxin C-reactive protein (CRP), and aggregated IgG (aIgG) — as an analogue of circulating immune complexes) on the adhesive interaction of human mast cells (MC) with human fibroblasts (FB). HMC-1 MC line and primary human foreskin FB were used. MC or FB were treated with each of the studied inflammatory proteins within 24 h and then the changes in their adhesive properties were examined. Cell adhesion was assessed by flow cytometry. The results showed that all studied proteins increased MC adhesiveness, whereas FB adhesiveness was increased only by anaphylatoxins. Stimulation of the adhesive properties of the MC was associated with increased expression of CD11b and ICAM-1 molecules.

Key words: anaphylatoxins, C-reactive protein, mast cells, fibroblasts

Тучные клетки, как правило, располагаются в соединительной ткани субэпителиального пространства в коже, легких, по ходу желудочно-кишечного тракта. Они являются мультифункциональными клетками иммунной системы и играют важную роль в воспалительных и аллергических реакциях. Тучные клетки по ряду признаков близки к базофилам крови, например, они экспрессируют на своей поверхности высокоаффинный рецептор к IgE и содержат в гранулах вазоактивные вещества. Но, в отличие от базофилов и остальных клеток кровяного происхождения, они являются резидентами соединительной ткани и обычно не обнаруживаются в кровяном русле.

Тучные клетки играют важные роли в защите организма. В ответ на различные стимулы запускается процесс дегрануляции тучных клеток, что способствует запуску процессов воспаления. Стимулы для дегрануляции, кроме широко известного перекрестного связывания IgE на поверхности клеток, могут быть различны. Ими могут быть продукты системы комплемента, различные нейропептиды, антитела класса IgG, связывание TLR со своими лигандами. Тучные клетки способны синтезировать различные цитокины (TNF, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-8 и IL-13), липидные медиаторы, которые активируют лимфоциты и макрофаги, а также гистамин, влияющий на клетки эндотелия, увеличивающий его

адгезивность для клеток крови и способствующий повышению проницаемости сосудов.

Известно, что при многих видах хронического воспаления, а также при некоторых хронических аллергических состояниях происходит фиброзирование ткани, то есть разрастание соединительной ткани, порой даже с замещением изначальной ткани органа на соединительную. Тучные клетки всегда присутствуют в такого рода повреждениях в повышенном количестве, что приводит к мысли об их участии в патогенезе фиброза. Действительно, тучные клетки при воспалении повышают количество контактов с фибробластами, а секретируемые клетками медиаторы влияют на их активность. Например, при совместном культивировании тучных клеток и фибробластов наблюдается повышение пролиферативной активности последних и усиление синтеза фибробластами коллагена, гиалуронана. Последний, в частности, участвует в формировании отека, так как, являясь гидрофильной молекулой, обеспечивает приток воды в матрикс, с последующим увеличением объема ткани. Также тучные клетки активируют экспрессию рецепторов гистамина, серотонина, TNF на поверхности фибробластов и стимулируют выброс хемокинов.

Кроме того, адгезия тучных клеток к матриксу соединительной ткани является костимуляторным сигналом для экспрессии генов цитокинов в самих

тучных клетках, а, значит, и для дальнейшего развёртывания воспаления.

В настоящее время практически отсутствуют данные о взаимодействии тучных клеток с фибробластами на начальных этапах воспаления, в частности о роли белков острой фазы в регуляции контактов между этими клетками.

Целью работы было исследование влияния основных факторов острой фазы воспаления (анафилатоксинов C3a и C5a, пентраксина C-реактивного белка и агрегированного IgG — аналога циркулирующих иммунных комплексов) на адгезивные взаимодействия тучных клеток человека линии НМС-1 с фибробластами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры

Тучные клетки линии НМС-1 были любезно предоставлены Dr. Butterfield (Mayo Clinic, USA). Клетки культивировали в среде Iscove (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), «Биолот», Россия) с добавлением 10 % обогащенной железом фетальной телячьей сыворотки («Hyclone», США), 1,2 мМ монотиглицерола («Sigma», США) и 40 мкг/мл гентамицина («Биолот», Санкт-Петербург). Клетки пересеивали каждые 3–4 дня. Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂.

В работе использовали первичную линию фибробластов человека, любезно предоставленную коллективом ООО «Покровский банк стволовых клеток» (Санкт-Петербург, Россия). Для культивирования клеток использовали среду DMEM (Sigma — Aldrich) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», Санкт-Петербург), 40 мкг/мл гентамицина и 2 мМ L-глутамина («Биолот», Санкт-Петербург). Для дезинтеграции монослоя клетки дважды промывали раствором версена, затем инкубировали в смеси трипсина-версена (1 : 1, «Биолот», Санкт-Петербург) в течение нескольких минут, посев осуществляли 1 раз в 3 дня.

Исследование токсического эффекта исследуемых препаратов на клетки НМС-1

Для исследования потенциального влияния различных доз исследуемых препаратов, применяемых в экспериментах, на жизнеспособность клеток линии НМС-1 применяли методы ДНК-цитометрии. Для этого были проведены серии экспериментов *in vitro*, целью которых было выявление токсичных эффектов C3a в финальных концентрациях 1, 10 и 100 нМ, C5a в финальных концентрациях 1, 10 и 100 нМ а также C-реактивного белка человека (СРБ) и термоагрегированного IgG человека (aIgG) в концентрациях 10 и 50 мкг/мл. Для выявления клеток, несущих гиподиплоидный набор ДНК, использовали метод окраски клеток йодистым пропидием.

При определении уровня апоптоза в лунки 96-луночного плоскостонного планшета («Sarstedt», Германия) вносили 200 мкл клеточной суспензии (1 × 10⁶ клеток в мл) в соответствующей полной культуральной среде, после чего добавляли 22 мкл стимулятора, в качестве негативного контроля ис-

пользовали бычий сывороточный альбумин (БСА) в финальной концентрации 100 нг/мл. Каждую пробу ставили не менее чем в трех параллелях. Инкубировали в течение 24 ч при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO₂. По завершении инкубации клетки переносили в пробирки типа «Эппендорф», объемом 1,5 мл («Sarstedt», Германия) и однократно отмывали избытком забуференного фосфатами физиологического раствора NaCl (ЗФР) (7 мин при 300 g). Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл ЗФР и добавляли 900 мкл 70 ° этанола, охлажденного до –20 °C. До проведения цитометрического анализа образцы хранили при –20 °C. Непосредственно перед анализом клетки осаждали центрифугированием (7 минут при 300 g) и переводили в 400 мкл ЗФР. После чего в образцы вносили по 4 мкл раствора йодистого пропидия (1 мг йодистого пропидия в 1 мл дистиллированной воды) и проводили окраску в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре. По завершении инкубации проводили цитометрический учет на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter Inc., США). Для каждого из образцов анализировали не менее 10000 событий.

Оценка интенсивности адгезии тучных клеток линии НМС-1 к монослою фибробластов человека

Оценку адгезионной активности клеток производили при помощи методов проточной цитометрии. В лунки 96-луночного планшета сеяли по 10 тыс. фибробластов и инкубировали до формирования конфлюэнтного монослоя. Затем удаляли среду, промывали лунки ЗФР и, если изучали изменение адгезивных свойств фибробластов под действием стимуляторов, вносили индукторы, разведенные в среде без ЭТС, с 1% БСА, после чего добавляли клетки линии НМС-1, предварительно окрашенные флуоресцентным витальным красителем суццинилимидным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE, «Fluka», США) в концентрации 10^{–6} М. Окраску клеток производили следующим образом: клетки собирали, отмывали раствором Хэнкса («Биолот», Санкт-Петербург), затем инкубировали в течение 10 минут (37 °C, в темноте) в растворе CFSE на ЗФР, после чего трижды отмывали центрифугированием холодным раствором Хэнкса. Если изучали влияние белков острой фазы на адгезивные свойства тучных клеток, то клетки стимулировали сутки, после чего отмывали и метили CFSE. Совместная инкубация продолжалась 30 мин, после чего лунки отмывали от неприкрепившихся клеток и производили учет реакции. Для этого после отмывки не адгезировавших клеток лунки промывали раствором версена, затем инкубировали с раствором трипсина в течение 10–15 мин. Затем клетки тщательно ресуспендировали и содержимое лунок в объеме 100 мкл переносили в микропробирки для анализа, после чего проводили учет интенсивности флуоресценции на проточном цитофлуориметре Navios («Beckman Coulter Inc.», США). Степень адгезии определяли по соотношению количества окрашенных CFSE клеток линии НМС-1 и не

окрашенных клеток линии фибробластов, считая количество последних одинаковым во всех лунках.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с помощью лицензионной программы Microsoft Excel. Результаты цитометрического учета анализировали при помощи пакетов программ Kaluza («Beckman Coulter Inc.», США). Для статистической обработки и определения различий между независимыми группами нормально распределенных данных использовали парный t-критерий Стьюдента. Во всех экспериментах различие между контролем и опытом считали статистически достоверным при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование токсического эффекта различных исследуемых препаратов на клетки НМС-1. Для этого были проведены серии экспериментов *in vitro*, целью которых было выявление токсичных эффектов С3а в финальных концентрациях 1, 10 и 100 нМ, С5а в финальных концентрациях 1, 10 и 100 нМ а также СРБ и аIgG в концентрациях 10 и 50 мкг/мл. В качестве контроля использовали БСА в финальной концентрации 100 нг/мл. Полученные данные указывают на то, что 24-часовая инкубация клеток в присутствии анафилатоксинов С3а и С5а не вызывает усиления апоптоза. Таким образом, эффекты исследуемых препаратов, полученные в остальных экспериментах, не являются следствием гибели клеток посредством апоптоза и/или некроза.

Стимуляция фибробластов анафилатоксинами С3а в концентрации 100 нМ и С5а в концентрации 10 нМ приводила к увеличению адгезии к ним интактных тучных клеток. Так, если в лунках с контрольными фибробластами было только 28 % CFSE-позитивных тучных клеток, то в стимулированных их количество увеличивалось до 52 % (С3а) или до 54 % (С5а).

Кроме того, С3а и С5а оказывали стимулирующее действие и на тучные клетки. С5а в концентрации 100 нМ вызывал достоверное усиление адгезии тучных клеток к фибробластам. С3а в концентрации 1 нМ также увеличивал число прикрепившихся тучных клеток.

Клетки линии НМС-1 реагировали на активацию С3а увеличением экспрессии CD11b, а на стимуляцию С5а помимо CD11b увеличивалась экспрессия и CD54 ($11,10 \pm 0,05$ до $19,32 \pm 1,06$, $p < 0,05$).

Наши опыты показали, что стимуляция тучных клеток СРБ и аIgG в концентрациях 10 и 50 мкг/мл приводит к достоверному и дозозависимому увеличению интенсивности адгезии тучных клеток к монослою интактных фибробластов. Стимуляция фибробластов СРБ в концентрации 30 мкг/мл также приводила к усилению их адгезивных свойств: количество CFSE-позитивных тучных клеток возрастало до 50 %. Однако исследование фибробластов методом проточной цитометрии показало отсутствие на них Fcγ-рецепторов для

иммуноглобулинов класса IgG, тогда как именно Fcγ-рецепторы являются рецепторами для СРБ. В связи с этим мы предположили, что СРБ может связываться с компонентами внеклеточного матрикса при помощи сайтов связывания с ламинином и фибронектином, расположенными на одной стороне молекулы СРБ. А наличие на другой стороне молекулы пентраксина сайтов связывания с клеточными Fcγ-рецепторами приводило к заякориванию тучных клеток.

Чтобы проверить данное предположение мы стимулировали фибробласты СРБ (50 мкг/мл) или TNF (10 нг/мл). Затем, пометив тучные клетки CFSE, разделили их на 2 части: контрольную и клетки с заблокированными добавлением IgG Fcγ-рецепторами на поверхности. После чего провели 30-минутную совместную инкубацию двух видов тучных клеток с фибробластами и произвели учет реакции. Адгезия интактных тучных клеток к стимулированным фибробластам была выше чем к контрольным, как в случае стимуляции фибробластов СРБ, так и TNF. Тучные клетки с заблокированными Fcγ-рецепторами одинаково прикреплялись в лунках с контрольными и прединкубированными с СРБ фибробластами, тогда как адгезия таких тучных клеток к фибробластам, активированным TNF, сохранялась повышенной. Таким образом, было подтверждено предположение, что СРБ не активирует фибробласты, а является якорем для тучных клеток в матриксе соединительной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как результаты собственных исследований, так и анализ данных литературы, свидетельствуют о способности исследованных нами клеток отвечать на воздействие С3а и С5а компонентов каскада комплемента, а также на СРБ и на аIgG. Что касается клеток линии НМС-1, то для данных клеток был показан факт прямого взаимодействия С3а и С5а с поверхностью клеток [9, 10]. Взаимодействие данных лигандов со специфическими рецепторами сопровождалось повышением концентрации внутриклеточного кальция, что однозначно указывало на активацию НМС-1, причем эффект достигался уже спустя 20-30 секунд после внесения стимуляторов в культуральную среду. На клетках НМС-1 присутствуют также рецепторы к иммуноглобулину класса IgG — CD64 (высокоаффинный Fcγ-рецептор I) и CD32 (Fcγ-рецептор II), которые являются рецепторами и для СРБ.

Следующим этапом проведенного нами исследования было изучение влияния различных доз исследуемых препаратов на проапоптотическую активность клеток изучаемых линий. В литературе находится множество подтверждений токсического эффекта данных медиаторов воспаления на различные типы клеток. Так, было показано, что инкубация клеток в присутствии С5а в концентрациях свыше 1 мкМ сопровождается массовой гибелью клеток, например, тимоцитов крысы [6] или клеток нейробластомы [5]. Наши собственные

исследования показали, что применяемые нами финальные концентрации C3a (1, 10 и 100 нМ), C5a (1, 10 и 100 нМ), СРБ и aIgG (10 и 50 мкг/мл) не оказывали существенного влияния на гибель тучных клеток. Для клеток линии НМС-1 применяемые дозы стимуляторов не приводили к достоверному повышению числа клеток, несущих гиподиплоидный набор ДНК. Таким образом, эффекты, наблюдаемые в остальных тестах *in vitro*, являлись результатом прямого действия стимуляторов на клетки, а не артефактами, связанными с гибелью исследуемых клеток. Вместе с тем, в литературе имеются упоминания о роли C3a, C5a и СРБ в регуляции продвижения клеток по клеточному циклу. Так, было показано, что низкие дозы (1 и 10 нМ) C5a, но не C3a, способны вызывать пролиферацию эндотелиальных клеток НМЕС-1. Для СРБ описаны эффекты промитотической активности для лимфоцитов [2]. Однако в ходе приведенных экспериментов данный эффект компонентов каскада комплемента не исследовался.

При исследовании изменения экспрессии поверхностных антигенов клетками линии НМС-1 была показана активирующая роль в отношении увеличения числа CD11b и для C3a и для C5a. Но только C5a приводил к усилению экспрессии CD54 в этом случае.

По-видимому, увеличение уровня экспрессии адгезионных молекул на поверхности клеток в очаге воспаления является одним из универсальных свойств анафилатоксинов, так как именно этот феномен лежит в основе механизма привлечения циркулирующих клеток для эффективного развития иммунного ответа. При этом C3a и C5a одинаково эффективно воздействуют как на лейкоциты крови, так и на клетки эндотелия различной локализации [7].

При исследовании адгезии клеток к интактному монослою фибробластов препараты C3a и C5a в концентрациях 100 и 10 нМ, соответственно, достоверно усиливали адгезию НМС-1 к монослою интактных фибробластов, повышая относительное содержание тучных клеток в образцах до $52,3 \pm 3,6$ и $54,3 \pm 4,2$ %, соответственно. Тучные клетки соединительной ткани в ответ на стимуляцию анафилатоксинами повышают уровень синтеза и экскреции хемокина RANTES/CCL5, что является мощным стимулом для привлечения моноцитов, Т-лимфоцитов и базофилов в очаг развития реакции, тем самым, приводя к развитию специфического иммунного ответа в тканях [8].

Как показали наши опыты, СРБ и aIgG в концентрациях 10 и 50 мкг/мл оказывали стимулирующее действие на адгезивные свойства тучных клеток. Из литературных данных видно, что для С-реактивного белка характерно проявление провоспалительной активности [1], в частности

известно, что он усиливает моноцитарно-эндотелиальную адгезию. Увеличивает уровень экспрессии молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1 на эндотелиальных клетках [4]. Однако известно также, что СРБ снижает количество рецепторов к фибронектину на нейтрофилах. Как нами было показано ранее, aIgG, являясь аналогом иммунных комплексов в эксперименте, также стимулирует активацию эндотелия и усиление адгезии к нему моноцитов линии ТНР-1. Кроме того, показано, что агрегация Fcγ-рецепторов на поверхности мышинных тучных клеток приводит к усилению их адгезии к фибронектину [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы воспаления. — СПб.: Наука, 2001. — 423 с.
2. Назаров П.Г., Софронов Б.Н. С-реактивный белок в системе иммунорегуляции // Иммунология. — 1986. — № 4. — С. 12—18.
3. Dasty J., Hardison M.C., Metcalfe D.D. Aggregation of low affinity IgG receptors induces mast cell adherence to fibronectin // J. Immunol. — 1997. — Vol. 158, N 4. — P. 1803—1809.
4. Devaraj S., Davis B., Simon S.I., Jialal I. CRP promotes monocyte-endothelial cell adhesion via Fc-receptors in human aortic endothelial cells under static and shear flow conditions // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2006. — Vol. 291, N 3. — P. H1170—H1176.
5. Farkas I., Baranyi L., Liposits Z.S. Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells // Neuroscience. — 1998. — Vol. 86, N 3. — P. 903—911.
6. Guo R.F., Huber-Lang M., Wang X. Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis // J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 106, N 10. — P. 1271—1280.
7. Skeie J.M., Fingert J.H., Russell S.R. Complement component C5a activates ICAM-1 expression on human choroidal endothelial cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2010. — Vol. 51, N 10. — P. 5336—5342.
8. Venkatesha R.T., Berla Thangam E., Zaidi A.K., Ali H. Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase // Mol. Immunol. — 2005. — Vol. 42, N 5. — P. 581—587.
9. Werfel T., Oppermann M., Butterfield J.H. et al. The human mast cell line HMC-1 expresses C5a receptors and responds to C5a but not to C5a(desArg) // Scand. J. Immunol. — 1996. — Vol. 44, N 1. — P. 30—36.
10. Zwirner J., Götze O., Sieber A. The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg) // Scand. J. Immunol. — 1998. — Vol. 47, N 1. — P. 19—24.

Сведения об авторах

Трулев Андрей Сергеевич — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12; тел.: +7-952-388-84-43; e-mail: trulioff@gmail.com)
Кудрявцев Игорь Владимирович — старший научный сотрудник ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН, кандидат биологических наук
Назаров Петр Григорьевич — ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН руководитель лаборатории, доктор медицинских наук

Е.П. Турмова ¹, А.А. Григорюк ¹, Е.А. Бычков ¹, Е.В. Маркелова ¹, И.В. Чикаловец ²ИЗУЧЕНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРА «ГАЛАВИТ»
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕГосударственный медицинский университет (Владивосток)
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (Владивосток)

Изучение цитокинов и липидного спектра сыворотки крови проводилось у 20 крыс линии Вистар при гиперлипидемии и артериальной гипертензии в течение 6 месяцев. Определение цитокинов IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10 в сыворотке крови производили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов: Rat «R&D Diagnostics Inc.», USA. Содержание общего холестерина; триглицеридов; холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) исследовали с помощью стандартного колориметрического метода с использованием реагентов: «Ольвекс диагностикум» (Россия). Было выявлено увеличение уровней IL-1, IFN- γ , повышение содержания общего холестерина, липопротеинов высокой и низкой плотности, коэффициента атерогенности в крови животных. При назначении иммуномодулятора Галавит в модели атеросклероза, зарегистрировано снижение содержания IL-1, IFN- γ и нормализация липидного спектра крови.

Ключевые слова: атеросклероз, гиперлипидемия, цитокины, крысы

STUDYING OF APPLICATION IMMUNOMODULATOR «GALAVIT»
AT EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSISE.P. Turmova ¹, A.A. Grigoryuk ¹, E.A. Bichkov ¹, E.V. Markelova ¹, I.V. Chihkalovets ²¹ Vladivostok State Medical University, Vladivostok² Pacific institute of bioorganic chemistry. Far Eastern Branch RAS, Vladivostok

The changes of the cytokines and lipidic spectrum at experimental hyperlipidemia and arterial hypertension was made at 20 rats «Vistar» during 6 months. As the material of research was the blood serum. The cytokines was made by the method solid-phase not competitive immune-enzyme analysis with the use of sets: Rat «R&D Diagnostics Inc.», USA. The content of the general cholesterol; triglycerides; LDL; HDL was investigated by the method of standard colorimetric analysis with the use of reagents «Olveks diagnosticum» (Russia). The increasing of the general cholesterol, LDL; HDL, atherogenic coefficient, IFN- γ and IL-1 β in blood of animals was revealed. At application of immunomodulator «Galavit» at experimental atherosclerosis the decreasing contains of IL-1, IFN- γ , the level of general cholesterol; LDL; HDL, atherogenic coefficient is fixed.

Key words: atherosclerosis, hyperlipidemia, cytokines, rats

Согласно современным представлениям о патогенезе атеросклероза большое значение отводится иммуноопосредованному воспалению в артериальной стенке [3, 9, 11]. Гипертензия и гиперхолестеринемия коррелируют с развитием атеросклеротического процесса. Являясь промоторными факторами, они усиливают пролиферацию гладкомышечных клеток, что стимулирует образованию атеросклеротических бляшек [1, 10]. Однако, нередко атеросклеротический процесс развивается у лиц с нормальным содержанием холестерина и даже при низких его концентрациях [6, 9]. Изменения реагирования эндотелия с клетками иммунной системы на уровне цитокинов является ранним проявлением атерогенеза. Цитокиновый дисбаланс влияет на образование, рост атеросклеротической бляшки и вносит свой вклад в ее дестабилизацию с дальнейшим тромбообразованием. При этом известно, что IL-6, IL-1 β и TNF- α — в физиологических концентрациях играют важную роль в регуляции иммунного ответа и тканевого гомеостаза, а в высоких концентрациях обладают многочисленными системными и локальными эффектами прогрессирования атеросклеротического процесса [9, 13]. Однако аспекты цитокиновой

регуляции атерогенеза остаются еще до конца не выясненными и, часто, противоречиво трактуются разными авторами [2, 3]. Подтверждена связь изменений уровней воспалительно-деструктивных биомаркеров нестабильности бляшек с разной степенью стеноза, распространенности и преимущественной локализацией атеросклеротических поражений [8]. Экспериментальная оценка воспалительного повреждения артериальной стенки, с позиций местного и системного цитокинового дисбаланса, влияющего на процессы миграции, активации и пролиферации Т-лимфоцитов, макрофагов и гладкомышечных клеток, позволит выявить и обосновать применение иммуотропных препаратов в регуляции иммунного воспаления при атеросклерозе.

Препарат «Галавит» (регистрационный номер: РN0000/03, химическая формула — 5-амино-1,2,3,4-тетрагидрофталин-1,4-диона натрия соль) обладает как иммуномодулирующими свойствами, так и противовоспалительными свойствами, вследствие модуляции синтеза противовоспалительных цитокинов гиперактивированными макрофагами. Галавит влияет на синтез иммуноглобулинов, повышая их уровень и функциональную активность

при хронических воспалительных заболеваниях, возникающих на фоне вторичной иммунной недостаточности. Галавит ранее широко применялся в экспериментах на крысах при разной патологии [8, 11]. Доказана иммуномодулирующая эффективность галавита при эссенциальной артериальной гипертензии [1].

Крысы часто используются в моделировании гиперлипидемии, как фактора риска атеросклероза [4, 10, 15]. Их приобретение и содержание относительно недорого, животные просты в обращении, хорошо размножаются в неволе. Из всех экспериментальных животных у них лучше всего изучен метаболизм [5]. Разработка адекватной экспериментальной модели повреждения эндотелия является необходимым шагом в целях диагностики, профилактики и лечения атеросклероза. Учитывая особенности обменных процессов крыс, способствующие формированию их резистентности к жировой нагрузке, нами применено сочетание экзогенной гиперлипидемии, угнетение обменных процессов и артериальной гипертензии для создания наиболее выраженного атеросклеротического повреждения. Методика предполагает значительное нарушение процессов обмена холестерина.

Целью работы явилось: изучить влияние препарата «Галавит» на цитокиновый профиль и липидный спектр сыворотки крови крыс в модели экспериментального атеросклероза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явились крысы линии Vistar — 30 голов, массой 350 г. Поставка крыс осуществлялась из вивария Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток. Опытная группа крыс — 20 голов, в течение 6 месяцев (180 суток), находились на диете с добавлением в корм холестерина, метилтиоурацила — 1 мг/кг и витамина Д в количестве 2,5 МЕ на кг массы тела крыс (моделирование гиперлипидемии (ГЛ) [4]. В целях создания артериальной гипертензии (АГ) — за 15 дней перед началом кормления животным была произведена операция: наложение лигатуры на почечную ножку правой почки нерассасывающимся шовным материалом и прошивание верхнего полюса левой почки (моделирование симптоматической реноваскулярной артериальной гипертензии), в модификации [14]. Животные опытной группы I — 10 крыс не получали иммуномодулирующей терапии. Опытная группа II — 10 крыс — перед выведением из эксперимента получали препарат «Галавит», в/м, в количестве — 1 мг на 1 кг веса животного, по схеме: 1 инъекция в день, в течение 10 дней, затем 1 инъекция в 3-е суток. Общий курс лечения составлял — 15 инъекций. Контролем служили 10 крыс, питающихся обычным кормом — группа III. Через 6 месяцев исследования животных каждой группы выводили из эксперимента под эфирным наркозом путем декапитации. Осуществляли забор сыворотки крови. Эксперимент проводился со строгим соблюдением требований Европейской конвенции

(Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. В постановке опытов руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными на заседании этической комиссии НИИ нормальной физиологии им П.К. Анохина РАМН (Протокол № 1, 3 сентября 2005 г.), требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Содержание общего холестерина; триглицеридов; холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) исследовали с помощью стандартного колориметрического метода с использованием реагентов: «Ольвекс диагностикум» (Россия). Вычисляли коэффициент атерогенности (КА): общий холестерин - ЛПВП/ЛПВП. Определение цитокинов IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10 в сыворотке крови производили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов: Rat «R&D Diagnostics Inc.», USA. Для математической обработки полученных данных использовали программу StatPlus 2009. Сравнение средних значений в выборках осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При экспериментальной ГЛ и АГ выявлено увеличение общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП и КА. Отмечена хорошая переносимость препарата Галавит у крыс II группы. Применение иммуномодулятора способствовало достоверному снижению уровней общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП и КА (табл. 1).

Выявлено увеличение уровня провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IFN- γ и противовоспалительного цитокина — IL-10 в сыворотке крови крыс с гиперлипидемией и артериальной гипертензией. Данными литературы подтверждено проатерогенное действие IL-1 β и IFN- γ (табл. 2). Эти цитокины индуцируют активацию макрофагов, способствуют формированию дефектов функции рецепторов к ЛПНП и стимулируют прогрессирование атеросклероза [10, 11]. Известно, также, что при добавлении к нагруженным холестерином (ХС) макрофагам IFN- γ способен существенно влиять на соотношение ХС и эфиров холестерина, в сторону накопления последних, тормозить захват и удаление ХС из клеток с помощью ЛПВП, что приводит к трансформации макрофагов в пенистые клетки [13]. Увеличение значений IL-10 в опытной группе крыс, вероятно, объясняет компенсаторное противовоспалительное действие цитокина в условиях повышенной жировой нагрузки и циркуляторной гипоксии при артериальной гипертензии. Было выявлено, что IL-10 вызывает, по принципу отрицательной обратной связи, вызывает замедление продукции провоспалительных цитокинов, регулирует экспрессию ICAM-1 и VCAM-1 в IL-1 — активированных эндотелиальных клетках, снижает

Таблица 1

Состояние липидного спектра крыс

Группы крыс	Опытная группа I	Опытная группа II (Галавит)	Группа III (Здоровые крысы)
Холестерин, ммоль/л	6,1 (5,5–7,2) $p_1-p_3 < 0,05$	1,8 (1,7–2,2) $p_1-p_2 < 0,05$	2,2 (1,9–3,1)
Триглицериды, ммоль/л	0,7 (0,5–0,85)	0,65 (0,6–0,8)	0,46 (0,4–0,7)
ЛПВП, ммоль/л	1,5 (1,42–1,9)	1,0 (0,9–1,1) $p_1-p_2 < 0,05$	1,1 (1,0–1,5)
ЛПНП, ммоль/л	4,2 (3,8–5,4) $p_1-p_3 < 0,05$	0,5 (0,5–0,8) $p_1-p_2 < 0,05$	0,9 (0,7–1,4)
КА	3,1 (2,7–4,4) $p_1-p_3 < 0,05$	1,1 (0,9–1,8) $p_1-p_2 < 0,05$	1,0 (0,9–1,2)

Примечание: данные представленные в виде Median (LQ–UQ). p_1-p_2 – достоверность различий между I и II опытными группами, p_1-p_3 – достоверность различий между группой I и III, p_2-p_3 – достоверность различий между группой II и III.

Таблица 2

Уровень цитокинов в сыворотке крови крыс

Цитокины (пг/мл)	Опытная группа I	Опытная группа II (Галавит)	Группа III (Здоровые крысы)
IL-1 β	4,1 (4,1–4,02) $p_1-p_3 < 0,05$	0,01 (0,01–1,83)	0,01 (0,01–0,01)
IFN- γ	16,3 (13,91–23,88) $p_1-p_3 < 0,05$	4,41 (3,17–5,62) $p_1-p_2 < 0,05$	1,93 (1,87–3,30)
TNF- α	0,30 (0,01–0,29)	0,29 (0,28–0,30)	0,27 (0,01–0,27)
IL-10	8,68 (2,37–26,42) $p_1-p_3 < 0,05$	5,62 (5,62–21,61) $p_2-p_3 < 0,05$	2,14 (2,01–2,16)

Примечание: данные представленные в виде Median (LQ–UQ). p_1-p_2 – достоверность различий между I и II опытными группами, p_1-p_3 – достоверность различий между группой I и III, p_2-p_3 – достоверность различий между группой II и III.

выработку IL-8 и IL-6, ингибирует TNF – индуцированную или индуцированную фактором 2 роста фибробластов, пролиферацию гладкомышечных клеток аорты человека [13]. Доказано, что IL-10 приводит к значительному уменьшению активации NF-kB в эндотелии и экспрессии ICAM-1 и VCAM-1 после 10 дней богатой холестерином диеты [13]. Другие источники подтверждают, что IL-10 подавляет активность макрофагов, стимуляцию эндотелия модифицированными липопротеинами и высвобождение металлопротеиназ из макрофагов (ответственных за нестабильность бляшки). Он также стимулирует синтез тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 моноцитами [6]. Зафиксировано снижение уровней IL-1 β и IFN- γ при применении галавита, что подтверждает данные литературы (табл. 2) [1, 12]. При воспалительных заболеваниях Галавит обратимо, на 6–8 ч, ингибирует избыточный синтез фактора некроза опухолей, ИЛ-1 и других провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода гиперактивированными макрофагами. Нормализация функционального состояния макрофагов приводит к восстановлению их антиген-представляющей и регулирующей функции, снижению уровня аутоагрессии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что Галавит снижает степень выраженности воспалительного процесса при экспериментальном атеросклерозе и обладает способностью нормализовать показатели липидного обмена. Установленные противовоспалительные свойства Галавита вероятно обусловле-

ны ослаблением транскрипционной активности генов c-Fos или c-Jun3, что способствует ослаблению выработки макрофагами противовоспалительных цитокинов. Гиполипидемические свойства препарата могут быть обусловлены блокированием сквенджер-рецепторов, уменьшением экспрессии генов PPAR γ , а также генов белка FP-2-ацетилКоА-карбоксилазы, индуцированием экспрессии липопротеинлипазы, что стимулирует связывание жирных кислот, подавление дифференцировки адипоцитов и уменьшение накопления эндогенного жира [7]. Сочетание противовоспалительных и гиполипидемических свойств Галавита делают его включение в комплексную терапию атеросклероза патогенетически обоснованным. Необходимы дальнейшие исследования по изучению патогенетических свойств Галавита, разработке адекватных схем и режима его назначения для коррекции иммунных механизмов воспалительного процесса при атеросклерозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипова С.Н., Литвицкий П.Ф., Стрижова Н.В., Ананченко В.Г. Влияние препарата с иммуномодулирующим действием «Галавит» на содержание в крови субпопуляций Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и естественных киллеров у пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией // Человек и его здоровье. – 2010. – № 4. – С. 26–30.
2. Баранов А., Обухов А, Шаркова Н., Бузин А. Аторвастатин в лечении облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей // Врач. – 2007. – № 9. – С. 66–69.

3. Буркова Н.В., Эйнсмонт Ю.А., Нохрин С.П., Яковлев С.В. и др. Реакция цитокиновой сети больных с критической ишемией нижних конечностей на некоторые виды лечебного воздействия // Мед. иммунология. — 2006. — Т. 8, № 2—3. — С. 394—395.

4. Кропотов А.В. Влияние цимифуги даурской и калужницы лесной на некоторые показатели обмена липидов и половую систему (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Владивосток, 1975. — 19 с.

5. Куликов В.А., Чиркин А.А. Особенности метаболизма липопротеинов у крыс // Патол. физиология и эксперимент. терапия. — 2004. — № 1. — С. 26—27.

6. Лутай М.И., Голикова И.П., Деяк С.И., Слободской В.А. Системное воспаление у пациентов с ишемической болезнью сердца: взаимосвязь с клиническим течением и наличием факторов риска // Украин. мед. журн. — 2006. — Т. 2. — С. 80—83.

7. Майстровский К.В., Запорожец Т.С., Рапова В.Г., Звягинцева Т.Н. и др. Коррекция липидного обмена у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей сульфатированным полисахаридом из бурой водоросли *Fucus Evanescent* // Тихоокеан. мед. журн. — 2010. — № 4. — С. 47—50.

8. Перегуд Д.И., Онуфриев М.В., Егорова Л.К., Жилов В.Х. и др. Иммуномодулятор галавит ослабляет проявления синдрома отмены морфина у крыс роль нитрергической системы мозга // Нейрохимия. — 2005. — № 3. — С. 187—194.

9. Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Полонская Я.В., Цымбал С.Ю. и др. // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2010. — Т. 149, № 5. — С. 520—523.

10. Санникова А.А., Чучкова Н.Н., Гайсина Э.Ш. Иммуномодулирующее действие глюкозаминилдипептида при измененном липидном обмене и атеросклерозе // Вестн. уральской мед. акад. науки. — 2008. — № 1. — С. 64—66.

11. Шаврин А.П., Ховаева Я.Б., Черешнев В.А., Головской Б.В. Маркеры воспаления в процессе развития атеросклероза // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2009. — Т. 8, № 3. — С. 13—15.

12. Ястребова С.А. Влияние иммуностимулятора галавит на морфо-функциональные структуры тимуса и селезенки // Физиология и здоровье человека: науч. тр. 1 съезда физиологов СНГ. — 2005. — Т. 2. — С. 112.

13. Allison B. Reiss, Amy D. Glass Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects // Journal of investigative medicine. — 2006. — Vol. 54. N 3. — P. 123—131.

14. Helle F., Vagnes O.B., Iversen B.M. Angiotensin II-induced calcium signaling in the afferent arteriole from rats with two-kidney, one clip hypertension // Am. J. Physiol. Renal Physiol. — 2006. — Vol. 291. — P. 140—147.

15. Oyedemi S.O., Yakubu M.T., Afolayan A.J. Effect of aqueous extract of *Leonotis leonurus* (L.) R. Br. leaves in male Wistar rats // Human and Experimental Toxicology. — 2010. — N 29. — P. 377—384.

Сведения об авторах

Турмова Екатерина Павловна — доцент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО Владивостокского государственного медицинского университета, кандидат медицинских наук (тел.: +7(4232) 45-07-00; e-mail: eturmova@mail.ru; e-mail: patphis-vl@mail.ru)

Григорюк Александр Анатольевич — доцент курса оперативной хирургии и топографической анатомии кафедры анатомии ГБОУ ВПО ВГМУ, кандидат медицинских наук (тел. моб.: +79024801713)

Бычков Евгений Александрович — аспирант кафедры патологической физиологии ВГМУ, врач сосудистый хирург ГКБ № 2 г. Владивостока (тел.: +7(4232) 45-07-00)

Маркелова Елена Владимировна — заведующая кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО Владивостокского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор (тел.: +7(4232) 45-07-00; e-mail: eturmova@mail.ru; e-mail: patphis-vl@mail.ru)

Чикаловец Ирина Владимировна — старший научный сотрудник лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН, кандидат химических наук, доцент, (Тихоокеанский институт биоорганической химии) Дальневосточное отделение РАН (e-mail: science@pibc.dvo.ru)

Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, А.А. Останин, Е.Р. Черных

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРОТИВ АКТИВИРОВАННЫХ CD4⁺ И CD8⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка цитотоксической активности IFN α -индуцированных дендритных клеток (ИФН-ДК) и IL-4-индуцированных ДК (ИЛ4-ДК) против активированных в алло-СКЛ CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Показано, что в культурах с ИФН-ДК доля AnnexinV⁺/PI⁺ клеток, соответствующих ранней стадии апоптоза, среди CD4⁺Т-лимфоцитов была ниже, чем в культурах с ИЛ4-ДК. В то же время относительное количество AnnexinV⁺/PI⁺ клеток (поздняя фаза апоптоза/некроз) среди CD4⁺Т-клеток после активации аллогенными ИФН-ДК и ИЛ4-ДК возрастало в равной степени. Продемонстрировано, что ИФН-ДК обладали сходной с ИЛ4-ДК способностью индуцировать апоптоз в CD3⁺CD8⁺Т-клетках.

Ключевые слова: дендритные клетки, CD4⁺Т-лимфоциты, CD8⁺Т-лимфоциты, апоптоз

CYTOTOXIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS AGAINST ACTIVATED CD4⁺ AND CD8⁺T-LYMPHOCYTES IN THE CULTURE *IN VITRO*

T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, M.A. Tihonova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh

Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

The aim of the present study was a comparative assessment of the cytotoxic activity of IFN α -induced dendritic cells (IFN-DCs) and IL-4-induced DCs (IL4-DCs) against allo-MLC-activated CD4⁺ and CD8⁺T-lymphocytes. It was shown the level of AnnexinV⁺/PI⁺ cells corresponding to early apoptosis among CD4⁺T-lymphocytes was lower in cultures with IFN-DCs compared with IL4-DCs. At the same time the relative number of AnnexinV⁺/PI⁺ cells (late phase of apoptosis/necrosis) among CD4⁺T-lymphocytes activated by allogenic IFN-DCs and IL4-DCs increased in an equal degree. It was demonstrated that IFN-DCs possessed similar ability to induce apoptosis of CD3⁺CD8⁺T-lymphocytes.

Key words: dendritic cells, CD4⁺ T-lymphocytes, CD8⁺T-lymphocytes, apoptosis

Дендритные клетки (ДК), будучи профессиональными антигенпрезентирующими клетками, играют ведущую роль в запуске специфического противоопухолевого и противовирусного иммунного ответа, активируя наивные Т-клетки, эффекторные CD8⁺Т-клетки и индуцируя антигенспецифический иммунный ответ [15]. С другой стороны, исследования последнего десятилетия демонстрируют, что ДК способны подавлять рост и пролиферацию опухолевых клеток за счет прямого цитостатического и цитотоксического эффектов, при этом не повреждая здоровые клетки [10].

Относительно недавно была описана популяция ДК, генерируемая в культуре *in vitro* в условиях замены IL-4 (ИЛ4-ДК) на IFN- α (ИФН-ДК). ИФН-ДК отличаются от ИЛ4-ДК более высокой миграционной активностью, выраженной антигенпрезентирующей функцией, большей стабильностью в условиях дефицита ростовых факторов, а также способностью стимулировать как Th1-, так и Th2-ответ [12]. Кроме того, ИФН-ДК являются более эффективными стимуляторами CD8⁺ эффекторных Т-клеток [5]. С точки зрения эффекторной функции ИФН-ДК характеризуются более высокой киллерной активностью против TRAIL-чувствительных опухолевых клеток Jurkat и схожей с ИЛ4-ДК цитотоксичностью против TRAIL-резистентных клеток-мишеней Нер-2 [6].

Закономерно возникает вопрос, распространяется ли цитотоксический эффект ДК на иммунокомпетентные клетки. Согласно немногочисленным данным литературы в качестве клеток-мишеней цитотоксической активности ДК могут выступать активированные Т-лимфоциты. Поскольку Т-клетки могут экспрессировать рецепторы к цитотоксическим лигандам TNF-семейства (Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R1) [3], можно предположить, что иммунокомпетентные клетки действительно могут выступать в качестве потенциальных мишеней к цитотоксической активности ИФН-ДК.

Так, показано, что плазматцитоидные ДК (пДК) способны индуцировать апоптоз CD4⁺Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных больных через TRAIL-зависимый сигнальный путь [14]. Интересно отметить, что ВИЧ-стимулированные пДК также проявляют цитотоксическую активность против ФГА-активированных CD4⁺Т-клеток здоровых доноров. Эти данные позволяют предположить, что, с одной стороны, цитотоксическая активность ДК необходима для элиминации пораженных клеток, но, с другой стороны, может индуцировать гибель здоровых клеток и приводить к истощению Т-клеток на ранней стадии заболевания. Недавние исследования показали, что миелоидные ДК участвуют в элиминации активированных, но не покоящихся CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, и данная функция опосреду-

ется через механизм FasL/Fas-индуцированного апоптоза [4].

Тем не менее, сведения о цитотоксическом эффекте ИФН-ДК против иммунокомпетентных клеток в сравнении с цитотоксической активностью миелоидных ДК, генерируемых в стандартном протоколе, практически отсутствуют. В связи с этим целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка апоптоз-индуцирующей активности ИФН-ДК и ИЛ4-ДК против активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 15 здоровых доноров крови. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина. ИФН-ДК получали путем культивирования прилипающей фракции МНК в 6-луночных планшетах (Nunclo, Дания) в течение 3–4 сут. в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% сыворотки плодов коровы (БиолоТ, Санкт-Петербург) в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN- α (1000 Ед./мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч с липополисахаридом (10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich). Для генерации ИЛ4-ДК прилипающую фракцию МНК инкубировали в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF (40 нг/мл) и IL-4 (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) в течение 5 суток. Конечное созревание ИЛ4-ДК индуцировали путем дополнительного культивирования клеток в течение 48 ч в присутствии ЛПС (10 мкг/мл).

Уровень апоптоза CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании в течение 3 суток МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных ИФН-ДК в соотношении 10:1. Культуры дублировали в 12 идентичных повторях, с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. Для этого, 25 мкл МНК ($1,0 \times 10^6$), полученных после культивирования в алло-СКЛ, инкубировали в течение 45 мин при 4 °С в темноте с 5 мкл APC-конъюгированных анти-CD3-антител и 5 мкл PerCP-конъюгированных анти-CD4 (Becton Dickinson, США). После двукратной отмывки холодным забуференным физиологическим раствором, клетки суспендировали в 100 мкл 10X-буфера (Becton Dickinson, США) и добавляли по 5 мкл Annexin V-FITC и PI (Becton Dickinson, США). Клетки инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре, затем добавляли 400 мкл буфера 10X и измеряли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США).

Количество апоптотических клеток определяли по связыванию FITC-меченного Annexin V с клеточной мембраной (в диапазоне зеленого света) и PI с

ДНК клетки (в диапазоне красного света) в гейтах CD3⁺CD4⁺ или CD3⁺CD8⁺ (CD4⁺) Т-лимфоцитов. Количество клеток, находящихся в ранней стадии апоптоза, регистрировалось по связыванию с Annexin V-FITC и отсутствию связывания с PI. Флуоресценция клеток в обоих диапазонах свидетельствовала о поздней стадии апоптоза или о некрозе клетки. Жизнеспособные клетки соответствовали Annexin V-FITC⁻/PI⁻ зоне на цитограмме. Результаты выражались в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов. В каждом образце анализировали не менее 1×10^4 клеток; для обобщения результатов использовали программы Cell Quest.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона — Манна — Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные приведены в виде среднего арифметического значения (М) и стандартной ошибки среднего (S.E.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных таблицы 1, ДК индуцируют в СКЛ апоптоз Т-лимфоцитов, активированных аллоантигенами. Так, совместное культивирование ЛПС-стимулированных ИФН-ДК с аллогенными МНК доноров сопровождалось почти двукратным возрастанием уровня AnnexinV⁺/PI⁺ клеток среди CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов в 3-суточных культурах по сравнению с относительным количеством CD4⁺/AnnexinV⁺/PI⁺ Т-клеток среди нестимулированных МНК ($p_U = 0,01$). Подобные изменения отражают увеличение экспрессии CD3⁺CD4⁺ Т-клетками раннего маркера апоптоза — фосфатидилсерина, появление которого на наружной мембране клеток связывают с начальной стадией апоптоза. Аналогичные изменения наблюдались и в случае активации МНК в алло-СКЛ ЛПС-стимулированными ИЛ4-ДК. Количество AnnexinV⁺/PI⁺ клеток в популяции CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов возрастало в 2,5 раза. При этом регистрировалась отчетливая тенденция к более выраженной способности ИЛ4-ДК индуцировать ранний апоптоз CD4⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с ИФН-ДК ($11,0 \pm 0,9$ vs $8,5 \pm 0,9$ %; $p_U = 0,09$). Кроме того, мы провели анализ уровня Т-лимфоцитов в стадии позднего апоптоза (или некроза), которая проявляется не только потерей асимметрии клеточной мембраны за счет перестройки фосфолипидных компонентов, но и нарушением ее целостности, обуславливающей проникновение внутрь клетки ДНК-связывающего красителя PI. Относительное количество AnnexinV⁺/PI⁺ клеток среди CD4⁺ Т-лимфоцитов в контрольных культурах было незначительным, однако увеличивалось в 2 раза после активации аллогенными ИФН-ДК и ИЛ4-ДК в СКЛ ($p_U = 0,01$ и $p_U = 0,03$, соответственно).

Таблица 1
Влияние ДК на апоптоз CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов

Показатель	Контроль	+ИФН-ДК	+ИЛ4-ДК
Annexin V ⁺ /PI ⁻	4,4 ± 1,1	8,5 ± 0,9 *	11,0 ± 0,9 *
Annexin V ⁺ /PI ⁺	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,3 *	1,3 ± 0,3 *
Annexin V/PI ⁺	1,3 ± 0,4	2,8 ± 1,6	4,2 ± 1,7

Примечание: представлено относительное количество (% , M ± SE) апоптотических CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов (n = 8), среди нестимулированных МНК здоровых доноров (контроль) и среди МНК, активированных в течение 3 суток в СКЛ в присутствии аллогенных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК (+ИФН-ДК) и ИЛ4-ДК (+ИЛ4-ДК) в соотношении 10:1.
* – $p_u < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем.

В качестве примера на рисунке 1 приведены данные гистограмм распределения клеток в зависимости от их жизнеспособности в популяции CD3⁺CD4⁺Т-лимфоцитов у одного из обследованных нами доноров. В контроле исследуемая клеточная популяция была представлена преимущественно живыми клетками и небольшой примесью AnnexinV⁺/PI⁻ апоптотических клеток (91,07 и 4,64 %, соответственно). Активация МНК аллоантигенами сопровождалась возрастанием относительного количества апоптотических CD4⁺Т-лимфоцитов по сравнению с контролем. Однако в культурах с ИФН-ДК доля апоптотических AnnexinV⁺/PI⁻ CD4⁺Т-лимфоцитов была ниже, чем в культурах с ИЛ4-ДК. Количество AnnexinV⁺/PI⁺ CD4⁺Т-клеток в культурах с ИФН-ДК и ИЛ4-ДК возрастало в равной степени.

Сравнительный анализ цитотоксической активности ЛПС-стимулированных ИФН-ДК и ИЛ4-ДК (табл. 2) против CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов показал, что ИФН-ДК обладали сходной с ИЛ4-ДК способностью индуцировать апоптоз в CD8⁺Т-клетках. Так, относительное количество CD8⁺Т-лимфоцитов в стадии раннего апоптоза возрастало в среднем в 1,5 раза. При этом активация CD8⁺Т-клеток не сопровождалась увеличением относительного количества клеток в стадии позднего апоптоза/некроза. Как в контрольных культурах, так и в культурах СКЛ уровень AnnexinV⁺/PI⁺-клеток среди CD8⁺Т-лимфоцитов составлял в среднем 1 %.

Таблица 2
Влияние ДК на апоптоз CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов

Показатель	Контроль	+ИФН-ДК	+ИЛ4-ДК
Annexin V ⁺ /PI ⁻	13,2 ± 1,0	20,9 ± 1,6 *	20,7 ± 3,0 *
Annexin V ⁺ /PI ⁺	1,1 ± 0,9	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2
Annexin V/PI ⁺	0,6 ± 0,3	1,0 ± 0,2	2,5 ± 0,5

Примечание: представлено относительное количество (% , M ± SE) апоптотических CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов (n = 8), среди нестимулированных МНК здоровых доноров (контроль) и среди МНК, активированных в течение 3 суток в СКЛ в присутствии аллогенных ЛПС-стимулированных ИФН-ДК (+ИФН-ДК) и ИЛ4-ДК (+ИЛ4-ДК) в соотношении 10:1.
* – $p_u < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем.

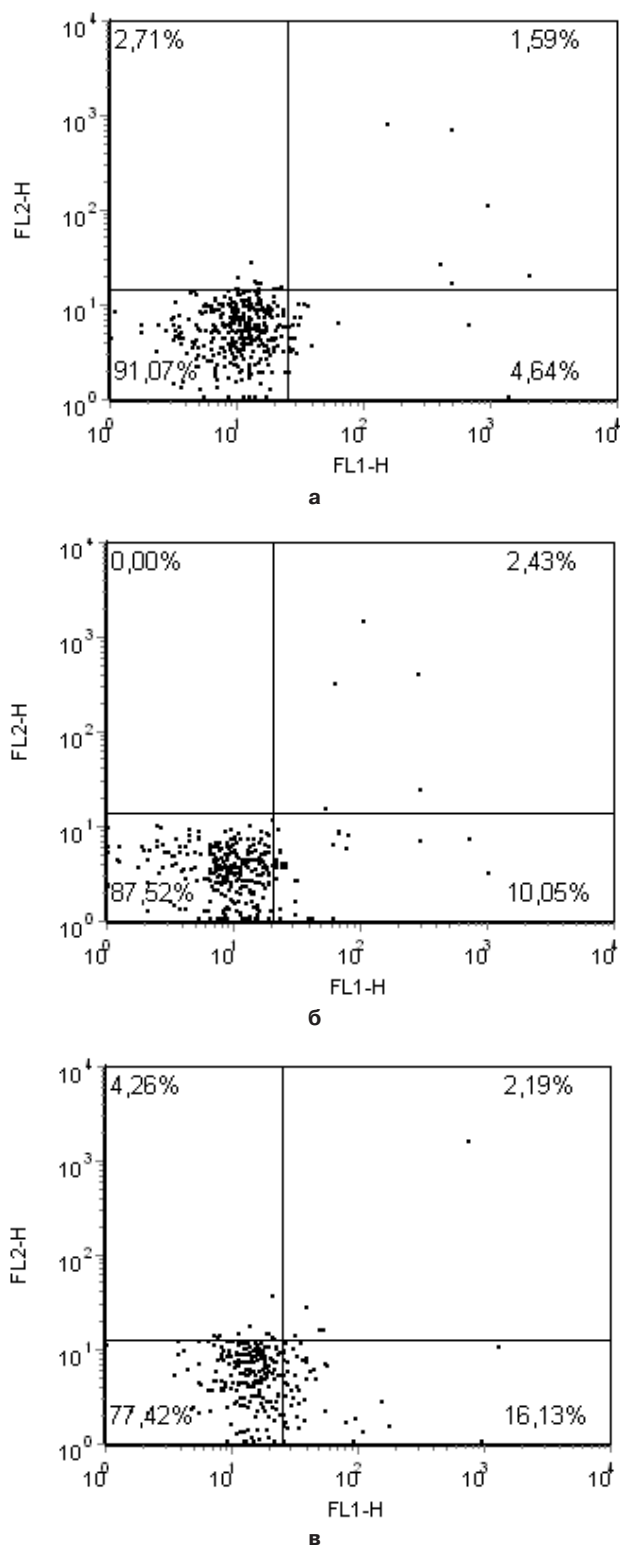


Рис. 1. Распределение апоптотических и жизнеспособных CD4⁺Т-лимфоцитов. Представлены индивидуальные значения распределения апоптотических и жизнеспособных нестимулированных CD3⁺CD4⁺Т-лимфоцитов (а) и активированных аллогенными ИФН-ДК (б) и ИЛ4-ДК (в) в СКЛ. По оси абсцисс (F1) – интенсивность флуоресценции AnnexinV-FITC. По оси ординат (F2) – интенсивность флуоресценции PI. Левый нижний квадрант – Annexin V⁻/PI⁻ – жизнеспособные клетки; правый нижний квадрант – Annexin V⁺/PI⁻ – ранняя стадия апоптоза; правый верхний квадрант – Annexin V⁺/PI⁺ – поздняя стадия апоптоза или некроз; левый верхний квадрант – Annexin V⁻/PI⁺ – некроз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитотоксическая активность является важной эффекторной функцией клеток иммунной системы и играет ключевую роль в элиминации опухолевых и инфицированных вирусом клеток. Недавние исследования показали, что наряду с NK-клетками и цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами, прямым цитотоксическим действием обладают также и ДК [10]. В представленной работе, по сути, впервые продемонстрировано, что ДК, генерированные в культуре *in vitro*, могут индуцировать апоптоз не только в трансформированных клетках, но и в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, активированных аллоантигенами. При этом сравнение ИФН-ДК и ИЛ4-ДК свидетельствует о схожей цитотоксичности указанных типов ДК против активированных Т-лимфоцитов.

Согласно данным литературы цитотоксическая активность ДК может опосредоваться различными апоптоз-индуцирующими молекулами, относящимся к TNF-семейству (TRAIL, FasL, TNF-α) [10]. Известно, что IFN усиливают экспрессию эффекторными клетками различных проапоптогенных молекул, в частности FasL и TRAIL [8, 10]. Поскольку Т-лимфоциты в условиях активации экспрессируют рецепторы к соответствующим проапоптогенным лигандам, можно предположить, что ИФН-ДК, обладающие более высокой цитотоксической активностью против TRAIL- и FasL-чувствительной опухолевой линии Jurkat по сравнению с ИЛ4-ДК [6], также будут проявлять более высокую проапоптотическую активность против активированных лимфоцитов. Однако данная гипотеза не подтвердилась. Согласно полученным нами данным, уровень AnnexinV⁺/PI⁺ и AnnexinV⁺/PI⁺ среди CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в культурах, стимулированных ИФН-ДК, не превышал соответствующих показателей в культурах МНК, стимулированных ИЛ4-ДК.

По-видимому, в реализации цитотоксической активности ДК против активированных Т-лимфоцитов могут быть вовлечены другие механизмы. Согласно данным литературы, запуск программы апоптоза Т-лимфоцитов, активированных через Т-клеточный рецептор, может осуществляться через рецептор клеточной смерти (PD-1) [13]. Одним из двух известных к нему лигандов является молекула B7-H1 (PD-L1), которая экспрессируется на ДК. Кроме того, ранее нами было показано, что ЛПС-стимулированные ИЛ4-ДК характеризуются более высокой экспрессией B7-H1, чем ИФН-ДК [1]. Поэтому включение сигнального пути PD-1/B7-H1 при взаимодействии ИФН-ДК и ИЛ4-ДК с Т-лимфоцитами может быть еще одним возможным механизмом, посредством которого ДК могут индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов.

Представленные в настоящей работе данные демонстрируют, что популяции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, активированных в алло-СКЛ, характеризуются разной чувствительностью к цитотоксическому действию как ИФН-ДК, так и ИЛ4-ДК. Так, активированные CD4⁺ Т-лимфоциты в ответ

на аллоантигены в большей степени подвержены цитотоксическому действию ДК, чем CD8⁺ Т-лимфоциты.

Действительно, ряд исследователей отмечают различную чувствительность CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток к тем или иным проапоптогенным лигандам. Bosque A. и соавт. показали, что IL-2-активированные субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов характеризуются одинаковой чувствительностью к Fas/FasL регуляции, тогда как CD8⁺ Т-лимфоциты более чувствительны к APO2L/TRAIL опосредованному пути [2]. Другие исследователи, наоборот, демонстрируют, что активированные CD8⁺ Т-клетки, несмотря на экспрессию проапоптогенного рецептора TRAIL-R2, все же остаются резистентными к цитотоксическому действию TRAIL за счет повышения экспрессии антиапоптотических рецепторов TRAIL-R3 и TRAIL-R4, а также за счет экспрессии внутриклеточного протеина c-FLIP, ингибирующего каскад клеточных реакций при апоптозе [9]. Недавние исследования на экспериментальных моделях показали, что толерогенные CD11c⁺CD8⁺ ДК способны подавлять аллергическое кожное воспаление через TNF-опосредованный киллинг аллерген-специфичных эффекторных CD8⁺ Т-клеток, не нарушая при этом генерацию и функции регуляторных Т-клеток. [7]. Этот эффект связан с повышением экспрессии рецептора TNF-R2(p75) на CD8⁺ Т-клетках сенсibilизированных мышей, что обуславливает чувствительность этих клеток к TNF-медиации апоптоза.

Можно полагать, что цитотоксическая активность ИФН-ДК, направленная против активированных лимфоцитов, имеет определенное значение при физиологических условиях, например при ограничении иммунного ответа. Однако чрезмерно высокий уровень экспрессии проапоптогенных молекул на ИФН-ДК может приводить к усилению их киллерной активности против иммунокомпетентных клеток и способствовать развитию различных иммунопатологических процессов. Подобный эффект описан для ИЛ4-ДК при цитомегаловирусной инфекции [11]. В этом случае ДК индуцируют апоптоз как пораженных вирусом, так и здоровых активированных CD4⁺ Т-клеток через TRAIL- и FasL-медируемые пути.

В целом, проведенные нами исследования позволили ответить на важный вопрос о цитотоксической функции ИФН-ДК против активированных Т-лимфоцитов. Несмотря на более высокую противоопухолевую цитотоксическую активность ИФН-ДК, данный тип клеток обладает схожей с ИЛ4-ДК цитотоксичностью против активированных лимфоцитов, что обосновывает целесообразность использования ИФН-ДК при проведении иммунотерапии у больных с онкопатологией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В. Сравнительная характеристика фенотипа и цитокин-секреторной активности дендритных клеток человека, генерируемых *in vitro* в присут-

ствии IFN-альфа и IL-4 // Иммунология. — 2012. — № 1. — С. 36—46.

2. Bosque A., Pardo J., Martínez-Lorenzo M.J. Human CD8⁺T cell blasts are more sensitive than CD4⁺T cell blasts to regulation by APO2L/TRAIL // Eur. J. Immunol. — 2005. — Vol. 35. — P. 1812—1821.

3. Gupta S., Su H., Bi R. Life and death of lymphocytes: a role in immunosenescence // Immunity & Ageing. — 2005. — Vol. 2. — P. 12.

4. Hoves S., Krause S.W., Herfarth H. Elimination of activated but not resting primary human CD4⁺ and CD8⁺T cells by Fas ligand (FasL/CD95L)-expressing killer-dendritic cells // Immunobiology. — 2004. — Vol. 208. — P. 463—475.

5. Lapenta C., Santini S., Spada M. IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8⁺ T cells against exogenous viral antigens // Eur. J. Immunol. — 2006. — Vol. 36. — P. 2046—2060.

6. Leplina O., Tyrinova T., Tikhonova M. Direct Antitumor Activity of Interferon-Induced Dendritic Cells of Healthy Donors and Patients with Primary Brain Tumors // Glioma — Exploring Its Biology and Practical Relevance. — 2011. — P. 325—342.

7. Luckey U., Maurer M., Schmidt T. T cell killing by tolerogenic dendritic cells protects mice from allergy // J. Clin. Invest. — 2011. — Vol. 121, N 10. — P. 3860—3871.

8. Maciejewski J., Selleri C., Anderson S., Young N.S. Fas antigen expression on CD34⁺ human marrow cells induced by interferon- γ and tumor

necrosis- α and potentiated cytokine mediated hemopoietic suppression in vitro // Blood. — 1995. — Vol. 85. — P. 3183—3190.

9. Mirandola P., Ponti C., Gobbi G. Activated human NK and CD8⁺ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity // Blood. — 2004. — Vol. 104, N 8. — P. 2418—2424.

10. Rissoan M.C., Duhon T., Wesa A.K., Storkus W.J. Killer dendritic cells: mechanisms of action therapeutic implications for cancer // Cell Death Differ. — 2008. — Vol. 15. — P. 51—57.

11. Raftery M.J., Schwab M., Eibert S.M. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy // Immunity. — 2001. — Vol. 15. — P. 997—1009.

12. Santini S., Puccini T., Lapenta C. A new type 1 IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // Stem cells. — 2003. — Vol. 21. — P. 357—362.

13. Sharpe A.H., Wherry E.J., Ahmed R., Freeman G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection // Nature Immunology. — 2007. — Vol. 8. — P. 239—245.

14. Sary G., Klein I., Kohlhofer S. Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4⁺ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients // Blood. — 2009. — Vol. 114. — P. 3854—3863.

15. Steinman R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity // Annu. Rev. Immunol. — 1991. — Vol. 9. — P. 271—296.

Сведения об авторах

Тыринова Тамара Викторовна — младший научный сотрудник ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН (630079, г. Новосибирск, ул. Степная, д. 63/1, кв. 15; тел.: +7-913-892-25-59; e-mail: tyrinova@bk.ru)

Леплина Ольга Юрьевна — старший научный сотрудник ФГБУ НИКИ СО РАМН, доктор медицинских наук (630005, г. Новосибирск, ул. Некрасова, д. 55 кв. 61; тел.: 383 228-21-01; e-mail: oleplina@mail.ru)

Тихонова Марина Александровна — ведущий научный сотрудник ФБГУ НИИКИ СО РАМН, кандидат биологических наук
Останин Александр Анатольевич — главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ клинической иммунологии СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Черных Елена Рэмовна — заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, заместитель директора НИИКИ СО РАМН, чл.-корр. СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)

Е.Я. Шевела ¹, И.А. Васильев ², В.В. Ступак ², Е.В. Половников ², А.Г. Самохин ²,
Г.И. Окладников ², Д.В. Морозов ³, В.А. Головнев ⁴, Е.Р. Черных ¹

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В КОРРЕКЦИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В МОДЕЛИ ОЧАГОВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА, ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЕМ ВЕНОЗНОГО КРОВОТОКА

¹ НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

² НИИТО (Новосибирск)

³ Городская клиническая больница № 1 (Новосибирск)

⁴ Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

В работе представлены результаты исследования влияния мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга на выраженность неврологического дефицита и морфофункциональное состояние головного мозга в модели очаговых повреждений, индуцированных нарушением венозного кровотока. Повреждение головного мозга индуцировалось у крыс породы Вистар путем коагуляции верхнего сагиттального синуса с последующей коагуляцией корковых венозных сосудов в левой теменно-височной области. МСК вводили внутривенно на 1-е и 7-е сутки и оценивали динамику неврологических нарушений и морфологических изменений на 7-е, 14-е и 21-е сутки в сравнении с контрольной группой (МСК-). Введение МСК сопровождалось значительным уменьшением неврологического дефицита, наиболее выраженным при введении МСК на 1-е сутки. Морфологические исследования зоны повреждения показали, что введение МСК приводило к уменьшению площади зоны некроза, стимуляции ангиогенеза и улучшению структурно-клеточных показателей по сравнению с группой сравнения. В итоге к 21-му дню исследования зона некроза у животных с трансплантацией МСК замещалась глиомезодермальным рубцом, в то время как у животных контрольной группы формирование рубца было менее выраженным и у части животных сочеталось с развитием кистозной трансформации. Трансплантация МСК оказывает положительное влияние на неврологическое и морфо-функциональное восстановление головного мозга у экспериментальных животных в модели нарушения церебрального венозного кровообращения.

Ключевые слова: МСК, нарушение венозного кровотока, морфо-функциональные изменения, неврологический дефицит

MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN CORRECTION OF NEUROLOGICAL DEFICIT AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE RAT MODEL OF FOCAL CEREBRAL LESIONS INDUCED BY VENOUS BLOOD FLOW DISORDER

Е.Я. Shevela ¹, I.A. Vasiljev ², V.V. Stupak ², E.V. Polovnikov ², A.G. Samokhin ²,
G.I. Okladnikov ², D.V. Morozov ³, V.A. Golovnyov ⁴, E.P. Chernukh ¹

¹ Research Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk

² Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Novosibirsk

³ City Clinical Hospital N 1, Novosibirsk

⁴ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

The paper presents the results of assessing the effect of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) on the severity of neurological deficit and the brain morphology and function in a model of focal lesions induced by a venous blood flow disorder. Cerebral lesions were induced in Wistar rats by coagulation of the superior sagittal sinus followed by coagulation of cortical veins in the left parietotemporal region. MSCs were injected intravenously on days 1 and 7, and the dynamics of neurological disorders and morphological changes were assessed at 7, 14 and 21 days in comparison to controls. MSCs infusion was accompanied by a significant reduction in neurological deficit, the most pronounced with MSCs injections on day 1. Morphological investigation of the damaged region have shown that the administration of MSCs led to a decrease in the area of necrosis, stimulation of angiogenesis, and improvement of structural and cellular parameters as compared to the control group. As a result, by day 21 the area of necrosis in animals with MSC transplantation was replaced by glial-mesodermal scar, whereas the scar formation in control animals was less pronounced, and in some cases was accompanied by cystic transformation. Transplantation of MSCs has a positive effect on neurological and morphofunctional recovery of the brain in experimental animal models of cerebral venous circulation disorders.

Key words: MSCs, venous blood flow disorder, morphologic and functional changes, neurological deficit

Долгое время считалось, что центральная нервная система (ЦНС) не способна к репарации. Однако экспериментальные исследования последних лет показали, что процессы репарации могут наблюдаться в поврежденной ткани ЦНС, и во многом обусловлены образованием новых сосудов и генерацией новых нервных клеток. Кроме

того, было показано, что трансплантация стволовых клеток может существенно активировать репаративные процессы. Среди различных типов клеток наибольшее внимание в последнее время привлекают мезенхимальные стромальные клетки (МСК), способные стимулировать ангиогенез в ишемизированном участке, активировать тканевые

стволовые клетки, оказывать нейротрофическую, нейрорегуляторную поддержку [1, 4]. Эффекты МСК в наибольшей степени изучены в моделях повреждения головного мозга, индуцированного нарушением артериального кровотока. Настоящая работа была посвящена исследованию влияния МСК на неврологическое и морфо-функциональное восстановление повреждений головного мозга, индуцированных нарушением венозного оттока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на крысах линии Вистар со средней массой 220 г. Содержание животных в пред- и послеоперационном периоде осуществлялось в условиях вивария ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», согласно приказу Минздрава РФ № 755 от 12 августа 1977 г. Все исследования выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Формирование очагового повреждения достигалось путем последовательного пересечения верхнего сагиттального синуса в средней его трети с последующей прецизионной коагуляцией сосудов в левой теменно-височной области (на площади до 0,8 – 1,0 см) (заявка на изобретение 2009143265, приоритет от 23.11.2009 г.) [2].

При выполнении операций использовали микрохирургический инструментарий и операционную оптику с увеличением 5,0 (бинокулярная лупа, Carl Zeiss, Germany). Операцию проводили при анестезиологической поддержке с использованием раствора кетамина (125 мг/кг) интраперитонеально. Первоначально выполняли линейный разрез мягких тканей в левой теменно-височной области с последующим скелетированием костей свода черепа. Следующим этапом проводили резекционную трепанацию в левой теменно-височной области (с заходом за среднюю линию) с обнажением верхнего сагиттального синуса в средней его трети.

В исследование были отобраны 20 животных с грубым, стойким неврологическим дефицитом, которые были разделены на 3 группы. Первая (контрольная) группа включала 8 животных, которым была выполнено хирургическое вмешательство без последующего введения клеток. Группы 2 и 3 включали по 6 животных, которым вводили МСК (2×10^6 клеток/животное) после проведенного хирургического пособия через хвостовую вену на 1-е (группа 2) и 7-е (группа 3) сутки, соответственно. Все животные в течение первой недели послеоперационного периода получали антибактериальную терапию в виде *Sol. Enroxili* 5% — 0,05 мг 1 раз в сутки внутримышечно. Кормление животных осуществлялось сбалансированной смесью «Нутрикомп» через пипетку и/или парентерально.

Выраженность неврологического дефицита оценивали с помощью шкалы оценки тяжести неврологических нарушений (ОТНН) (Chen et al., 2001) в нашей модификации [3]. Оценку невроло-

гического дефицита в группах проводили на 1, 7, 14 и 21-е сутки.

МСК получали из суспензии клеток костного мозга, аспирированных из бедренных костей животных. Клетки вымывали из канала костей, после чего получали клеточную суспензию с помощью ресуспендирования через иглы диаметром 24 G. Для получения МСК КМ мозга инкубировали в пластиковых флаконах (Nunclon) в среде DMEM (Sigma), содержащей 15 % эмбриональной телячьей сыворотки (ICN) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Через 24 часа неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток промывали средой Хэнкса и инкубировали в культуральной среде до получения конфлюентного слоя. Для пересева культуры МСК использовали раствор трипсина и ЭДТА. После 1 – 2 пассажей МСК использовали для введения животным.

Морфологические исследования зоны повреждения головного мозга проводили с помощью фиксации материала в 10% растворе нейтрального формалина в течение двух суток. Затем исследуемые образцы обезживали в серии спиртов с возрастающей концентрацией и заключали в смесь парафина и воска. С помощью микротомы готовили срезы толщиной 5 – 7 мкм. Срезы головного мозга изготавливали во фронтальной и сагиттальных плоскостях. Для изучения морфоцитотектоники срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином, по Ван-Гизону и заключали их в канадский бальзам. Обозначение и размерность стереологических параметров, использованных в работе, приведены согласно рекомендациям Международного стереологического общества [5]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Неврологические расстройства в модели нарушения венозного оттока проявлялись развитием тетрапареза в конечностях, значительно более выраженным на контралатеральной стороне с повышением тонуса мышц в паретических конечностях и хвосте. Эта симптоматика сочеталась с развитием гипестезии и грубым нарушением координации движений. Наряду с очаговой, у животных отмечалась выраженная общемозговая симптоматика: крысы характеризовались выраженным угнетением двигательной активности, сонливостью, были не способны самостоятельно принимать пищу. Суммарный балл неврологических нарушений по шкале ОТНН в контрольной группе на 1-е сутки составлял $22,2 \pm 0,13$ балла, что свидетельствовало о наличии неврологического дефицита тяжелой степени. Общее тяжелое состояние животных данной группы сохранялось на протяжении всей первой недели послеоперационного периода, что требовало проведения принудительного кормления. Дальнейшее наблюдение за животными и оценка неврологической симптоматики не выявило значимой положительной динамики. Выраженный неврологический дефицит, регистрируемый через

неделю с момента проведения операции ($21,0 \pm 0,1$ балла), сохранялся на уровне $19,0 \pm 0,1$ балла на 14-е сутки и $15,7 \pm 0,29$ балла на 21-е сутки.

В группах с трансплантацией МСК выраженность неврологического дефицита на 1-е сутки послеоперационного периода не отличалась от показателей контрольной группы. Введение МСК на 1-е сутки сопровождалось регрессом неврологической симптоматики к исходу первой недели до $18,3 \pm 0,48$ балла, а к 21-му дню — до $5,5 \pm 1,08$ балла. В группе с введением МСК на 7-е сутки заметное снижение неврологического дефицита наблюдалось на 14-е сутки ($13,3 \pm 1,19$ балла) и 21-й день ($9,07 \pm 0,87$ балла). Тем не менее, уменьшение неврологического дефицита к концу третьей недели послеоперационного периода в группе 3 было менее выраженным, чем в группе 2 (рис. 1). Отметим, что у животных группы 2 достаточно быстро (в течение недели) восстанавливалась способность к самостоятельному приему пищи.

Морфологические исследования показали, что в зоне повреждения головного мозга в используемой модели выявлялись признаки геморрагических нарушений, в частности, кровоизлияния, венозное полнокровие и стазы, степень выраженности которых позволила дифференцировать белые (73 %), красные (9 %) и смешанные (18 %) формы инфаркта, среди которых доминировали белые инфаркты. В периоде формирования инфаркта (1-е сутки послеоперационного периода) мозговая ткань характеризовалась дряблой консистенцией в очаге некроза; вещество мозга было набухшим, бледным, границы инфаркта визуализировались нечетко и плохо контурировались. При микроскопическом исследовании выявлялись признаки некроза с массивным перифокальным отеком, отграничивающим зону повреждения от ткани

мозга, в которой выявлялись изменения нейронов: острое набухание, клетки-тени, клетки с ишемическими изменениями. Данная зона неполного некроза, характеризовалась отеком, разрыхлением, плохо прокрашивалась гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Характерным проявлением морфологических изменений в используемой модели было наличие расширенных мелких вен и венул с явлениями стаза. При этом вокруг некоторых венозных сосудов выявлялись диапедезные кровоизлияния, которые в ряде случаев были обширными и сливались (рис. 2а). Кровоизлияния нередко были связаны не только с диапедезом эритроцитов, но и с переполнением, перерастяжением вен и разрывом их стенок.

К седьмым и четырнадцатым суткам выраженность морфологических изменений нарастает. Некротизированная ткань подвергается разжижению и резорбции с началом организации инфаркта. Отек, выявляемый в острый период, уменьшается, что способствует большей активности реактивных и репаративных процессов. В некротизированную ткань проникает плазма из сосудов, в которых кровоток еще сохранился, происходит диапедез лейкоцитов и эритроцитов. Инфаркт при этом приобретает желтоватый или красноватый оттенок. В пограничной с очагом зоне визуализируются макрофаги, волокнистые астроциты и новообразованные сосуды, отмечается вращение глиальных, аргирофильных волокон в зону очага (смешанный глиомезодермальный тип организации).

К двадцать первому дню репаративные процессы в области инфаркта заканчивались с исходом в глиомезодермальный рубец и/или формирование кисты, стенки которой состояли из соединительнотканых и глиальных волокон.

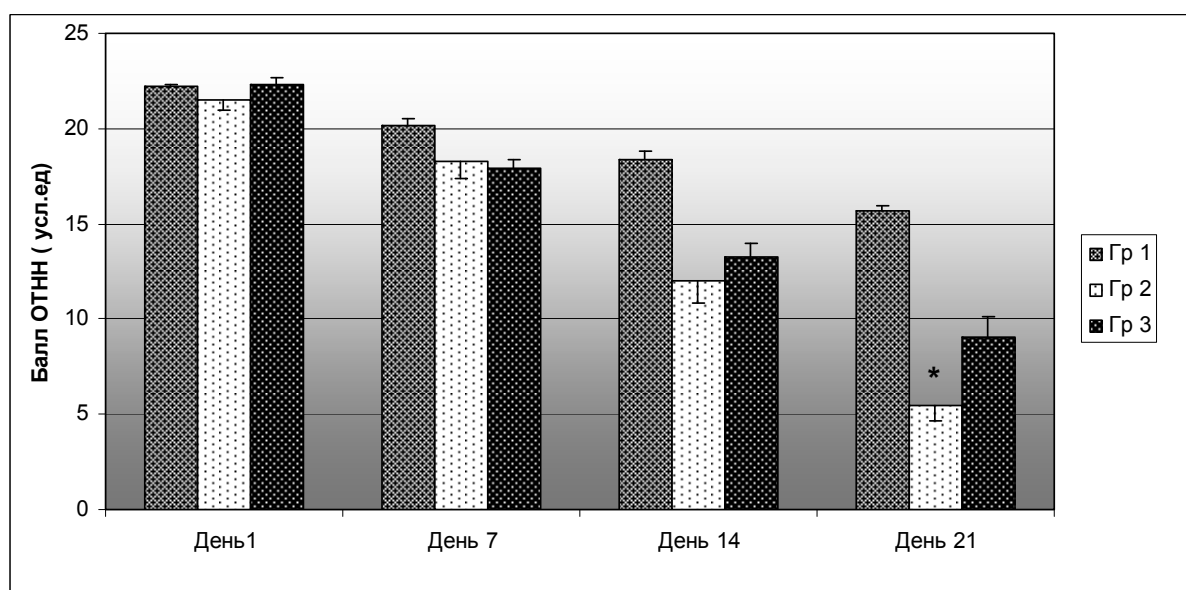


Рис. 1. Влияние внутривенного введения МСК на выраженность неврологических нарушений в модели очагового повреждения головного мозга, вызванного нарушением венозного оттока. * — $p < 0,05$ — достоверность различий между группами 2 и 3.

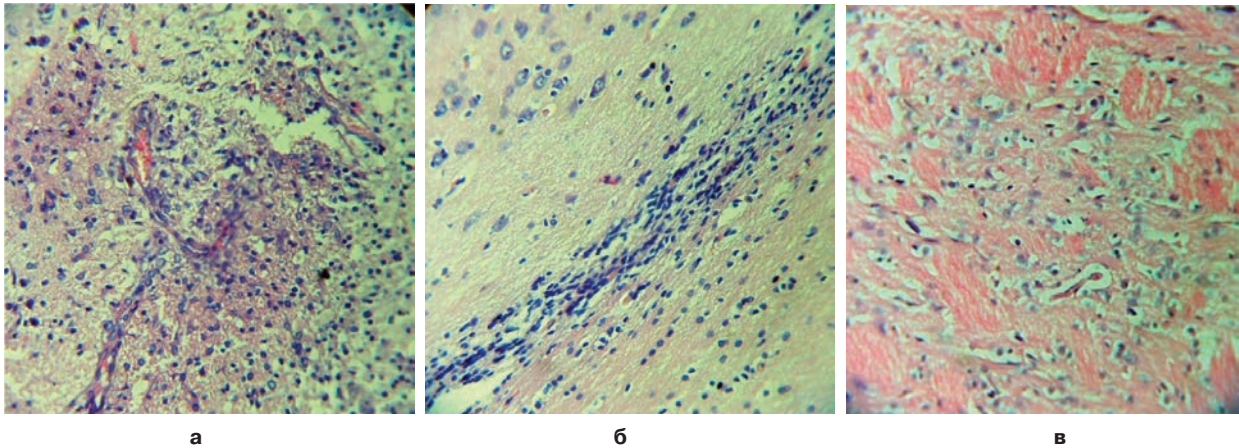


Рис. 2. Морфологические изменения головного мозга на 1-е и 21-е сутки. **а** – 1-е сутки после операции, **б** – 21-е сутки без введения МСК, **в** – 21-е сутки с внутривенным введением МСК в первый день. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$.

Введение МСК сопровождалось ускорением репаративных процессов, что было особенно заметным у животных с внутривенным введением МСК в первые сутки (вторая группа). Это проявлялось более ранним формированием глиомезодермального рубца (рис. 2в) по сравнению с животными контрольной группы (рис. 2б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно данным литературы, купирование неврологического дефицита в моделях церебральной артериальной ишемии на фоне введения МСК продемонстрировано многими авторами [1, 5, 7]. В настоящем исследовании впервые изучено влияние МСК в модели повреждения головного мозга, индуцированного нарушением венозного оттока. Полученные результаты продемонстрировали, что внутривенное введение МСК послеоперационного периода приводило к достоверному уменьшению выраженности неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой. Так, если в контрольной группе неврологический дефицит снижался в среднем на 14–17 %, то в группе с трансплантацией МСК – на 54–75 %. В итоге к 21-му дню неврологические изменения у животных опытной группы соответствовало статусу легких неврологических расстройств. Анализ эффективности клеточной терапии в зависимости от сроков введения МСК показал, что эффект клеток, вводимых на первые сутки послеоперационного периода, был статистически значимо выше, чем при введении клеток на 7-е сутки. При этом анализ морфологических изменений позволил предположить, что введение МСК сопровождается активацией репаративных процессов, в частности, более быстрым формированием глиомезодермального рубца и профилактирует развитие кистозной дегенерации. Можно также полагать, что эффект МСК обусловлен способностью клеток стимулировать ангиогенез и оказывать выраженный противоотечный и противовоспалительный эффект [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколова И.Б., Зинькова Н.Н., Билибина А.А., Кругляков П.В. и др. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 11, № 4. – С. 54–62.
2. Ступак В.В., Васильев И.А., Самохин А.Г. Способ моделирования ишемического повреждения головного мозга: пат. 2432619 Рос. Федерация: G09B 23/28, A61N 1/32/ заявитель и патентообладатель ФГУ Новосибирский науч.-ислед. ин-т травматологии и ортопедии Минздравсоцразвития России. – № 2009143265/14; заявл. 23.11.2009; опубл. 27.10.2011, Бюл. 30 – 4 с.
3. Черных Е.Р., Ступак В.В., Васильев И.А., Шевела Е.Я. и др. Мезенхимальные клетки в коррекции неврологического дефицита, индуцированного нарушением венозного кровотока головного мозга у крыс // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 2. – С. 77–83.
4. Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z. et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats // Stroke. – 2001. – Vol. 32. – P. 1005–1011.
5. Li Y., Chen J., Wang L., Lu M. et al. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells // Neurology. – 2001. – Vol. 56. – P. 1666–1672.
6. Newman R.E., Yoo D., LeRoux M.A., Danilovitch-Miagkova D. Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells // Inflammation & Allergy – Drug Targets. – 2009. – Vol. 8. – P. 110–123.
7. Parr A.M., Tator C.H., Keating A. Bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury // Bone marrow transplantation. – 2007. – Vol. 40. – P. 609–619.
8. Weibel E.R. Stereological methods. – London: Academic Press, 1979. – 415 p.

Сведения об авторах

Шевела Екатерина Яковлевна – старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, кандидат медицинских наук (г. Новосибирск; тел. раб.: 236-03-29; e-mail: shevelak@mail.ru)

Васильев Игорь Анатольевич – врач-нейрохирург, аспирант ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (г. Новосибирск, тел. раб.: 224-47-13, тел. сот.: 8-960-792-15-78; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Ступак Вячеслав Владимирович – заведующий нейрохирургическим отделением, нейрохирург, врач высшей категории ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России, доктор медицинских наук, профессор (г. Новосибирск; тел. раб.: 224-47-13; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Половников Евгений Владимирович – врач-нейрохирург, аспирант ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (г. Новосибирск; тел. раб.: 224-47-13; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Самохин Александр Геннадьевич – старший научный сотрудник, руководитель функциональной группы экспериментальной хирургии ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России (г. Новосибирск; тел. раб.: 224-45-58; e-mail: asamohin@niito.ru)

Окладников Геннадий Иванович – нейрохирург, отделение нейрохирургии ФГБУ ННИИТО Минздравсоцразвития России, доктор медицинских наук, профессор (г. Новосибирск; тел. раб.: 224-47-13; e-mail: IVasilev@niito.ru)

Морозов Дмитрий Владимирович – врач морфолог МБУЗ Городская клиническая больница № 1, кандидат медицинских наук (e-mail: mdvil07@mail.ru)

Головнев Владимир Андреевич – врач-патоморфолог, доктор медицинских наук, профессор НГМУ (e-mail: IVasilev@niito.ru)

Черных Елена Рэмовна – заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, зам. директора НИИКИ СО РАМН по науке, член-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (г. Новосибирск; тел. раб. 236-03-29; e-mail: ct_lab@mail.ru)

Д.Ю. Шилов², Ю.И. Шилов^{1, 2}ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СОТАЛОЛА ГИДРОХЛОРИДА
ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (Пермь)² Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера (Пермь)

Показано, острый стресс в периоде индукции иммунного ответа на тимусзависимый антиген приводит к угнетению выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа как при локальной, так и при системной его формах, не влияет на антителообразование в регионарном лимфатическом узле при локальном ответе и угнетает антителообразование в селезенке при системном ответе. Введение антагониста бета-адренорецепторов периферического действия соталола гидрохлорида отменяет эти изменения, что указывает на участие в их реализации иммуносупрессивных сигналов с периферических бета-адренорецепторов.

Ключевые слова: стресс, адренорецепторы, иммунный ответ

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF SOTALOL HYDROCHLORIDE UNDER ACUTE STRESS

D.Ju. Shilov², Ju.I. Shilov^{1, 2}¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm² Perm State Medical Academy named after acad. E.A. Wagner, Perm

It was established that acute stress in period induction of the local and systemic immune response to thymus-dependent antigen caused an inhibition of expression of delayed-type hypersensitivity reactions, did not effect on antibody production in the regional lymph node under the local response and suppressed of antibody production in the spleen under the systemic immune response. Administration of sotalol hydrochloride (antagonist of beta-adrenoceptors with peripheral action) canceled these changes, that points to participate in their implementation of immunosuppressive signals from the peripheral beta-adrenergic receptors.

Key words: stress, adrenoceptors, the immune response

Адренергические соединения и глюкокортикоиды, обладая выраженной иммуно-модулирующей активностью, определяют уникальные иммунные сдвиги на местном и системном уровне, связанные с процессами адаптации [1]. В условиях целостного организма катехоламины и глюкокортикоиды проявляют выраженный синергизм, в основе которого могут лежать, с одной стороны, индуцированные глюкокортикоидами изменения экспрессии адренорецепторов и трансдукции с них сигнала в различных клетках-мишенях [2], а с другой — модуляция катехоламинами экспрессии глюкокортикоидных рецепторов [15].

Функциональные последствия реализации взаимодействия глюкокортикоидов и катехоламинов на уровне иммунной системы изучены недостаточно. Показано, что при введении крысам антагониста β-адренорецепторов пропранолола гидрохлорида отменяется супрессивное действие 6-часового иммобилизационного стресса на реакцию гиперчувствительности замедленного типа [12]. Введение крысам или мышам β-адренергических блокаторов значительно нивелирует послеоперационную депрессию цитотоксической активности НК-клеток и снижает усиление метастазирования перевиваемых опухолей после экспериментальных оперативных вмешательств [5, 9]. Введение пропранолола гидрохлорида значительно снижает степень выраженности иммуносупрессивного действия гидрокортизона в периоде индукции и эффекторную фазу локального иммунного

ответа на антителообразование в регионарном лимфатическом узле и развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа, нивелирует индуцированные введением гидрокортизона в эффекторную фазу иммунного ответа изменения функций фагоцитирующих клеток [13]. В связи с тем что пропранолола гидрохлорид может частично проникать через гематоэнцефалический барьер, представлялось целесообразным оценить иммуно-модулирующее действие при стрессе антагониста β-адренорецепторов периферического действия — соталола гидрохлорида.

Цель работы — исследование иммуномодулирующего действия соталола гидрохлорида при остром стрессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования в системе *in vivo* выполнены на 136 половозрелых нелинейных белых крысах-самцах. Содержание, питание, уход за крысами и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с Приказом МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных».

Для оценки иммуномодулирующего действия стресса и фармакологической блокады β-адренорецепторов при развитии локального и системного иммунного ответа использовали сле-

дующую схему эксперимента. У животных 1-й группы моделировали острый стресс 24-часовой иммобилизацией в положении на спине в пластиковых фиксаторах в сочетании с дозированной кровопотерей (забор по 1,5 мл крови из сосудов хвоста до иммобилизации, через 6 и 24 ч от ее начала). Крысам 2-й группы трехкратно с интервалом 12 ч вводили внутривенно антагонист β -адренорецепторов периферического действия соталол гидрохлорид («Sotalex», Bristol-Myers Squibb, Франция) по 5 мг/кг массы тела. Животным 3-й группы на фоне стресса (24-часовая иммобилизация и дозированная кровопотеря) по той же схеме вводили соталол гидрохлорид (1-я инъекция за 30 мин до начала иммобилизации). Крысам 4-й группы (контроль) вводили по той же схеме изотонический раствор NaCl. Сенсибилизацию для индукции локального иммунного ответа, развивающегося преимущественно на территории регионарного лимфатического узла, осуществляли введением 1×10^8 эритроцитов барана (ЭБ) подкожно в подошвенную поверхность правой стопы, а для индукции системного иммунного ответа с вовлечением в антителообразование преимущественно селезенки — внутривенным введением 1×10^7 ЭБ. Антиген в обоих случаях вводили крысам 1-й и 3-й групп сразу после повторного забора крови через 6 ч от начала иммобилизации, а животным 2-й и 4-й групп — через 6,5 ч после первой инъекции соталол гидрохлорида или изотонического раствора NaCl. На 4-е сутки после сенсибилизации всем животным вводили разрешающую дозу антигена (1×10^9 ЭБ подкожно в подошвенную поверхность правой стопы, 0,1 мл изотонического раствора NaCl — левой). При выборе схемы иммунизации учитывали результаты исследования зависимости выраженности гуморального ответа и реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) от дозы и способа введения ЭБ крысам [12, 13]. Для выбора дозы антигена, использовавшейся для сенсибилизации на модели системного иммунного ответа, проведено дополнительное исследование зависимости выраженности гуморального ответа и реакции ГЗТ от дозы антигена при его внутривенном введении. Животным 1-й группы для сенсибилизации при индукции системного иммунного ответа вводили 10^6 ЭБ, а 2-й, 3-й, 4-й и 5-й групп — соответственно 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} ЭБ внутривенно. Через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена (5-е сутки эксперимента) животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Оценивали выраженность воспаления при реакции ГЗТ путем регистрации толщины (инженерным микрометром) опытной и контрольной стопы [12, 13], гуморальный ответ — по числу антителообразующих клеток (АОК) в регионарном (правом подколенном) и отдаленном (левом подколенном) лимфатических узлах, а также селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы в модификации [12, 13] и по уровню антител в плазме крови в реакции активной гемоглютинации [12, 13], число ядросодержащих клеток

(ЯСК) в органах лимфомиелоидного комплекса общепринятым методом. Образцы крови, полученные в динамике эксперимента из сосудов хвоста, использовали для определения числа эритроцитов, уровня гемоглобина гемиглобинцианидным методом, оценки в плазме крови иммуноферментным методом уровней кортикостерона («Correlate-EIA Corticosterone», США) и кортизола (ООО «Хема-Медика», Россия).

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, одно- и двухфакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Дункана для множественного сравнения между группами. Данные по числу АОК с учетом их log-нормального распределения предварительно преобразовывали в значения $\log_{10}$ соответствующих показателей, а уровни антител — в $\log_2$ обратных титров. Результаты в таблицах, на рисунках и в тексте представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Для оценки различий двух попарно связанных выборок использовали вариант *t*-критерия Стьюдента для парных данных. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментальной модели фармакологической блокады β -адренорецепторов при остром 24-часовом иммобилизационном стрессе в сочетании с дозированной кровопотерей при локальном иммунном ответе установлено, что дозированная кровопотеря, использованная для усиления стрессорного воздействия 24-часовой иммобилизации, приводит к снижению количества эритроцитов и уровня гемоглобина в крови. У животных 1-й группы число эритроцитов в исходном фоне составляет $6,98 \pm 0,33$, через 24 ч — $5,63 \pm 0,14$, на 5-е сутки — $5,69 \pm 0,30$ млн. клеток/мкл, а концентрация гемоглобина в исходном фоне — $127,10 \pm 8,65$, через 24 ч — $89,21 \pm 3,52$, на 5-е сутки — $96,46 \pm 3,13$ г/л ($p < 0,05$ к исходному фону в оба срока для обоих показателей по парному критерию Дункана). У крыс 3-й группы число эритроцитов в исходном фоне составляет $7,20 \pm 0,21$, через 24 ч — $5,44 \pm 0,28$, на 5-е сутки — $5,87 \pm 0,396$ млн. клеток/мкл, а концентрация гемоглобина в исходном фоне — $132,46 \pm 8,04$, через 24 ч — $86,93 \pm 5,97$, на 5-е сутки — $99,87 \pm 5,16$ г/л ($p < 0,05$ к исходному фону в оба срока для обоих показателей по тому же критерию). Статистически значимых различий между показателями животных 1-й и 3-й групп не выявлено, что указывает на развитие у них умеренно выраженной постгеморрагической анемии одинаковой степени выраженности, которую можно рассматривать как фактор, усиливающий острое стрессорное воздействие.

Установлено, что уровень кортикостерона значительно увеличивается через 6 и 24 ч от начала иммобилизации у крыс 1-й и 3-й групп, степень выраженности повышения этого гормона у крыс обеих групп статистически значимо не отличается между собой (рис. 1). Особенности экспрессии гена

CYP17A1 определяют различия уровней кортикостерона и кортизола у взрослых грызунов [10]. Хотя изменение уровня кортизола у крыс в классических моделях острого стресса ранее не оценивалось, показано увеличение концентрации этого гормона у крыс при травме спинного мозга [4]. Значительное повышение концентрации кортизола у крыс (до 200 нг/мл), совпадающее с увеличением уровня мРНК 17-гидроксилазы и размеров ретикулярной зоны коры надпочечников, а также концентрации андростендиона и 17-ОН-прогестерона отмечается и на 16–20-й дни постнатального периода и расценивается [10] как проявление адренархе. В связи с тем, что по степени выраженности действия на клетки крыс *in vitro* кортизол намного более активен, чем кортикостерон, нами проведена оценка изменения концентрации и этого гормона. Установлено, что статистически значимое увеличение концентрации кортизола в условиях острого стресса регистрируется только через 24 ч, на фоне блокады β -адренорецепторов при остром стрессе происходит более быстрое увеличение уровня гормона, а на 5-е сутки концентрация кортизола уменьшается до показателей, близких к исходному фону (см. рис. 1).

Развитие иммунного ответа при подкожной иммунизации сопровождается значительным

увеличением клеточности регионарного лимфатического узла в сравнении с отдаленным ($p < 0,05$ внутри каждой из групп при оценке по парному *t*-критерию Стьюдента). Уровень антителообразования в регионарном лимфатическом узле и титр антител в плазме крови крыс на фоне всех экспериментальных воздействий при развитии иммунного ответа в условиях подкожной сенсibilизации существенно не изменяется (табл. 1). Острый стресс приводит к значительной супрессии развития реакции ГЗТ. Введение соталола гидрохлорида животным 3-й группы полностью отменяет стрессорное угнетение реакции ГЗТ, в то время как у нестрессированных крыс 2-й группы препарат не влияет на выраженность воспаления.

Выявленные закономерности подтверждаются при двухфакторном дисперсионном анализе. Так, для показателя разности при реакции ГЗТ выявлен эффект взаимодействия двух факторов «стресс» и «соталол» ($F(1,36) = 9,611$; $p = 0,0037$), что подтверждает их антагонизм. Действие каждого из двух факторов отдельно также статистически значимо ($F(1,36) = 4,571$; $p = 0,0394$ для фактора «стресс»; $F(1,36) = 5,531$; $p = 0,0243$ для фактора «соталол»). В сравнении с ранее опубликованными данными по отмене супрессии реакции ГЗТ пропранолола

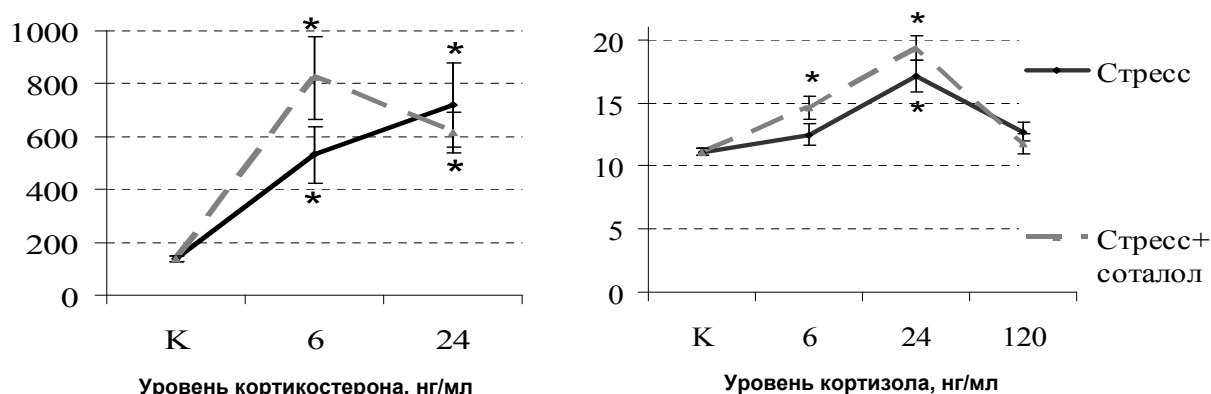


Рис. 1. Изменение концентрации кортикостерона и кортизола в плазме крови крыс при остром стрессе (сплошная линия) и остром стрессе на фоне введения соталола гидрохлорида (пунктирная линия) в периоде индукции локального иммунного ответа. По оси абсцисс: К – объединенный исходный фон; 6, 24 и 120 – время от начала иммобилизации, ч.; * – $p < 0,05$ по критерию Дункана к объединенному исходному фону.

Таблица 1
Влияние острого стресса и блокады β -адренорецепторов соталола гидрохлоридом в периоде индукции локального иммунного ответа на число АОК в регионарном лимфатическом узле, уровень антител в плазме крови и выраженность реакции ГЗТ

Группа	Экспериментальное воздействие	Число АОК в регионарном лимфатическом узле		Уровень антител, $\log_2$ обратных титров	Выраженность реакции ГЗТ	
		на 10^6 ЯСК, $\log_{10}$	на орган, $\log_{10}$		разность, мм	индекс реакции, %
1	Стресс	$2,2229 \pm 0,1328$ (167,09)	$3,5492 \pm 0,1454$ (3541,42)	$2,300 \pm 0,396$	$0,11 \pm 0,04^*$	$2,60 \pm 1,01^*$
2	Соталол	$2,0534 \pm 0,1009$ (113,09)	$3,2841 \pm 0,1239$ (1923,67)	$2,500 \pm 0,269$	$0,32 \pm 0,05^a$	$7,47 \pm 1,24^a$
3	Стресс+ соталол	$2,0192 \pm 0,1316$ (104,51)	$3,2457 \pm 0,1307$ (1760,87)	$2,500 \pm 0,401$	$0,37 \pm 0,06^a$	$8,62 \pm 1,51^a$
4	Введение растворителя (контроль)	$2,3300 \pm 0,0674$ (213,78)	$3,6373 \pm 0,1399$ (4338,22)	$3,200 \pm 0,249$	$0,36 \pm 0,04$	$8,14 \pm 0,86$

Примечание: Число животных в каждой группе равно 10; в скобках – средняя геометрическая числа АОК; * – $p < 0,05$ по критерию Дункана к 4-й группе; а – то же к 1-й группе.

гидрохлоридом в условиях 6-часового иммобилизационного стресса [12], полученные нами результаты, с одной стороны, указывают на то, что блокада β -адренорецепторов способна отменять супрессию реакции ГЗТ и при более тяжелой форме стресса, а с другой — на то, что этот эффект реализуется через периферические β -адренорецепторы, т.к. соталола гидрохлорид не проникает через гематоэнцефалический барьер [11]. С учетом данных литературы [14] о способности β -адренергических агонистов в системе *in vitro* угнетать продукцию IL-18 и зависимых от него цитокинов (IL-12, TNF- α , IFN- γ), играющих ключевую роль в развитии реакций ГЗТ, полученные в настоящей работе результаты подтверждают важное значение в условиях *in vivo* повышения чувствительности иммуноцитов к супрессивному действию эндогенных катехоламинов через β -адренорецепторы при остром стрессе в угнетении реакции ГЗТ.

В экспериментальной модели блокады β -адренорецепторов при остром 24-часовом иммобилизационном стрессе в сочетании с дозированной кровопотерей при системном иммунном ответе, перед проведением основного эксперимента исследована зависимость доза-эффект развития при системном иммунном ответе реакции ГЗТ и антителопродукции при внутрибрюшинной сенсibilизации крыс разными дозами эритроцитов барана (ЭБ). Хотя этот аспект детально изучен для разных линий мышей [6, 7], у крыс подобная зависимость исследована недостаточно. Установлено, что увеличение дозы антигена приводит к повышению числа АОК в селезенке и уровня антител в плазме крови (рис. 2). При сопоставлении с локальным иммунным ответом обращает на себя внимание более высокий уровень абсолютного числа АОК в селезенке при внутрибрюшинной сенсibilизации даже самой низкой из исследованных доз антигена — 10^6 ЭБ (при системном ответе средняя геометрическая числа АОК: $1191,47$; $\log_{10}$ числа АОК: $3,0761 \pm 0,0887$, а при локальной форме у животных контрольной группы — средняя геометрическая числа АОК: $209,47$; $\log_{10}$ числа АОК: $2,3211 \pm 0,2240$; $p = 0,00574$ между группами по непарному *t*-критерию Стьюдента). Тем не менее, за счет антителопродукции в регионарном лимфатическом узле уровень антител при внутрибрюшинной сенсibilизации животных 10^6 ЭБ (см. рис. 2) сопоставим с регистрируемым у крыс контрольной группы при локальном ответе (см. табл. 1; $p > 0,05$ по отношению к системному ответу по *t*-критерию Стьюдента).

Максимальный и одинаковый по степени выраженности уровень реакции ГЗТ отмечен в диапазоне доз антигена: $10^6 - 10^7 - 10^8$ ЭБ. Статистически значимая супрессия реакции ГЗТ регистрируется при сенсibilизации крыс в дозе 10^{10} ЭБ. Развитие супрессии реакции ГЗТ может быть связано с формированием в селезенке клонов Т-лимфоцитов, способных к антигенспецифичной супрессии ГЗТ на территории регионарного лимфатического узла [6, 7], а также со взаимным антагонизмом дифференцировки наивных предшественников

Т-хелперов в зрелые Th1- и Th2-клетки [8]. Важную роль может играть образование индуцибельных Treg-клеток и их взаимодействие с наивными Т-хелперами и с образующимися из них Th9-, Th17-, Tfh-клетками [3], но конкретные механизмы нуждаются в дальнейшем исследовании. С учетом необходимости исследования влияния стресса и соталола гидрохлорида на реакцию ГЗТ выбрана доза антигена для сенсibilизации — 10^7 эритроцитов, при которой, с одной стороны, индуцируется выраженная реакция ГЗТ, а с другой — антителообразование в селезенке со слабой, но постоянной степенью выраженности.

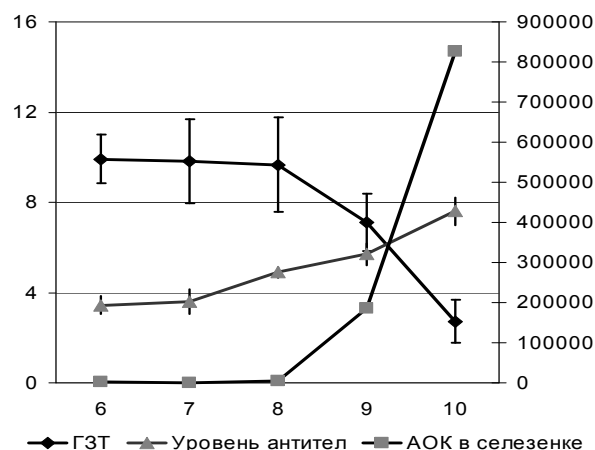


Рис. 2. Зависимость антителообразования и реакции ГЗТ от дозы антигена при сенсibilизации у крыс. По оси абсцисс — доза эритроцитов барана для сенсibilизации ($\log_{10}$ числа эритроцитов на животное); по левой оси ординат — выраженность воспаления при реакции ГЗТ по показателю индекса реакции (%) и уровень антител в плазме крови ($\log_2$ обратного титра антител); по правой оси ординат — средняя геометрическая числа АОК на селезенку ($M \pm m \log_{10}$ числа АОК на селезенку соответственно составили $3,0761 \pm 0,0887$ при введении 10^6 ЭБ; $3,0131 \pm 0,1337$ — 10^7 ЭБ; $3,6871 \pm 0,0547$ — 10^8 ЭБ; $5,2715 \pm 0,1561$ — 10^9 ЭБ; $5,9168 \pm 0,0759$ — 10^{10} ЭБ).

Установлено, что, как и в предшествующей серии экспериментов, дозированная кровопотеря приводит к развитию у животных 1-й и 3-й групп умеренно выраженной постгеморрагической анемии одинаковой степени выраженности (данные не приводятся). Уровни кортикостерона и кортизола в плазме у крыс в условиях острого стресса и при остром стрессе на фоне введения соталола гидрохлорида повышаются через 6 ч и через 24 ч (рис. 3). На 5-е сутки эксперимента уровень кортизола приближается к объединенному исходному фону. При сопоставлении с результатами предшествующей серии экспериментов (см. рис. 1) статистически значимых различий в уровне как кортикостерона, так и кортизола в соответствующие сроки между показателями двух серий эксперимента не выявлено, хотя обращает на себя внимание более раннее (статистически значимое в сравнении с контролем уже через 6 ч) повышение уровня кортизола у крыс 1-й группы (см. рис. 3).

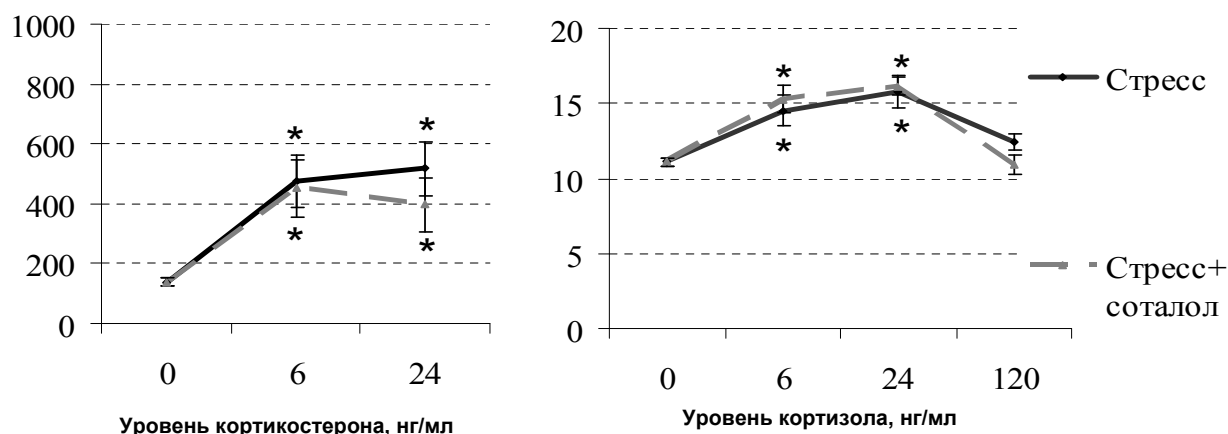


Рис. 3. Изменение концентрации кортикостерона и кортизола в плазме крови крыс при остром стрессе (сплошная линия) и остром стрессе на фоне введения соталолола гидро-хлорида (пунктирная линия) в периоде индукции системного иммунного ответа. По оси абсцисс: К – объединенный исходный фон; 6, 24 и 120 – время от начала иммобилизации, ч.; * – $p < 0,05$ по критерию Дункана к объединенному исходному фону.

Таблица 2
Влияние острого стресса и блокады β -адренорецепторов в периоде индукции системного иммунного ответа на число АОК в селезенке, уровень антител в плазме крови и выраженность реакции ГЗТ

Группа	Экспериментальное воздействие	Число АОК в селезенке		Уровень антител, $\log_2$ обратных титров	Выраженность реакции ГЗТ	
		на 10^6 ЯСК, $\log_{10}$	на орган, $\log_{10}$		разность, мм	индекс реакции, %
1	Стресс	$0,4402 \pm 0,0931$ (0,36)	$2,4458 \pm 0,1077$ (279,16)	$2,200 \pm 0,389^*$	$0,17 \pm 0,03^*$	$3,66 \pm 0,69^*$
2	Соталол	$0,0594 \pm 0,1435$ (1,15) ^a	$2,9521 \pm 0,1499$ (895,60) ^a	$4,500 \pm 0,342^a$	$0,32 \pm 0,04^a$	$6,76 \pm 0,92^a$
3	Стресс + соталол	$0,2988 \pm 0,0954$ (1,99) ^a	$3,2110 \pm 0,0786$ (1625,62) ^a	$4,300 \pm 0,449^a$	$0,40 \pm 0,06^a$	$8,90 \pm 1,36^a$
4	Введение растворителя (контроль)	$0,0255 \pm 0,1377$ (1,06)	$2,9412 \pm 0,1303$ (873,40)	$3,600 \pm 0,499$	$0,53 \pm 0,04$	$11,81 \pm 1,02$

Примечание: число животных в каждой группе равно 10; в скобках – средняя гео-метрическая числа АОК; * – $p < 0,05$ по критерию Дункана к 4-й группе; а – то же к 1-й группе.

Установлено, что острый стресс в периоде индукции системного иммунного ответа приводит к выраженной супрессии антителообразования в селезенке и к снижению уровня антител в крови (табл. 2). Блокада β -адренорецепторов соталолола гидрохлоридом отменяет эти эффекты стресса. Выявленные закономерности подтверждаются при двухфакторном дисперсионном анализе, при котором выявлен эффект взаимодействия двух факторов – «стресс» и «соталол» ($F(1,36) = 8,671$; $p = 0,0056$ для показателя числа АОК на 10^6 ЯСК и $F(1,36) = 9,944$; $p = 0,0033$ для показателя АОК на селезенку). Острый стресс приводит к значительной супрессии развития реакции ГЗТ у крыс 1-й группы (см. табл. 2). При введении только соталолола гидрохлорида крысам 2-й группы отмечено менее выраженное, но статистически значимое угнетение реакции ГЗТ. Введение соталолола гидрохлорида животным 3-й группы приводит к повышению степени выраженности реакции ГЗТ до уровня контроля, т.е. при совместном действии двух экспериментальных факторов – стресса и блокатора β -адренорецепторов – отмечается их выраженный антагонизм, подтверждаемый и двухфакторным дисперсионным анализом, при котором выявлен статистически значимый эффект

взаимодействия двух факторов – «стресс» и «соталол» ($F(1,36) = 23,337$; $p = 0,0000$ для показателя разности; $F(1,36) = 24,675$; $p = 0,0000$ для показателя индекса реакции).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях экспериментального моделирования общего адаптационного синдрома и блокады периферических β -адренорецепторов *in vivo* обоснована роль адренергической регуляции в изменении функций клеток иммунной системы при стрессе. Установлено, что введение антагониста β -адренорецепторов периферического действия соталолола гидрохлорида при остром стрессе (24-часовая иммобилизация в сочетании с дозированной кровопотерей) приводит к отмене супрессии антителогенеза в селезенке при системном иммунном ответе и угнетения реакции гиперчувствительности замедленного типа при моделировании локальной и системной форм иммунного ответа. Острый стресс и соталолола гидрохлорид не влияют на антителообразование в регионарном лимфатическом узле при локальном иммунном ответе.

Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-00424-а, 08-04-00517-а и 10-04-96092-р-Урал-а, программами Президиума РАН «Молекулярная и

клеточная биология» и «Фундаментальные науки — медицине».

ЛИТЕРАТУРА

1. Besedovsky H.O., del Rey A. Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view // *Brain Behav. Immun.* — 2007. — Vol. 21, N 1. — P. 34–44.
2. Black J.L., Oliver B.G., Roth M. Molecular mechanisms of combination therapy with inhaled corticosteroids and long-acting beta-agonists // *Chest.* — 2009. — Vol. 136, N 4. — P. 1095–1100.
3. Corthay A. How do regulatory T cells work? // *Scand. J. Immunol.* — 2009. — Vol. 70, N 4. — P. 326–336.
4. Gezici A.R., Karakas A., Ergün R., Gündüz B. Serum cortisol levels following acute experimental spinal cord injury // *Neurol. Neurochir. Pol.* — 2009. — Vol. 43, N 4. — P. 352–357.
5. Glasner A., Avraham R., Rosenne E. Improving survival rates in two models of spontaneous postoperative metastasis in mice by combined administration of a β -adrenergic antagonist and a cyclooxygenase-2 inhibitor // *J. Immunol.* — 2010. — Vol. 184, N 5. — P. 2449–2457.
6. Gusev E.Yu., Kevorkov N.N. Characteristics of T-suppressors responsible for cellular and humoral immune response competition in the spleen // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* — 1993. — Vol. 115, N 3. — P. 312–314.
7. Gusev E.Yu., Kevorkov N.N. Genetic and phenotypic aspects of the interrelationship between cellular and humoral immune response to sheep erythrocytes in mice // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* — 1993. — Vol. 115, N 3. — P. 315–316.
8. Liew F.Y. T_H1 and T_H2 cells: a historical perspective // *Nat. Rev. Immunol.* — 2002. — Vol. 2, N 1. — P. 55–60.

9. Melamed R., Rosenne E., Shakh K. Marginating pulmonary-NK activity and resistance to experimental tumor metastasis: suppression by surgery and the prophylactic use of a β -adrenergic antagonist and a prostaglandin synthesis inhibitor // *Brain Behav. Immun.* — 2005. — Vol. 19, N 2. — P. 114–126.

10. Pignatelli D., Xiao F., Gouveia A.M. Adrenarche in the rat // *J. Endocrinol.* — 2006. — Vol. 191, N 1. — P. 301–308.

11. Schneider A.M., Koven N.S., Lombardo K.A. Beta-adrenergic receptor blockade by propranolol enhances retention in a multitrial passive-avoidance procedure // *Behav. Neurosci.* — 2000. — Vol. 114, N 6. — P. 1256–1260.

12. Shilov Ju.I., Gein S.V., Chereshev V.A. Influence of blockade of β -adrenoreceptors and acute stress on antibody formation, delayed type of hypersensitivity, phagocytic cell activity in local immune response // *Rus. J. Immunol.* — 2001. — Vol. 6, N 3. — P. 301–308.

13. Shilov Ju.I., Lanin D.V., Shilov S.Ju. et al. Influence of beta-adrenergic receptor blockade on immunomodulatory effects of hydrocortisone // *New Research on Immunology* / ed. by Barbara A. Veskler / Nova Biomedical Books. — New York, Inc., 2005. — P. 167–191.

14. Takahashi H.K., Morichika T., Iwagaki H. Effect of β_2 -adrenergic receptor stimulation on interleukin-18-induced intercellular adhesion molecule-1 expression and cytokine production // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* — 2003. — Vol. 304, N 2. — P. 634–642.

15. Warner A., Ovadia H., Tarcic N., Weidenfeld J. The effect of restraint stress on glucocorticoid receptors in mouse spleen lymphocytes: involvement of the sympathetic nervous system // *Neuroimmunomodulation.* — 2010. — Vol. 17, N 5. — P. 298–304.

Сведения об авторах

Шилов Дмитрий Юрьевич — ассистент кафедры иммунологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития РФ (614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26)
Шилов Юрий Иванович — ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУ Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, доцент кафедры иммунологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, кандидат медицинских наук, доцент (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, ИЗГМ УрО РАН; тел.: (342) 2807442; факс: (342) 2809211; e-mail: jshilov@mail.ru)

С.Ю. Шилов, Ю.И. Шилов

ВЛИЯНИЕ ГИДРОКОРТИЗОНА И БЛОКАДЫ БЕТА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В ЭФФЕКТОРНУЮ ФАЗУ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК РЕГИОНАРНОГО ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА, МОНОЦИТОВ КРОВИ И ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (Пермь)

Установлено, что гидрокортизон снижает фагоцитарную активность клеток регионарного лимфатического узла и перитонеальных мононуклеарных фагоцитов, но не влияет на относительные показатели фагоцитарной активности моноцитов периферической крови в эффекторную фазу иммунного ответа у крыс. Эффекты гидрокортизона значительно модифицируются при введении антагониста бета-адренорецепторов пропранолола гидрохлорида.

Ключевые слова: бета-адренергические рецепторы, гидрокортизон, пропранолола гидрохлорид, фагоцитоз, иммунный ответ

INFLUENCE OF HYDROCORTISONE AND BETA-ADRENERGIC RECEPTOR BLOCKADE IN EFFECTOR PHASE OF THE IMMUNE RESPONSE ON PHAGOCYTIC ACTIVITY OF REGIONAL LYMPH NODE CELLS, BLOOD MONOCYTES AND PERITONEAL MACROPHAGES

S.Ju. Shilov, Ju.I. Shilov

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm

It was established that hydrocortisone reduces the phagocytic activity of regional lymph node cells and peritoneal mononuclear phagocytes, but does not affect the relative parameters of the phagocytic activity of peripheral blood monocytes in the effector phase of immune response in rats. Effects of hydrocortisone were significantly modified by the administration of beta-adrenoceptor antagonist propranolol hydrochloride.

Key words: beta-adrenergic receptors, hydrocortisone, phagocytosis, propranolol hydrochloride, immune response

Адренергические соединения и глюкокортикоиды играют ключевую роль в нейроэндокринной модуляции функций иммунной системы [2, 6]. Регулируя контактные и дистантные межклеточные взаимодействия, глюкокортикоиды и адренергические соединения часто выступают как синергисты в регуляции функций иммунной системы, в частности, они оказывают однонаправленный эффект на продукцию интерлейкина-12, интерферона- γ и ряда других цитокинов, переключают цитокиновый профиль с Th1 на Th2 тип [3]. Показано, что в основе синергического взаимодействия с катехоламинами могут лежать индуцированные глюкокортикоидами изменения экспрессии адренорецепторов и трансдукции с них сигнала в различных клетках-мишенях [14]. В клетках гладкой мускулатуры, фибробластах, нейронах доказана возможность модуляции катехоламинами действия глюкокортикоидов на уровне трансактивации внутриклеточных гормонсвязывающих рецепторов [1, 11].

Функциональные последствия реализации взаимодействия эффектов глюкокортикоидов и катехоламинов на уровне иммунной системы изучены недостаточно. Показано, что в условиях блокады бета-адренорецепторов развивается выраженная активация функций циркулирующего пула фагоцитирующих клеток [13]. Иммуномодулирующее действие гидрокортизона на функции фагоцитирующих клеток брюшной полости и периферической крови неиммунизированных крыс существенно

модифицируется в условиях блокады бета-адренорецепторов [12]. Ранее нами показано, что введение пропранолола гидрохлорида значительно снижает степень выраженности иммуносупрессивного действия гидрокортизона в периоде индукции и эффекторную фазу локального иммунного ответа на антителообразование в регионарном лимфатическом узле и развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа [12]. Учитывая важную роль мононуклеарных фагоцитов как вторичных эффекторов иммунного ответа, представлялось целесообразным оценить изменения их фагоцитарной активности в эффекторную фазу локального иммунного ответа.

Цель работы — исследование влияния гидрокортизона и блокады бета-адренорецепторов в эффекторную фазу иммунного ответа на фагоцитарную активность клеток регионарного лимфатического узла, моноцитов крови и перитонеальных макрофагов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент *in vivo* выполнен на 43 крысах-самцах популяции Wistar средней массой 235 г. Содержание, питание, уход за крысами и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с Приказом МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 г. «О контроле за проведением работ с

использованием экспериментальных животных». Для индукции иммунного ответа всех животных сенсibilизировали эритроцитами барана (2×10^9 клеток подкожно в подошвенную поверхность правой стопы). На 4-е сутки после сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена (2×10^9 эритроцитов подкожно в подошвенную поверхность правой стопы, 0,1 мл изотонического раствора NaCl — левой контрольной стопы). Для оценки иммуномодулирующего действия гидрокортизона в условиях блокады бета-адренорецепторов в эффекторную фазу локального иммунного ответа животным 1-й группы вводили однократно внутрибрюшинно гидрокортизона ацетат («ИмБио», Россия) в дозе 50 мг/кг массы тела. Крысам 2-й группы вводили пропранолола гидрохлорид («Обзидан», ISIS PHARMA GmbH, Германия, 4 инъекции по 5 мг/кг массы тела подкожно с интервалом 3 ч). Крысам 3-й группы вводили гидрокортизон на фоне блокады бета-адренорецепторов пропранолола гидрохлоридом по вышеприведенным схемам (1-я инъекция пропранолола — за 30 мин до введения гидрокортизона). Крысы 4-й группы не получали препаратов. Препараты вводили на 4-е сутки иммунного ответа (гидрокортизон — за 3 ч до введения разрешающей дозы эритроцитов барана, 1-я инъекция пропранолола — за 30 мин до введения гидрокортизона). Выбор доз и схем введения препаратов основывался на ранее проведенных исследованиях [12]. Через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена (5-е сутки эксперимента) животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом, оценивали фагоцитарную активность клеток регионарного лимфатического узла, клеток перитонеального смыва и лейкоцитов периферической крови по отношению к формализованным эритроцитам барана.

Для оценки фагоцитарной активности лейкоцитов в пластиковые микропробирки (завод «Медполимер», Санкт-Петербург) вносили 25 мкл гепаринизированной крови и 25 мкл суспензии формализованных эритроцитов барана (ФЭБ, 100×10^6 клеток/мл) на забуференной среде (ЗС, среда 199 с добавлением 10 мМ HEPES и 2 мМ L-глутамин). Пробы инкубировали 20 мин при 37 °С. Результаты оценивали микроскопически по ранее описанным показателям [13]. Для оценки фагоцитарной активности клеток лимфатического узла и перитонеального смыва, использовали ранее описанный метод [12]. В микропробирках (АО «Медполимер», Санкт-Петербург) смешивали 20 мкл суспензии клеток (10×10^6 ЯСК/мл) перитонеального смыва или подколенных лимфатических узлов, 40 мкл ФЭБ (100×10^6 эритроцитов/мл на ЗС) и 20 мкл аутоплазмы. Пробы инкубировали 20 мин при 37 °С. Результаты оценивали микроскопически на препаратах, окрашенных по Романовскому.

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и апостериорного критерия Дункана (post-hoc Duncan's test) для множественного сравнения между группами. Результаты в большинстве таблиц

и рисунков представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что введение гидрокортизона в эффекторную фазу локального иммунного ответа приводит к значительному снижению относительных и абсолютных показателей фагоцитарной активности мононуклеарных клеток регионарного лимфатического узла (табл. 1). В условиях блокады бета-адренорецепторов индуцированное введение гидрокортизона снижает относительных показателей фагоцитарной активности клеток регионарного лимфатического узла отменяется. Однако в абсолютном выражении показатели фагоцитарной активности клеток остаются сниженными, вследствие уменьшения суммарного абсолютного количества мононуклеарных фагоцитов (табл. 1). Не исключено, что сохранение снижения абсолютных параметров фагоцитоза в регионарном лимфатическом узле в сочетании с восстановлением до уровня контроля относительных показателей при совместном введении пропранолола гидрохлорида и гидрокортизона связано, с одной стороны, с независимостью от функциональной экспрессии бета-адренорецепторов эффектов глюкокортикоидов на процессы рекрутирования в этом органе мононуклеарных фагоцитов. С другой стороны, отмена иммуносупрессивного эффекта гормона на фагоцитарную активность клеток регионарного лимфатического узла по относительным показателям при введении пропранолола гидрохлорида указывает на важный вклад индуцированного гидрокортизоном изменения экспрессии бета-адренорецепторов и/или трансдукции с них сигнала в регуляцию фагоцитарной активности на уровне отдельной клетки. Введение одного пропранолола гидрохлорида не приводит к статистически значимым изменениям относительных и абсолютных параметров фагоцитоза, а также суммарного числа мононуклеарных фагоцитов в регионарном лимфатическом узле (табл. 1). Таким образом, экспериментальная блокада бета-адренорецепторов отменяет супрессивное действие гидрокортизона в условиях его введения в эффекторную фазу локального иммунного ответа на фагоцитарную активность клеток регионарного лимфатического узла по относительным параметрам, не отменяя снижение их общего количества в этом органе и абсолютных показателей фагоцитоза.

Установлено, что выраженные изменения относительных показателей фагоцитарной активности моноцитов периферической крови при введении одного гидрокортизона и в комбинации с бета-блокатором пропранололом в сравнении с контролем отсутствуют (табл. 2). Общее количество моноцитов в крови при введении только одного гидрокортизона увеличивается и сопровождается статистически значимым повышением абсолютного числа моноцитов, не участвующих в фагоцитозе (табл. 2). Этот эффект отменяется при блокаде

Таблица 1
Влияние гидрокортизона, пропранолола и гидрокортизона на фоне блокады бета-адренорецепторов в эффекторную фазу локального иммунного ответа на относительные и абсолютные показатели суммарной фагоцитарной активности клеток регионарного лимфатического узла

Группа	Экспериментальное воздействие	Число животных	Относительное число участвующих в фагоцитозе клеток, %	Относительное число объектов фагоцитоза, захваченных одним фагоцитом	Абсолютное число участвующих в фагоцитозе клеток, $\times 10^6$	Абсолютное число захваченных объектов фагоцитоза, $\times 10^6$	Абсолютное число всех мононуклеарных фагоцитов, $\times 10^6$
1	Гидрокортизон	11	$31,27 \pm 2,82^*$	$0,44 \pm 0,05^*$	$1,526 \pm 0,232^*$	$2,108 \pm 0,332^*$	$4,78 \pm 0,65^*$
2	Пропранолол	11	$56,30 \pm 3,93$	$0,90 \pm 0,13$	$5,228 \pm 0,850$	$8,919 \pm 2,102$	$8,90 \pm 1,15$
3	Гидрокортизон+пропранолол	12	$47,17 \pm 3,86^a$	$0,70 \pm 0,07^a$	$1,985 \pm 0,419^{a,6}$	$2,999 \pm 0,710^{a,6}$	$4,08 \pm 0,67^{a,6}$
4	Без введения препаратов	9	$51,44 \pm 3,06$	$0,75 \pm 0,09$	$5,188 \pm 0,913$	$7,898 \pm 1,869$	$9,96 \pm 1,53$

Примечание: * – $p < 0,05$ по критерию Дункана по отношению к животным 4-й группы; ^a – то же между 3-й и 1-й группами; ⁶ – то же между 3-й и 2-й группами. Все абсолютные показатели представлены из расчета на весь лимфатический узел.

Таблица 2
Влияние гидрокортизона, пропранолола и гидрокортизона на фоне блокады бета-адренорецепторов в эффекторную фазу локального иммунного ответа на относительные и абсолютные показатели фагоцитарной активности моноцитов периферической крови

Группа	Экспериментальное воздействие	Число животных	Относительное число участвующих в фагоцитозе клеток, %	Относительное число объектов фагоцитоза, захваченных одним фагоцитом	Абсолютное число участвующих в фагоцитозе клеток	Абсолютное число захваченных объектов фагоцитоза	Абсолютное число не участвующих в фагоцитозе клеток	Абсолютное число всех моноцитов
1	Гидрокортизон	11	$42,45 \pm 4,95$	$0,61 \pm 0,08$	$758,2 \pm 186,6$	$1126,7 \pm 288,9$	$1068,5 \pm 306,3^*$	$1827 \pm 435^*$
2	Пропранолол	11	$57,94 \pm 4,37$	$1,10 \pm 0,17$	$489,4 \pm 85,9$	$943,1 \pm 215,0$	$387,3 \pm 90,5$	857 ± 164
3	Гидрокортизон+пропранолол	12	$44,31 \pm 5,86$	$0,63 \pm 0,12^6$	$384,6 \pm 80,9$	$525,5 \pm 108,9$	$491,0 \pm 108,2^a$	876 ± 156^a
4	Без введения препаратов	9	$53,78 \pm 9,69$	$0,85 \pm 0,16$	$422,0 \pm 102,8$	$665,5 \pm 161,5$	$387,1 \pm 94,7$	809 ± 119

Примечание: * – $p < 0,05$ по критерию Дункана по отношению к животным 4-й группы; ^a – то же между 3-й и 1-й группами; ⁶ – то же между 3-й и 2-й группами. Все абсолютные показатели представлены из расчета на 1 мкл крови.

Таблица 3
Влияние гидрокортизона, пропранолола и гидрокортизона на фоне блокады бета-адренорецепторов в эффекторную фазу локального иммунного ответа на относительные и абсолютные показатели фагоцитарной активности перитонеальных мононуклеарных фагоцитов

Группа	Экспериментальное воздействие	Число животных	Относительное число участвующих в фагоцитозе клеток, %	Относительное число объектов фагоцитоза, захваченных одним фагоцитом	Абсолютное число участвующих в фагоцитозе клеток, $\times 10^6$	Абсолютное число захваченных объектов фагоцитоза, $\times 10^6$	Абсолютное число всех мононуклеарных фагоцитов, $\times 10^6$
1	Гидрокортизон	11	$63,75 \pm 3,65^*$	$1,48 \pm 0,13^*$	$7,437 \pm 0,987^*$	$17,735 \pm 2,978^*$	$11,656 \pm 1,540^*$
2	Пропранолол	11	$79,37 \pm 2,76$	$2,09 \pm 0,31$	$21,744 \pm 3,102$	$57,755 \pm 12,061$	$27,352 \pm 3,811$
3	Гидрокортизон + пропранолол	12	$78,75 \pm 1,93^a$	$2,22 \pm 0,15^a$	$17,571 \pm 3,146^a$	$47,239 \pm 8,338^a$	$22,418 \pm 4,004^a$
4	Без введения препаратов	9	$83,87 \pm 2,66$	$2,25 \pm 0,31$	$17,789 \pm 2,844$	$43,654 \pm 4,968$	$21,687 \pm 3,867$

Примечание: * – $p < 0,05$ по критерию Дункана по отношению к животным 4-й группы; ^a – то же между 3-й и 1-й группами; ⁶ – то же между 3-й и 2-й группами. Все абсолютные показатели представлены из расчета на всю брюшную полость.

бета-адренорецепторов. Таким образом, влияние гидрокортизона на фагоцитарную активность моноцитов периферической крови минимально, хотя, гормон оказывает выраженное супрессивное действие на фагоцитарную активность их более зрелых потомков - мононуклеарных фагоцитов регионарного лимфатического узла.

Исследование клеточного состава брюшной полости при введении гидрокортизона в эффекторную фазу иммунного ответа показывает, что гормон значительно снижает абсолютное количество перитонеальных мононуклеарных фагоцитов (табл. 3). Введение одного пропранолола гидрохлорида не влияет на вышеуказанные показатели. При введении гидрокортизона на фоне блокады бета-адренорецепторов выявляется полная отмена действия гормона на количество мононуклеарных фагоцитов. При введении одного гидрокортизона наблюдается значительное снижение интегральных относительных и абсолютных показателей фагоцитарной активности перитонеальных мононуклеарных фагоцитов, статистически значимо отменяющееся при введении пропранолола гидрохлорида (табл. 3). Полученные результаты указывают на то, что супрессивное действие гидрокортизона на поглотительную активность мононуклеарных фагоцитов, по-видимому, обусловлено глюкокортикоид-индуцированным повышением функциональной экспрессии бета-адренорецепторов и супрессивным действием через них эндогенных катехоламинов, поскольку фармакологическая блокада этих рецепторов отменяет эффекты гормона, существенно не влияя на показатели фагоцитоза у животных, не получавших гормон (табл. 3). Через этот механизм, по-видимому, реализуется как непосредственное угнетение поглотительной активности перитонеальных мононуклеарных фагоцитов, о чем свидетельствует отмена пропранололом депрессии относительных показателей, так и снижение их количества, возможно, связанное с угнетением эмиграции из кровяного русла моноцитов, на что указывают данные литературы [5, 15], а также выявленное в настоящей работе параллельное увеличение количества моноцитов в периферической крови. Известно, что глюкокортикоиды регулируют взаимодействие моноцитов с эндотелием посткапиллярных венул, модулируя на генетическом уровне при участии ядерных транскрипционных факторов AP-1 и NF-κB экспрессию молекул клеточной адгезии, хемокинов и провоспалительных цитокинов [9, 10].

Важно подчеркнуть, что полученные в настоящей работе результаты указывают на выраженные отличия действия гидрокортизона, пропранолола и их комбинации на фагоцитарную активность моноцитов периферической крови и их потомков — перитонеальных мононуклеарных фагоцитов и фагоцитирующих клеток регионарного лимфатического узла. Наименее значительные изменения выявлены при исследовании фагоцитарной активности моноцитов периферической крови. На уровне регионарного лимфатического

узла гидрокортизон угнетает фагоцитоз. Блокада бета-адренорецепторов отменяет этот эффект по относительным параметрам, но вследствие сохраняющегося снижения общего количества клеток не влияет на выраженность индуцированного гормоном снижения абсолютных показателей фагоцитоза. В брюшной полости гидрокортизон как снижает количество мононуклеарных фагоцитов, так и оказывает значительный супрессивный эффект на их поглотительную активность. Эти эффекты гормона практически полностью отменяются при блокаде бета-адренорецепторов.

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что в последние годы существенно изменились представления о путях активации клеток системы мононуклеарных фагоцитов и направлениях их дифференцировки, которые во многом определяются природой активирующих сигналов и цитокиновым микроокружением. Наряду с классическим описаны альтернативный и тип II активации макрофагов [7]. Глюкокортикоиды и IL-4 — важнейшие индукторы альтернативного типа активации макрофагов. Моноциты периферической крови — гетерогенная популяция клеток. При исследовании с использованием адоптивной системы переноса на мышах процессов моноцитарного хоминга и дифференцировки *in vivo* выявлено две субпопуляции моноцитов периферической крови. Моноциты первой субпопуляции с фенотипом CX(3)CR1^{low}CCR2⁺Gr1⁺ активно рекрутировались в зоны воспаления, а второй — с фенотипом CX(3)CR1^{hi}CCR2⁺Gr1⁺ — в невоспаленную ткань. Обе субпопуляции были способны к дифференцировке в дендритные клетки *in vivo*. По уровню экспрессии CX(3)CR1 также охарактеризованы две субпопуляции человеческих моноцитов: CD14⁺CD16⁺ и CD14^{low}CD16⁺ моноциты со сходным с мышиными моноцитами фенотипом и способностью к хомингу [4]. Рассмотренные выше данные указывают на различия свойств потомков моноцитов крови в зоне развития иммунного ответа (регионарный лимфатический узел) и в зоне, не вовлеченной в него (брюшная полость). Как указывалось выше, в нашем эксперименте блокада бета-адренорецепторов не отменяет индуцированное гидрокортизоном снижение числа мононуклеарных фагоцитов в регионарном лимфатическом узле, но полностью восстанавливает число перитонеальных мононуклеарных фагоцитов.

В системе *in vitro* показано, что дексаметазон в комбинации с 1α, 25-дигидрооксивитамином D₃ усиливает дифференцировку незрелых человеческих дендритных клеток моноцитарного происхождения в дендритные клетки, способные секретировать IL-10 и обладающие выраженной супрессивной активностью по отношению пролиферативному Т-клеточному ответу в смешанной культуре лимфоцитов [8].

В целом полученные результаты указывают на важную роль адренергической регуляции в модуляции функций мононуклеарных фагоцитов глюкокортикоидами, реализующуюся через

повышение этими гормонами чувствительности клеток к эндогенным катехоламинам, связанное с описанным в литературе повышением экспрессии бета-адренорецепторов и/или трансдукции с них сигнала в различных клетках-мишенях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что гидрокортизон снижает фагоцитарную активность клеток регионарного лимфатического узла и перитонеальных мононуклеарных фагоцитов, но не влияет на относительные показатели фагоцитарной активности моноцитов периферической крови в эффекторную фазу иммунного ответа у крыс. Эффекты гидрокортизона значительно модифицируются при введении антагониста бета-адренорецепторов пропранолола гидрохлорида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson G.P. Interactions between corticosteroids and beta-adrenergic agonists in asthma disease induction, progression, and exacerbation // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2000. — Vol. 161 (Iss. 3, Suppl. S). — P. S188–S196.
2. Besedovsky H.O., del Rey A. Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view // *Brain Behav. Immun.* — 2007. — Vol. 21 (1). — P. 34–44.
3. Elenkov I.J. Neuroendocrine control of Th1 and Th2 responses: Clinical implications // *Immunendocrinology in Health and Disease* / Ed. by Geenen V., Chrousos V.P. / Informa Healthcare — New York: Marcel Dekker, Inc., 2004. — P. 647–672.
4. Geissmann F., Jung S., Littman D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties // *Immunity.* — 2003. — Vol. 19 (1). — P. 71–82.
5. Kamal A.M., Flower R.J., Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* — 2005. — Vol. 100(Suppl. I). — P. 39–47.
6. McEwen B.S., Biron C.A., Brunson K.W. et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune

function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions // *Brain Res. Rev.* — 1997. — Vol. 23 (1–2). — P. 79–133.

7. Mosser D.M. The many faces of macrophage activation // *J. Leukoc. Biol.* — 2003. — Vol. 73 (2). — P. 209–212.

8. Pedersen A.E., Gada M., Walter M.R., Claesson M.H. Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ // *Immunol. Lett.* — 2004. — Vol. 91 (1). — P. 63–69.

9. Pitzalis C., Pipitone N., Perretti M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2002. — Vol. 966 (1). — P. 108–118.

10. Rhen T., Cidlowski J.A. Antiinflammatory action of glucocorticoids — new mechanisms for old drugs // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353 (16). — P. 1711–1723.

11. Schmidt P., Holsboer F., Spengler D. β_2 -Adrenergic receptors potentiate glucocorticoid receptor transactivation via G protein $\beta\gamma$ -subunits and the phosphoinositide 3-kinase pathway // *Mol. Endocrinol.* — 2001. — Vol. 15 (4). — P. 553–564.

12. Shilov Ju.I., Lanin D.V., Shilov S.Ju., Orlova E.G. Influence of beta-adrenergic receptor blockade on immunomodulatory effects of hydrocortisone // *New Research on Immunology* / Ed. by Barbara A. Veskler / Nova Biomedical Books. — New York: Nova Science Publishers, Inc., 2005. — P. 167–191.

13. Shilov Ju.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response // *Immunol. Lett.* — 2003. — Vol. 86 (3). — P. 229–233.

14. Taylor D.R., Hancox R.J. Interactions between corticosteroids and beta agonists // *Thorax.* — 2000. — Vol. 55 (7). — P. 595–602.

15. Tommasini I., Cantoni O. Dexamethasone promotes toxicity in U937 cells exposed to otherwise nontoxic concentrations of peroxynitrite: pivotal role for lipocortin 1-mediated inhibition of cytosolic phospholipase A2 // *Mol. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 65(4). — P. 964–972.

Сведения об авторах

Шилов Станислав Юрьевич — младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; тел.: (342) 2807442; факс: (342) 2809211; e-mail: stshilov@mail.ru)
Шилов Юрий Иванович — к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; тел.: (342) 2807442; факс: (342) 2809211; e-mail: jshilov@mail.ru)

Ю.И. Шилов^{1, 2}, А.П. Годовалов²**АДРЕНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ У КРЫС**¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (Пермь)² Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера (Пермь)

Показано, что при экспериментальном тиреотоксикозе разной степени тяжести у крыс развиваются противоположные изменения антителообразования и реакции гиперчувствительности замедленного типа при локальном иммунном ответе на тимусзависимый антиген — стимуляция при более легкой форме тиреотоксикоза и угнетение при более тяжелой. В механизме иммуносупрессии при тяжелой форме тиреотоксикоза может принимать участие повышение уровня глюкокортикоидов. При введении агониста или антагониста бета-адренорецепторов животным с тиреотоксикозом изменения показателей иммунного ответа существенно модифицируются, что подтверждает участие повышения чувствительности клеток иммунной системы к бета-адренергической регуляции в иммуномодуляции при тиреотоксикозе.

Ключевые слова: экспериментальный тиреотоксикоз, адренорецепторы, иммунный ответ

**ADRENERGIC REGULATION OF IMMUNE RESPONSE UNDER EXPERIMENTAL
THYROTOXICOSIS IN RATS**Ju.I. Shilov^{1, 2}, A.P. Godovalov²¹ Institute of Ecology AND Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm² Perm State Medical Academy named after acad. E.A. Wagner, Perm

It was established that a changes of antibody production and reaction of delayed-type hypersensitivity at the local immune response to thymus-dependent antigen were opposite in rats with varying severity of experimental thyrotoxicosis — stimulation under a mild form of thyrotoxicosis and depression under more severe form. The increase in glucocorticoid level may be involved in the mechanism of immunosuppression under severe form thyrotoxicosis. The administration of agonist or antagonist of beta-adrenoceptors to animals with thyrotoxicosis led to the significant modification of changes of an immune response parameters, that confirms the participation of an increase in the sensitivity to beta-adrenergic regulation of immune system cells in immunomodulation under thyrotoxicosis.

Key words: experimental thyrotoxicosis, adrenoceptors, the immune response

Тиреоидные гормоны и адренергические соединения играют важную роль в нейроэндокринной регуляции функций иммунной системы в норме и при различных патологических состояниях [9, 14]. Участие тиреоидных гормонов в формировании иммунной системы в онтогенезе продемонстрировано еще в 70–80-х гг. в условиях экспериментального гипотиреоза [8], а в последующем выявлено нарушение развития клеток иммунной системы у мышей с дефектами генов, кодирующих разные изоформы тиреоидных рецепторов [3, 7]. Отечественными авторами изучены механизмы влияния тиреоидных гормонов на иммунный ответ, кооперацию Т- и В-лимфоцитов, формирование основных субпопуляций Т-лимфоцитов, процессы антигеннезависимого созревания Т- и В-клеток в условиях экспериментального тиреотоксикоза разной степени тяжести [1, 4, 5]. Показано, что введение трийодтиронина усиливает экспорт Т-лимфоцитов из тимуса в лимфатические узлы и способствует перераспределению ранних тимических эмигрантов между лимфатическими узлами и селезенкой [12].

Известно, что тиреоидные гормоны повышают экспрессию бета-адренорецепторов и/или внутриклеточную трансдукцию с них сигнала в клетках-мишенях различных органов [11, 13]. Показано,

что при экспериментальном тиреотоксикозе существенно модифицируется направленность действия адреналина на функции фагоцитирующих клеток, что указывает на вовлеченность адренергических механизмов в иммуномодулирующее действие тироксина [2]. Однако участие адренергических механизмов в реализации иммуномодулирующих эффектов тиреоидных гормонов изучено недостаточно.

Цель работы — исследование адренергической регуляции иммунного ответа при экспериментальном тиреотоксикозе у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования в системе *in vivo* выполнены на 133 белых нелинейных крысах-самцах средней массой 314 г. Содержание, питание, уход за крысами и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с Приказом МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных». Экспериментальный тиреотоксикоз разной степени выраженности моделировали 14-дневным введением животным L-тироксина

(Reanal, Венгрия) в суточных дозах 0,04, 4 и 40 мг/кг. При выборе доз опирались на ранее проведенные исследования на мышах [1, 4, 5]. На основании проведенного анализа степени тяжести тиреотоксикоза для последующих экспериментов выбраны 2 дозы: 0,04 и 4 мг/кг массы тела. Участие бета-адренорецепторов в иммуномодуляции при тиреотоксикозе исследовали в условиях применения агониста и антагониста этих рецепторов на фоне тиреотоксикоза. В качестве агониста бета-адренорецепторов пролонгированного действия с более выраженным эффектом на бета₂-адренорецепторы использовали гексопреналина сульфат («гинипрал®», Nyscomed, Австрия). Для фармакологической блокады бета-адренорецепторов использовали неселективный антагонист бета₁- и бета₂-адренорецепторов периферического действия соталола гидрохлорид («Sotalex», Bristol-Myers Squibb, Франция). У животных 1 – 3-й групп моделировали экспериментальный тиреотоксикоз (натриевую соль L-тироксина вводили в суточной дозе 0,04 или 4 мг/кг массы тела подкожно ежедневно в течение 14 дней). Крысам 1-й группы вводили только тироксин. Крысам 2-й группы помимо тироксина вводили гексопреналина сульфат ежедневно внутривентрально в течение 14 дней в суточной дозе 0,001 мг/кг массы тела. Животным 3-й группы на фоне введения тироксина вводили соталола гидрохлорид внутривентрально 2 раза в день по 5 мг/кг массы тела. Крысам 4-й группы вводили только гексопреналина сульфат, а 5-й – только соталола гидрохлорид по вышеописанным схемам. Животным 6-й (контрольной) группы вводили растворитель препаратов (изотонический раствор NaCl). Для индукции иммунного ответа всех животных сенсибилизировали эритроцитами барана (1×10^8 клеток вводили подкожно в подошвенную поверхность правой стопы) через 10 дней от начала эксперимента. На 4-е сутки после сенсибилизации вводили разрешающую дозу антигена (10^9 эритроцитов барана подкожно в подошвенную поверхность правой стопы; 0,1 мл изотонического раствора NaCl – левой, контрольной стопы). Через 24 ч (15-е сутки эксперимента) оценивали гуморальный ответ по числу антителообразующих клеток (АОК) в регионарном (правом подколенном) и отдаленном (левом подколенном) лимфатических узлах, селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы в модификации [15], выраженность воспаления при реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) путем регистрации толщины (инженерным микрометром) опытной и контрольной стопы [15]; изменение числа ядросодержащих клеток (ЯСК) в органах лимфомиелоидного комплекса. У всех животных до начала эксперимента и в конце его в сыворотке крови иммуноферментным методом определяли концентрацию свободного и общего тироксина (ООО «Хема-Медика», Россия), кортикостерона («Correlate-EIA Corticosterone», США), кортизола (ООО «Хема-Медика», Россия), дегидроэпиандростерона сульфата (ООО «Хема-Медика», Россия).

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, одно- и двухфакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Дункана для множественного сравнения между группами. Данные по числу АОК с учетом их log-нормального распределения предварительно преобразовывали в значения $\log_{10}$ соответствующих показателей. Результаты в тексте и на рисунках представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Для оценки различий двух попарно связанных выборок использовали вариант *t*-критерия Стьюдента для парных данных. Различия показателей летальности оценивали с помощью одностороннего варианта точного метода Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И МЕТОДЫ

В качестве основного подхода к моделированию экспериментального тиреотоксикоза разной степени тяжести у крыс выбрана модель с 14-дневным подкожным введением L-тироксина [1, 4, 5]. Две дозы тироксина – 0,04 и 40 мг/кг – вызывают соответственно максимальную стимуляцию или угнетение антителогенеза в селезенке мышей [1, 4, 5]. Поскольку в настоящей работе тиреотоксикоз моделируется у крыс, представлялось необходимым оценить его тяжесть и выраженность нейроэндокринных сдвигов. Интегральным показателем оценки тяжести патологических процессов является летальность животных. Установлено, что наибольшая летальность (55 %) выявляется при введении тироксина в суточной дозе 40 мг/кг массы тела. Введение тироксина в суточной дозе 4 мг/кг вызывает гибель 25 % животных. При введении гексопреналина сульфата совместно с 40 мг/кг тироксина летальность составляет 50 %, а вместе с 4 мг/кг тироксина – 29 %. При блокаде бета-адренорецепторов соталола гидрохлоридом летальность у крыс, получавших 4 мг/кг тироксина, составляет 8 %. При использовании тироксина в суточной дозе 0,04 мг/кг как отдельно, так и совместно с адренергическими соединениями, а также при введении только гексопреналина сульфата, соталола гидрохлорида, растворителя препаратов смертность отсутствует. При статистическом анализе различий летальности в группах животных, получавших тироксин отдельно или в сочетании с адренергическими соединениями, они выявлены только между животными, получавшими 40 и 0,04 мг/кг тироксина ($p = 0,00458$ по одностороннему варианту точного метода Фишера). В дальнейших исследованиях моделирование тиреотоксикоза осуществляли 14-дневным введением тироксина в суточных дозах 0,04 и 4 мг/кг массы тела для создания соответственно более легкой и более тяжелой формы экспериментального тиреотоксикоза с позиций летальности.

Установлено, что концентрация свободного тироксина статистически значимо различается в группах крыс, получавших разные дозы тироксина

на (рис. 1). При двухфакторном дисперсионном анализе статистически значимое влияние взаимодействия факторов «тироксин» и «агонист» или «антагонист» бета-адренорецепторов на концентрацию общего тироксина отсутствует ($p > 0,05$). При оценке изменения концентрации общего тироксина выявлены аналогичные закономерности (данные не приводятся). Одним из интегральных показателей адренокортикальной активности является масса надпочечников. Установлено, что гипертрофия надпочечников развивается только при более тяжелой форме тиреотоксикоза, степень ее выраженности увеличивается при введении гексопреналина сульфата (рис. 2). При более легкой степени тиреотоксикоза введение как агониста, так и антагониста бета-адренорецепторов приводит к развитию гипертрофии надпочечников, что, по-видимому, отражает развитие стрессорных нейроэндокринных изменений в ответ на более выраженное нарушение метаболизма при сочетанном воздействии тироксина и адренергических соединений. Установлено, что повышение уровня кортикостерона зависит от дозы вводимого тироксина (см. рис. 2). Увеличение уровня кортикостерона при введении 4 мг/кг тироксина сохраняется у крыс, получавших как гексопреналина сульфат, так и соталола гидрохлорид. При совместном введении соталола гидрохлорида и тироксина в дозе 0,04 мг/кг отмечается слабо выраженное повышение уровня кортикостерона в сравнении с контролем. Хотя основным глюкокортикоидом у крыс является кортикостерон, по данным литературы [10], у животных этого вида синтезируется и кортизол. Выявлено, что введение тироксина в суточной дозе 4 мг/кг увеличивает концентрацию кортизола, а в суточной дозе 0,04 мг/кг не влияет на его уровень (см. рис. 2). Увеличение уровня кортизола у крыс, получавших тироксин в суточной дозе 4 мг/кг, сохраняется при введении как гексопреналина сульфата, так и соталола гидрохлорида.

В связи с тем, что дегидроэпиандростерон является антагонистом глюкокортикоидных гормонов и обладает выраженным протективным действием при стрессорном угнетении иммунного ответа [6], представлялось целесообразным исследование изменения уровня его метаболита при экспериментальном тиреотоксикозе. Установлено, что концентрация дегидроэпиандростерона сульфата повышается только при более тяжелой форме тиреотоксикоза. В контрольной группе она составляет $50,19 \pm 16,23$; при более тяжелой форме тиреотоксикоза — $132,63 \pm 35,10$ ($p < 0,05$ к контрольной группе), а при более легкой форме — $74,13 \pm 4,81$ нг/мл ($p > 0,05$ к контрольной группе). При введении гексопреналина сульфата животным с тиреотоксикозом уровень дегидроэпиандростерона сульфата не отличается от животных 1-й группы, получавших только тироксин (при более тяжелой форме тиреотоксикоза он составляет $176,04 \pm 45,52$; $p > 0,05$ к 1-й группе, $p < 0,05$ к контрольной группе, а при более легкой форме — $87,09 \pm 5,12$ нг/мл, $p > 0,05$ к 1-й и контрольной группам). Сходные результаты получены и при введении крысам с тиреотоксикозом соталола гидрохлорида (концентрация дегидроэпиандростерона сульфата при более тяжелой форме тиреотоксикоза составляет $165,74 \pm 71,76$; $p > 0,05$ к 1-й группе, $p < 0,05$ к контрольной группе, а при более легкой форме — $87,20 \pm 24,85$ нг/мл, $p > 0,05$ к 1-й и контрольной группам). При введении агониста и антагониста бета-адренорецепторов эутиреоидным крысам уровень дегидроэпиандростерона сульфата не изменяется ($p > 0,05$; данные не приводятся).

При использованной нами экспериментальной модели иммунного ответа наблюдается развитие антителообразования преимущественно на территории регионарного лимфатического узла со значительным увеличением его клеточности в сравнении с отдаленным лимфатическим узлом ($p < 0,05$ по парному t -критерию Стьюдента). В селезенке абсолютное число АОК сопоставимо с

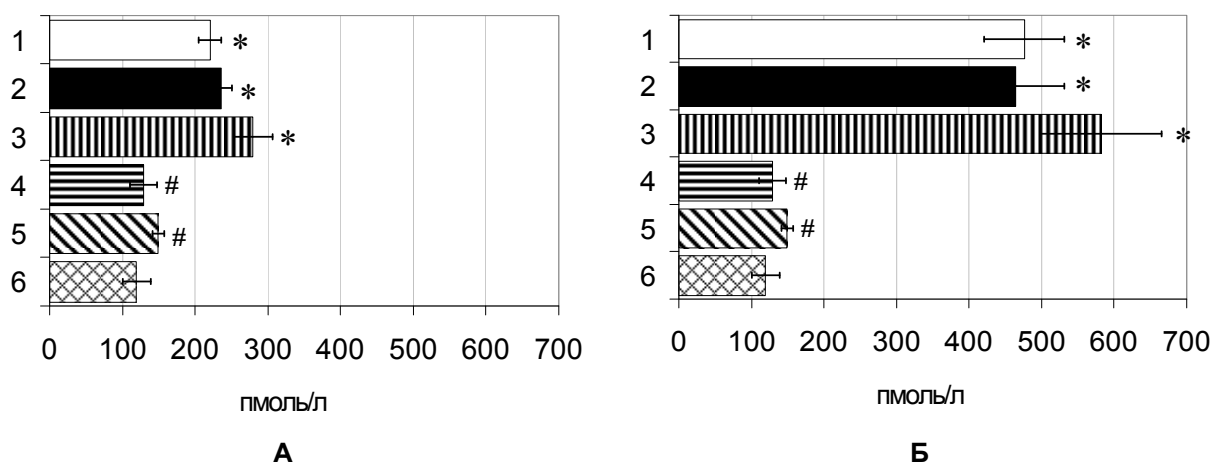


Рис. 1. Изменение концентрации свободного тироксина у крыс, получавших адренергические соединения на фоне тиреотоксикоза, смоделированного введением тироксина в суточной дозе 0,04 (А) и 4 мг/кг (Б). По оси ординат: 1 – тироксин, 2 – тироксин+гексопреналина сульфат, 3 – тироксин+соталола гидрохлорид, 4 – гексопреналина сульфат, 5 – соталола гидрохлорид, 6 – контрольная группа. * – $p < 0,05$ по критерию Дункана к контрольной группе; # – то же к 1-й группе.

уровнем, характерным для близкого к пороговому в условиях внутривенной или внутрибрюшинной иммунизации по данным литературы [15] (средняя геометрическая числа АОК на орган в контрольной группе — 1153; $\log_{10}$ числа АОК — $3,0619 \pm 0,0960$). Установлено, что при более тяжелой форме тиреотоксикоза число АОК в регионарном лимфатическом узле и его клеточность значительно снижаются (рис. 3). Введение

агониста бета-адренорецепторов при более тяжелой форме тиреотоксикоза не влияет на степень выраженности супрессивного действия тироксина на число АОК в регионарном лимфатическом узле. Неселективный антагонист бета-адренорецепторов отменяет вызванное тиреотоксикозом снижение количества АОК и ЯСК в регионарном лимфатическом узле (см. рис. 3). Поэтому можно считать, что супрессия антителообразования при

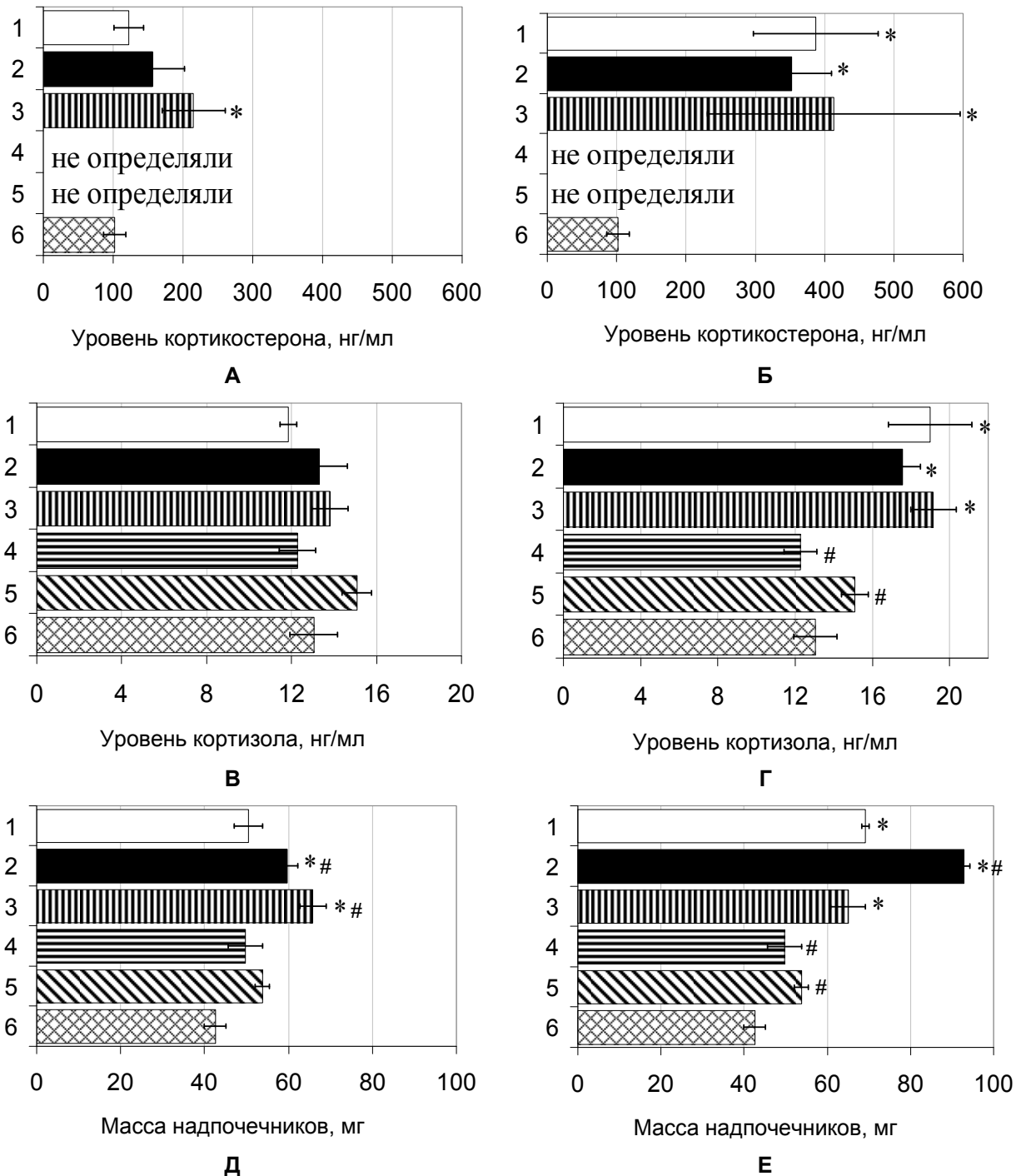


Рис. 2. Изменение уровня кортикостерона (А, Б), кортизола (В, Г) и массы надпочечников (Д, Е) у крыс, получавших адренергические соединения на фоне тиреотоксикоза, смоделированного введением тироксина в суточной дозе 0,04 (А, В, Д) и 4 мг/кг (Б, Г, Е). По оси ординат: 1 – тироксин, 2 – тироксин+гексопреналина сульфат, 3 – тироксин+соталола гидрохлорид, 4 – гексопреналина сульфат, 5 – соталола гидрохлорид, 6 – контрольная группа. * – $p < 0,05$ по критерию Дункана к контрольной группе; # – то же к 1-й группе.

тиреотоксикозе опосредуется через ранее описанное для различных клеток-мишеней усиление повышенными концентрациями тироксина и глюкокортикоидов ответственности на эндогенные катехоламины, связанное с повышением экспрессии бета-адренорецепторов и/или трансдукции

через них сигнала [11, 13, 15]. Выявленные закономерности подтверждаются двухфакторным дисперсионным анализом. Так, отмечается статистически значимый эффект взаимодействия тироксина и соталола гидрохлорида на общее варьирование показателя абсолютного числа АОК

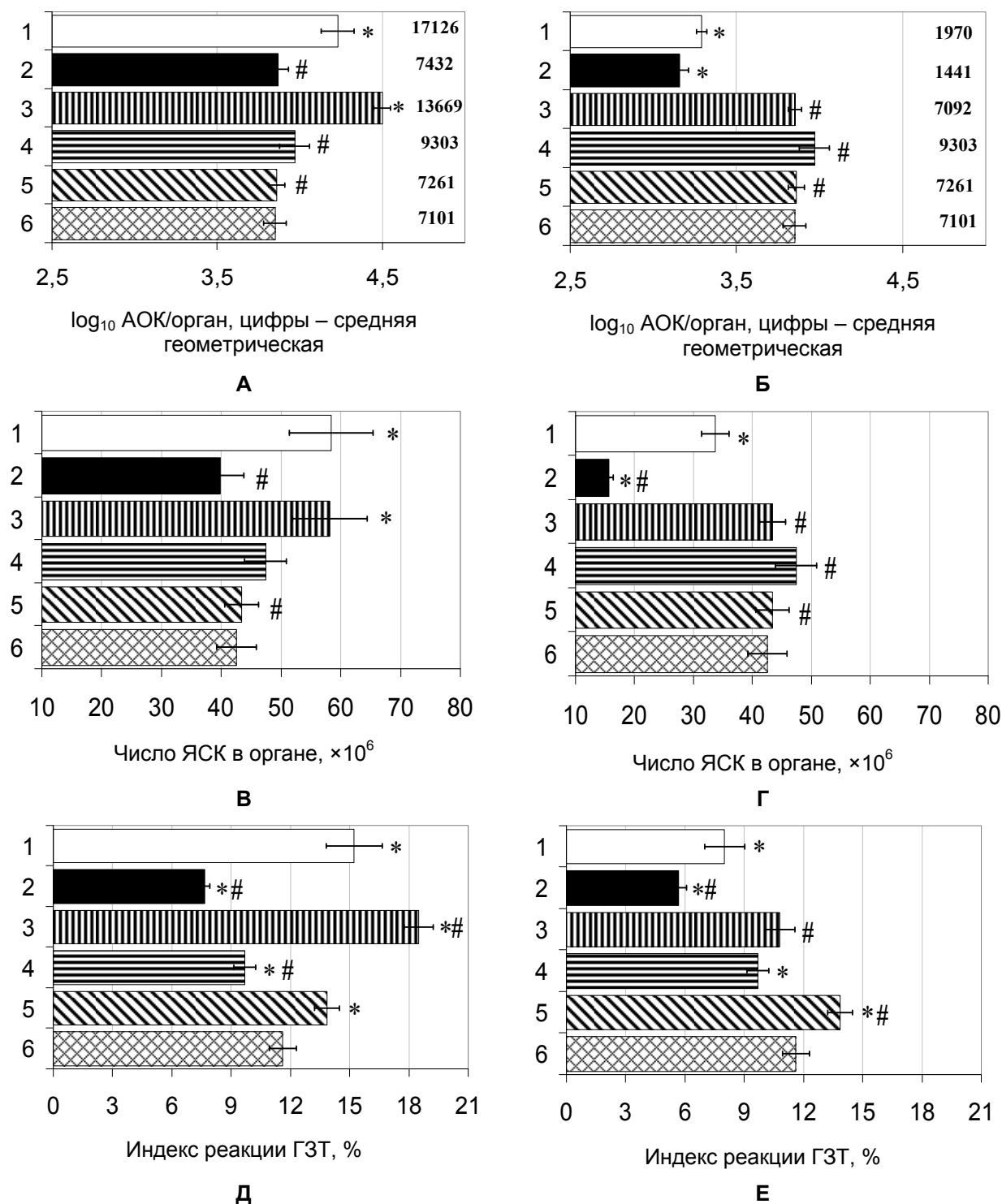


Рис. 3. Изменение абсолютного числа АОК (А, Б) и ЯСК в регионарном лимфатическом узле (В, Г), индекса реакции ГЗТ (Д, Е) на 5-е сутки иммунного ответа у крыс, получавших адренергические соединения на фоне тиреотоксикоза, смоделированного введением тироксина в суточной дозе 0,04 (А, В, Д) и 4 (Б, Г, Е) мг/кг. По оси ординат: 1 – тироксин, 2 – тироксин+гексопреналина сульфат, 3 – тироксин+соталола гидрохлорид, 4 – гексопреналина сульфат, 5 – соталола гидрохлорид, 6 – контрольная группа. * – $p < 0,05$ по критерию Дункана к контрольной группе; # – то же к 1-й группе.

в регионарном лимфатическом узле при более тяжелой форме экспериментального тиреотоксикоза ($F(1,47) = 33,49$; $p = 0,000001$ для фактора «тироксин», $F(1,47) = 33,36$; $p = 0,000004$ для фактора «сotalолола гидрохлорид» и $F(1,47) = 31,12$; $p < 0,0000001$ для взаимодействия двух факторов в дисперсионном комплексе, сформированном из показателей 1-й, 3-й, 5-й и 6-й групп), что указывает на их выраженный антагонизм.

При более легкой степени тиреотоксикоза число АОК и ЯСК в регионарном лимфатическом узле повышаются (см. рис. 3). Блокада бета-адренорецепторов сotalололом гидрохлоридом на выявленные изменения не влияет. При совместном введении тирокина и агониста бета-адренорецепторов отмечается снижение числа АОК и ЯСК в регионарном лимфатическом узле в сравнении с аналогичными показателями животных 1-й группы, что, по-видимому, связано с супрессивным действием гексопреналина сульфата через сигнальные пути с бета-адренорецепторов. При двухфакторном дисперсионном анализе отмечается статистически значимый эффект взаимодействия факторов «тироксин» и «гексопреналина сульфат» на показатели абсолютного числа АОК в регионарном лимфатическом узле ($F(1,47) = 9,39$; $p = 0,003601$) и числа ЯСК ($F(1,47) = 6,5513$; $p = 0,013756$) в дисперсионных комплексах, сформированных из показателей 1-й, 2-й, 4-й и 6-й групп, что подтверждает антагонизм этих факторов, в то время как взаимодействие факторов «тироксин» и «сotalолола гидрохлорид» отсутствует ($p > 0,05$ в соответствующих дисперсионных комплексах).

При более тяжелой форме тиреотоксикоза выявлена значительная супрессия развития реакции ГЗТ (см. рис. 3). Гексопреналина сульфат при тиреотоксикозе увеличивает выраженность иммуносупрессии. Сotalолола гидрохлорид отменяет супрессивный эффект тиреотоксикоза. Введение тирокина в суточной дозе 0,04 мг/кг приводит к повышению степени выраженности иммунного воспаления при реакции ГЗТ. При введении агониста бета-адренорецепторов совместно с 0,04 мг/кг тирокина наблюдается не только отмена стимуляции реакции ГЗТ, но и существенное снижение ее выраженности в сравнении с контролем. Выявляется статистически значимый эффект взаимодействия факторов «тироксин» и «гексопреналина сульфат» по данным двухфакторного дисперсионного анализа ($F(1,47) = 11,416$; $p = 0,001471$ в дисперсионном комплексе, сформированном из показателей 1-й, 2-й, 4-й и 6-й групп), что подтверждает их выраженный антагонизм. В условиях фармакологической блокады бета-адренорецепторов сotalололом гидрохлоридом при более легкой форме тиреотоксикоза активация реакции ГЗТ еще более выражена. При введении одного агониста бета-адренорецепторов отмечена супрессия реакции ГЗТ, а при введении только антагониста бета-адренорецепторов — стимуляция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при экспериментальном тиреотоксикозе разной степени тяжести у крыс развиваются оппозитные изменения антителообразования и реакции ГЗТ при локальном иммунном ответе на тимусзависимый антиген — стимуляция при более легкой форме и угнетение при более тяжелой. В механизме иммуносупрессии при тяжелой форме тиреотоксикоза может принимать участие повышение уровня глюкокортикоидов. При введении агониста или антагониста бета-адренорецепторов животным с тиреотоксикозом изменения интегральных показателей иммунного ответа существенно модифицируются, что подтверждает участие повышения чувствительности клеток иммунной системы к бета-адренергической регуляции в иммуномодуляции при тиреотоксикозе.

Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-00424-а, 08-04-00517-а и 10-04-96092-р-Урал-а, программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки — медицине».

ЛИТЕРАТУРА

1. Кеворков Н.Н., Бахметьев Б.А. Некоторые механизмы влияния экзогенного тирокина на регуляцию иммунного ответа у мышей // Проблемы эндокринологии. — 1984. — Т. 30, № 4. — С. 52–56.
2. Ланин Д.В., Шилов Ю.И. Изменение функций циркулирующего пула нейтрофилов и влияние на них тербуталила сульфата при экспериментальном тиреотоксикозе // Вестн. Уральской мед. акад. науки. — 2009. — № 2/1. — С. 46–47.
3. Arpin C., Pihlgren M., Fraichard A. Effects of T3Ra1 and T3Ra2 gene deletion on T and B lymphocyte development // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164, N 1. — P. 152–160.
4. Bachmetyev B.A. The usage of irradiation models for analysis of thyroxine immunomodulatory effects *in vivo* // 2nd International Congress ISNIM (Abstracts of 2nd International Congress of International Society for Neuroimmunomodulation, Held at Paestum (Salerno), Italy, 12–17 September, 1993). — ERREBI Falconara, 1993. — P. 269–269.
5. Bachmetyev B.A., Kevorkov N.N. Effects of thyroxine on T and B cell development // 12th European Immunology Meeting, 14–17 June 1994, Barcelona, Abstracts. — Barcelona, 1994. — P. 25–25.
6. Caetano L.C., Brazao V., Filipin Mdel V. Corticosterone evaluation in Wistar rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi* during the chronic phase // Exp. Parasitol. — 2011. — Vol. 127, N 1. — P. 31–35.
7. Dorshkind K., Horsemann N.D. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency // Endocr. Rev. — 2000. — Vol. 21, N 3. — P. 292–312.
8. Fabris N., Mocchegiani E., Mariotti S. Thyroid function modulates thymic endocrine activity // J.

Clin. Endocrinol. Metab. — 1980. — Vol. 62, N 3. — P. 474—478.

9. Hodkinson C.F., Simpson E.E., Beattie J.H. Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55—70 years // J. Endocrinol. — 2009. — Vol. 202, N 1. — P. 55—63.

10. Lloyd-MacGilp S.A., Nelson S.M., Florin M. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid action in Lyon hypertensive rats // Hypertension. — 1999. — Vol. 34, N 5. — P. 1123—1128.

11. Pappas M., Mourouzis K., Karageorgiou H. Thyroid hormone modulates the responsiveness of rat aorta to α_1 -adrenergic stimulation: an effect due to increased activation of β_2 -adrenergic signaling // Int. Angiol. — 2009. — Vol. 28, N 6. — P. 474—478.

12. Ribeiro-Carvalho M.M., Smaniotto S., Neves-dos-Santos S. Triiodothyronine modulates differential

homing of recent thymic emigrants to peripheral lymphoid organs // Scand. J. Immunol. — 2007. — Vol. 66, N 1. — P. 8—16.

13. Ribeiro M.O., Carvalho S.D., Schultz J.J. Thyroid hormone — sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 108, № 1. — P. 97—105.

14. Riether C., Kavelaars A., Wirth T. Stimulation of β_2 -adrenergic receptors inhibits calcineurin activity in CD4⁺ T cells via PKA-AKAP interaction // Brain. Behav. Immun. — 2011. — Vol. 25, N 1. — P. 59—66.

15. Shilov Ju.I., Lanin D.V., Shilov S.Ju., Orlova E.G. Influence of beta-adrenergic receptor blockade on immunomodulatory effects of hydrocortisone // New Research on Immunology / Ed. by Barbara A. Veskler / Nova Biomedical Books. — New York, 2005. — P. 167—191.

Сведения об авторах

Шилов Юрий Иванович — ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУ науки Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, доцент кафедры иммунологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, кандидат медицинских наук (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13 ИЭГМ УрО РАН; тел.: (342) 2807442; факс: (342) 2809211; e-mail: jshilov@mail.ru)

Годовалов Анатолий Петрович — ассистент кафедры иммунологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития РФ (614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26; e-mail: agodovalov@gmail.com)

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК (612.017.1:616-056.43):616.13-004.6:615

В.С. Ширинский, И.В. Ширинский

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В РЕШЕНИИ ОСНОВНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Достижения в понимании биологии цитокинов, их роли в развитии различных заболеваний, успехи анти-цитокиновой терапии привели к предположению, что цитокины можно использовать в качестве биомаркеров для решения разнообразных клинических задач. Целью этого обзора является обобщение данных литературы и результатов собственных исследований, касающихся использования цитокинов в качестве биомаркеров для оценки «бремени» болезни, прогноза заболевания, постановки диагноза и предсказания ответа на лечение.

Ключевые слова: биомаркеры, цитокины

DEFINING CYTOKINES CONTENTS IN SOLVING MAIN CLINICAL ISSUES

V.S. Shirinskiy, I.V. Shirinskiy

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

Breakthroughs in cytokine biology, appraisal of their importance in many diseases, and successes of anti-cytokine therapy have lead to an assumption that cytokines can be used as biomarkers in various clinical settings. The aim of this review is to discuss some data from the literature and our own data pertaining to the use of cytokines as biomarkers for the assessment of disease burden, prognosis, diagnosis, and prediction of response to treatment.

Key words: biomarkers, cytokines

В распоряжении клинициста имеется множество лабораторных тестов. Часто они могут дать полезные сведения для решения основных клинических задач, если к полученным данным относится критически. Если результаты обследования используются бездумно, они в лучшем случае будут бесполезными, а в худшем — дезориентирующими и даже опасными. Исследование должно проводиться для того, чтобы своевременно поставить диагноз, назначить адекватную терапию и определить прогноз течения болезни.

Открытие цитокинов, изучение их роли в физиологических процессах, патогенезе различных заболеваний, успешное применение цитокинов и антицитокинов в лечении вселило надежду на то, что цитокины могут быть высокоинформативны для диагностических и прогностических целей и способны пополнить арсенал тестов, используемых в клинической практике.

Целью настоящего сообщения является анализ данных литературы и собственных данных об оценке содержания сывороточных цитокинов как информативных биомаркеров.

Биомаркер — это любая молекула, свидетельствующая о наличии и/или интенсивности биологического (патологического) процесса; содержание биомаркера обычно напрямую связано с клиническими проявлениями и исходом конкретной болезни [11].

Биомаркеры могут быть факторами риска развития заболевания, диагностическими тестами и прогностическими факторами. Они могут помогать оценивать бремя болезни и быть критериями оценки исхода лечения.

По мнению Z.J. Sahab et al. «идеальный биомаркер» должен отвечать следующим характеристикам [9]:

- быстрое и недорогое определение;
- легкая регистрация в доступных образцах (например, моче, сыворотке);
- специфичное повышение (снижение) концентрации при определенном заболевании;
- отсутствие «перекреста» в содержании биомаркера у нелеченных пациентов и у здоровых людей;
- незначительная вариация концентрация биомаркера у здоровых людей;
- содержание биомаркера коррелирует с общим бременем болезни, но не подвержено влиянию сопутствующих заболеваний и коморбидных факторов;
- концентрация биомаркера связана с установленными клинико-морфологическими параметрами болезни, оказывающими влияние на качество и продолжительность жизни;
- содержание биомаркера быстро изменяется в ответ на специфическое лечение;

• значительное отклонение концентрации биомаркера от референтных значений в контрольной популяции обладает достаточной предсказательной способностью в отношении, риска, тяжести болезни и прогноза.

На примерах нескольких исследований рассмотрим, насколько информативно определение содержания цитокинов в периферической крови как факторов риска развития заболевания. Напомним, что факторы риска — это генетические особенности организма или внешние воздействия, приводящие к увеличению риска возникновения заболевания [12].

Так, в работе J. Danesh et al. были обобщены данные 17 проспективных исследований, оценивавших повышение риска сердечно-сосудистых заболеваний при увеличении базового и усредненного, зарегистрированного в течение длительного времени содержания ИЛ-6 в сыворотке на два стандартных отклонения. Было показано, что в обоих случаях относительный риск увеличивается на 1,61 (95 % ДИ 1,42–1,83) и 3,34 (95 % ДИ 2,45–4,56), соответственно [5]. Y. Rho et al. изучали ассоциацию содержания различных медиаторов воспаления и кальция в коронарных артериях у больных ревматоидным артритом (РА) и здоровых людей. Авторами установлено, что повышенное содержание таких провоспалительных цитокинов как ИЛ-4 и ФНО свидетельствует о высоком риске субклинического течения атеросклероза коронарных артерий у больных РА [7].

Определение содержания сывороточных цитокинов для постановки диагноза не нашло применения в клинической практике, вследствие низкой специфичности тестов. Напомним, что диагностические тесты — показатели необходимые (высокоспецифичные и высокочувствительные) и полезные (высокочувствительные) для правильной постановки диагноза [12]. Предпринимались попытки использования определения содержания p55 TNF — рецептора как метода скрининга для диагностики некоторых вариантов аутовоспалительных заболеваний [6], которые были оставлены

вследствие вариабельности показателя и трудностей его интерпретации. Уместно напомнить слова из нестареющей книги Роберта Хэгглина «Дифференциальная диагностика внутренних болезней» «В кабинете врача диагноз устанавливается по данным анамнеза более чем в 50 % случаев, на основании клинического исследования примерно в 30 % случаев, и по лабораторным данным — приблизительно в 20 % случаев [1].

В ряде случаев определение содержания цитокинов может характеризовать «бремя болезни» — степень ее тяжести, отражающее уровень физического, умственного и социального неблагополучия [3].

Примером оценки бремени болезни с помощью определения содержания сывороточных цитокинов может быть работа F. Bozza et al., в которой авторы использовали гКСФ, ИЛ-8, ИЛ-6 для определения тяжести сепсиса. Показано, что определение уровня всех трех цитокинов может высокоинформативно предсказывать сохраняющуюся органную дисфункцию в течении трех дней течения сепсиса [4], поскольку площадь под кривой колеблется от 0,679 до 0,700 — клинически значимые значения.

Информативность цитокинов при оценке исходов лечения. Исходы любого вмешательства могут быть оценены с помощью истинных клинических критериев (летальность, инвалидизация, обострение и др.) и косвенных (суррогатных) — определение содержания цитокинов и других биомаркеров [12]. Принято считать, что применение в качестве первичных конечных точек истинных клинических исходов более информативно чем суррогатных критериев при выявлении эффективности новых видов лечения. Использование суррогатных критериев как первичных конечных точек повышает риск получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов. Несколько примеров.

Ранее нами была показана снижение интегрального показателя активности РА DAS 28 (истинный клинический исход) к концу 12-й недели приема симвастатина [2]. Было отмечено снижение к концу лечения содержания сывороточного ИЛ-17

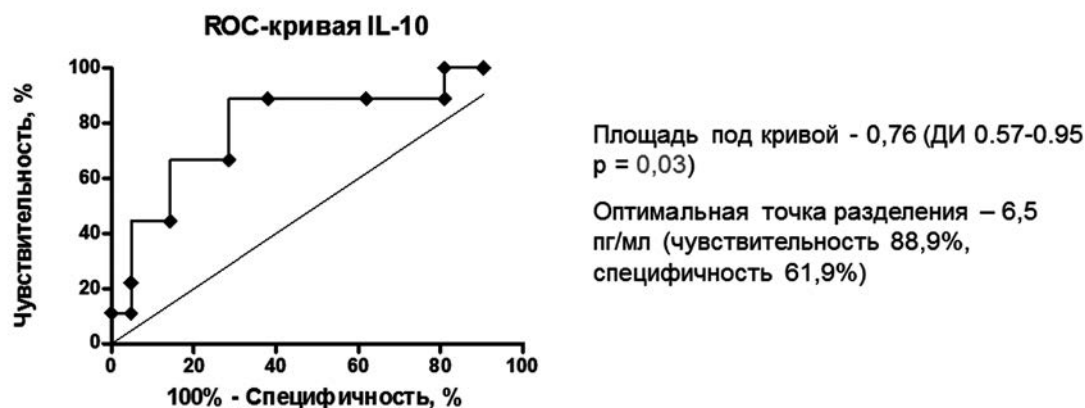


Рис. 1. Изучение операционных характеристик сывороточного IL-10 для предсказания ответа на симвастатин у больных РА.

(суррогатный биомаркер), а уровни ИЛ-10, ИФН, ТНФ, ИЛ-6, ИЛ-8 не изменились [10]. Содержание сывороточного ИЛ-6 к концу лечения статистически значимо уменьшилось только в группе пациентов ответивших на лечение симvastатином (рис. 1).

Эти примеры лишний раз свидетельствуют о том, что при оценке так называемой «клинико-иммунологической» эффективности нового вмешательства первичной конечной точкой должен быть истинный клинический критерий.

Предсказание будущего течения болезни — важный элемент развернутого клинического диагноза. Прогностические факторы помогают у пациентов с одной болезнью предсказать ее различные исходы (смерть, осложнения, инвалидность и др.). В исследовании Т. Rooney et al. показано, что повышенное содержание сывороточного ИЛ-6, но не ИЛ-1 и ФНО, может служить предиктором рентгенологической прогрессии при лечении больных РА препаратами анти-ФНО и анти-ИЛ-1 [8].

Таким образом, цитокины, как другие биологические молекулы могут быть использованы для решения ключевых клинических задач. Степень их информативности зависит от того, какую задачу с помощью определения цитокинов, необходимо решать. От этого зависит востребованность этого вида биомаркеров в практике врача. В любом случае методы оценки цитокинов должны удовлетворять следующим требованиям:

- валидности;
- воспроизводимости;
- преимуществом перед другими биомаркерами;
- доступностью;
- экономичностью.

В заключение следует сказать, что возможности определения цитокинов с диагностической и прогностической целью далеко не исчерпаны. Есть основания надеяться, что наряду с открытием новых цитокинов перечень информативных биомаркеров будет пополняться за счет и этих молекул.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хэгглин Р. Дифференциальная диагностика внутренних болезней. — М.: Инженер, 1993. — 794 с.
2. Ширинский И.В., Желтова О.И., Соловьева Н.Ю., Ширинский В.С. и др. Эффективность и безопасность симvastатина при ревматоидном

артрите: открытое контролируемое исследование // Мед. иммунология. — 2007. — № 4—5. — С. 477—482.

3. Bauer D.C., Hunter D.J., Abramson S.B., Atur M. et al. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach // Osteoarthritis Cartilage. — 2006. — Vol. 14. — P. 723—727.

4. Bozza F.A., Salluh J.I., Japiassu A.M., Soares M. et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis // Crit Care. — 2007. — Vol. 11. — P. 49.

5. Danesh J., Kaptoge S., Mann A.G., Sarwar N. et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review // PLoS Med. — 2008. — Vol. 5. — P. 78.

6. Gattorno M., Federici S., Pelagatti M.A., Caorsi R. et al. Diagnosis and management of autoinflammatory diseases in childhood // J. Clin. Immunol. — 2008. — Vol. 28. — Suppl. 1. — P. 73—83.

7. Rho Y.H., Chung C.P., Oeser A., Solus J. et al. Inflammatory mediators and premature coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. — 2009. — Vol. 61. — P. 1580—1585.

8. Rooney T., Roux-Lombard P., Veale D.J., FitzGerald O. et al. Synovial tissue and serum biomarkers of disease activity, therapeutic response and radiographic progression: analysis of a proof-of-concept randomised clinical trial of cytokine blockade // Ann. Rheum. Dis. — 2010. — Vol. 69. — P. 706—714.

9. Sahab Z.J., Semaan S.M., Sang Q.X. Methodology and applications of disease biomarker identification in human serum // Biomark Insights. — 2007. — Vol. 2. — P. 21—43.

10. Shirinsky I.V., Zheltova O.I., Solovyova N.Y., Kozlov V.A. et al. Changes in disease activity, cytokine production, and proliferation of peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis after simvastatin treatment // Scand. J. Rheumatol. — 2009. — Vol. 38. — P. 23—27.

11. Syversen S.W., Landewe R., van der Heijde D., Bathon J.M. et al. Testing of the OMERACT 8 draft validation criteria for a soluble biomarker reflecting structural damage in rheumatoid arthritis: a systematic literature search on 5 candidate biomarkers // J. Rheumatol. — 2009. — Vol. 36. — P. 1769—1784.

12. Fletcher R.H., Fletcher S.W. Clinical Epidemiology. The Essentials, 4th ed. — Baltimore: Lipincott Williams and Wilkins, 2005. — 288 p.

Сведения об авторах

Ширинский Иван Валерьевич — ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: 3832282547)

Ширинский Валерий Степанович — заведующий лабораторией, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (630049, г. Новосибирск, ул. Красный пр-т, д. 179, кв. 75; тел.: 228-2597, факс: 2282597)

И.В. Ширинский, О.А. Половникова, В.С. Ширинский

АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И АТЕРОСКЛЕРОЗ – ПРОБЛЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Проблема коморбидности является одной из наиболее актуальных в клинической иммунологии. Наиболее распространенные органонеспецифические аутоиммунные заболевания — ревматоидный артрит (РА) и псориаз ассоциированы с ускоренным развитием атеросклероза и повышенным риском сердечно-сосудистых катастроф. Перспективным направлением в лечении аутоиммунных болезней, осложненных коморбидной патологией, является использование соединений с многоцелевым действием. К числу таких препаратов относятся ингибиторы 3-гидрокси 3-метилглутарил коэнзим А редуктазы (статины) и агонисты PPAR-α (фибраты), обладающие противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиатерогенными свойствами. В данном обзоре обобщены результаты собственных исследований, изучавших обоснование использования, эффективность, безопасность, и фармакодинамику статинов и фибратов при РА и псориазе.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, псориаз, атеросклероз, статины, фибраты

AUTOIMMUNE DISEASES AND ATHEROSCLEROSIS – PROBLEMS OF TREATMENT

I.V. Shirinskiy, O.A. Polovnikova, V.S. Shirinskiy

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

The problem of comorbidity is one of the most important problems in clinical immunology. The commonest non-organ specific autoimmune diseases — rheumatoid arthritis (RA) and psoriasis are linked with accelerated atherosclerosis progression and increased cardiovascular risk. In autoimmune disorders associated with comorbidities the use of multitargeted drugs holds a promise. Examples of such drugs include the inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (statins) and agonists of PPARα (fibrates) which exert anti-inflammatory, immunomodulating, and anti-atherogenic activities. In this review we summarize our own research on statins and fibrates pre-clinical pharmacology, their efficacy and safety in patients with RA and psoriasis.

Key words: rheumatoid arthritis, psoriasis, statins, fibrates

Проблема сопутствующих заболеваний, методов их диагностики, профилактики и лечения является одной из актуальных в медицине. Проблема междисциплинарна, привлекает внимание не только клиницистов разных специальностей, но и генетиков, патофизиологов, морфологов, иммунологов и конечно фармакологов. Цель сообщения — анализ данных литературы и собственных данных посвященных патогенетическому обоснованию применения, оценке эффективности и безопасности ряда препаратов обладающих многоцелевым действием в лечении некоторых аутоиммунных заболеваний, подверженных риску развития атеросклероза и его последствий.

Коморбидность — сосуществование у одного пациента нескольких синдромов (транссиндромальная коморбидность) или заболеваний (транснозологическая коморбидность), патогенетически взаимосвязанных между собой [11]. Можно привести множество примеров коморбидности — ИБС и артериальная гипертензия, сахарный диабет и остеоартрит, гигантоклеточный артериит и ревматическая полимиалгия, атопический дерматит и бронхиальная астма и др. Все коморбидные патологии объединяет следующее:

- трудности дифференциального диагноза в дебюте болезни, на этапах ее эволюции, приводящие к несвоевременному и неадекватному лечению;
- полипрагмазия, приводящая к повышенному риску развития нежелательных явлений;

- увеличение риска неблагоприятных исходов болезни;

- высокая стоимость лечения вследствие повышения прямых и не прямых затрат.

В последние годы стало известно, что основной причиной высокой смертности больных аутоиммунными заболеваниями является раннее формирование и ускоренное прогрессирование атеросклеротического поражения сосудов, обуславливающего развитие инфаркта миокарда, инсульта, застойной сердечной недостаточности и внезапной смерти [13, 14, 16] РА и псориаз являются независимыми предикторами сердечно-сосудистых заболеваний [15, 19]. Очевидно, что поиск методов профилактики и лечения сердечно-сосудистых осложнений является не менее актуальной проблемой, чем разработка новых эффективных методов фармакотерапии самих болезней. Тем более, существующие в настоящее время методы системной терапии РА и псориаза не способны в достаточной мере снижать риск развития сердечно-сосудистых заболеваний или повышают его.

Известно, что при хроническом воспалении изменения в иммунной системе сопряжены с изменениями липидного обмена в крови, печени, жировой и других тканях. Обсуждаются два основных механизма интеграции метаболизма липидов и иммунного ответа, один из которых связан с синтезом холестерина [17], другой — с активностью суперсемейства ядерных X-рецепторов [20]. Пред-

полагается, что эта взаимосвязь лежит в основе общности патогенеза аутоиммунных заболеваний и атеросклероза и является основанием для поиска

препаратов, обладающих многоцелевым действием — противовоспалительным, антиатерогенным и иммуномодулирующим.

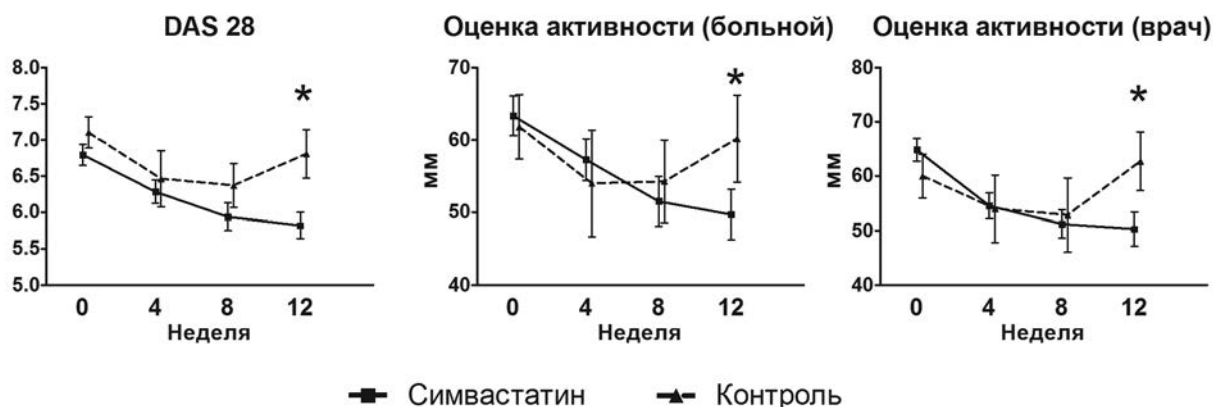


Рис. 1. Сравнение изменений клинических параметров у больных РА при приеме симvastатина 40 мг в сутки и плацебо. DAS28 – индекс болезни с 28-суставным счетом.

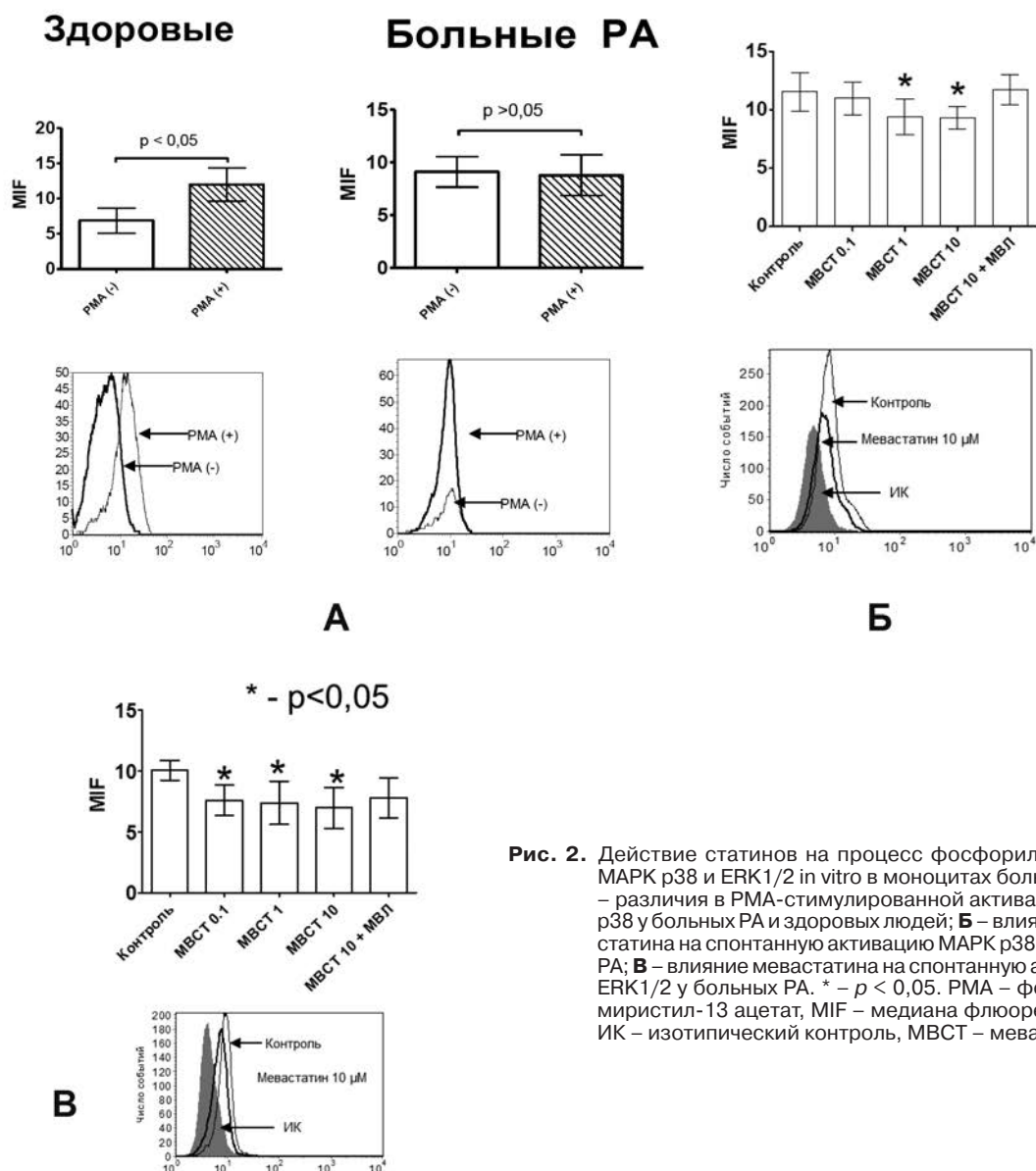


Рис. 2. Действие статинов на процесс фосфорилирования MAPK p38 и ERK1/2 in vitro в моноцитах больных РА. **А** – различия в PMA-стимулированной активации MAPK p38 у больных РА и здоровых людей; **Б** – влияние мевастатина на спонтанную активацию MAPK p38 у больных РА; **В** – влияние мевастатина на спонтанную активацию ERK1/2 у больных РА. * – $p < 0,05$. PMA – форбол-12-миристил-13 ацетат, MIF – медиана флуоресценции, ИК – изотипический контроль, MBCT – мевастатин.

Ранее нами было показано, что у больных ревматоидным артритом (РА) и псориазом выявляются проатерогенные изменения липидного спектра крови и связь содержания провоспалительных цитокинов с активностью болезни и дислипидемией [4, 5].

Эти данные, а также данные о «холестеринне-зависимых» противовоспалительных и иммуномодулирующих свойствах статинов [6], послужили основанием для проведения клинических испытаний эффективности и безопасности приема симвастатина у больных РА (рис. 1) [3].

Установлено, что к концу 12 недели приема симвастатина в дозе 40 мг ежедневно у больных РА статистически значимо снизились значения интегрального показателя активности болезни DAS 28. Умеренный EULAR-ответ развился у 33,3 % больных опытной группы и у 18,5 % больных получавших плацебо. Показано, что клинический эффект от приема симвастатина ассоциирован со снижением спонтанной, коллаген-11 индуцированной пролиферации мононуклеаров периферической крови, уровня ИЛ-17 и ИЛ у ответчиков на лечение [10].

Предполагается, что внутриклеточные механизмы действия статинов при РА обусловлены их влиянием на митогенактивированные протеинкиназы (МАРК) (рис. 2) [7].

Было показано, что прием симвастатина больными РА приводит к уменьшению содержания холестерина проатерогенных субфракций липопротеинов и увеличению холестерина антиатерогенных субфракций [1]. Кроме того, показано, что симвастатин снижает содержание иммунологических маркеров атеросклероза – СРБ и ИЛ-6 и это все свидетельствует о об антиатерогенном действии симвастатина [8].

Сходным с РА по патогенезу органонеспецифическим аутоиммунным заболеванием является псориаз. Известно, что псориаз, также как и РА, ассоциирован с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и нарушениями липидного обмена [13].

Были проведены исследования по изучению эффективности, безопасности иммунофармакодинамики приема симвастатина у больных с умеренным и тяжелым вульгарным псориазом [2] (рис. 3).

На восьмой неделе терапии в опытной группе больных зарегистрировано статистически значимое снижение интегрального показателя тяжести и площади поражения кожи PASI. Полно или почти полное очищение кожи, по мнению врача, было зарегистрировано у 40 % больных получавших симвастатин, тогда как в контрольной группе частота этого события была в 2,5 раза меньше. Применение симвастатина было сопряжено с увеличением сыовороточного ИЛ-10 и более чем двукратным повышением холестерина липопротеинов высокой плотности.

Таким образом, на примере двух аутоиммунных заболеваний установлено многоцелевое действие статинов – противовоспалительное, антиатерогенное и иммуномодулирующее. Это может служить основой для одной из новых стратегий лечения не только основного заболевания, но и грозной коморбидной патологии – сердечно-сосудистых осложнений атеросклероза.

Другая возможность связана с применением агонистов рецепторов активируемых пероксисомным пролифератором (PPAR) [9] (рис. 4).

Из рисунка видно, что агонисты PPAR, путем репрессии фактора транскрипции NF-κB приводят к снижению ряда провоспалительных

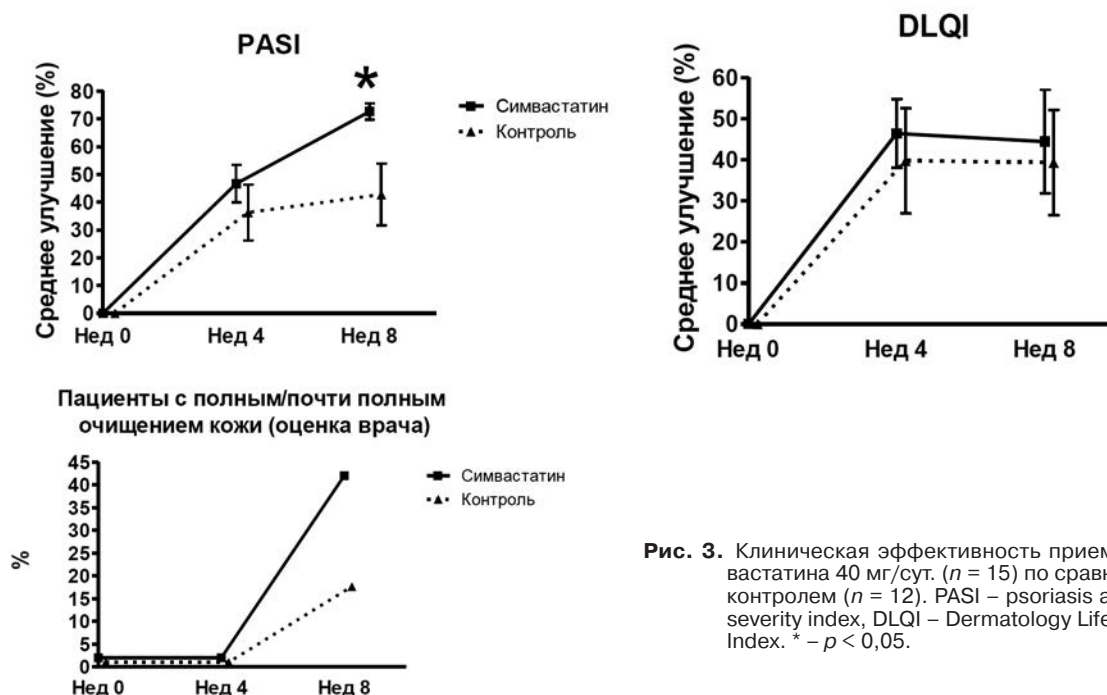


Рис. 3. Клиническая эффективность приема симвастатина 40 мг/сут. ($n = 15$) по сравнению с контролем ($n = 12$). PASI – psoriasis area and severity index, DLQI – Dermatology Life Quality Index. * – $p < 0,05$.

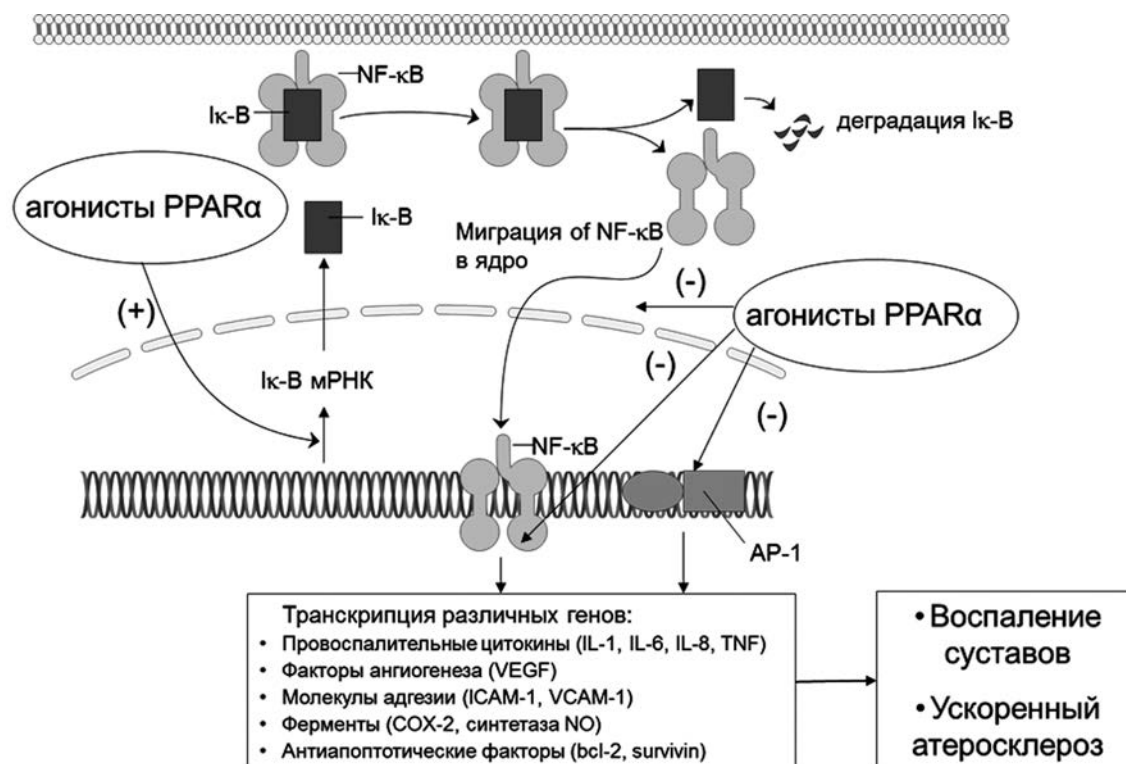


Рис. 4. Возможные механизмы противовоспалительного действия агонистов PPARα при РА.

медиаторов (цитокины, факторы ангиогенеза, молекулы клеточной адгезии, циклооксигеназа — 2 и др.). Учитывая известные данные о нормализующем влиянии агонистов PPAR на синтез, транспорт и разрушение липидов [12] они могут быть использованы в лечении аутоиммунных заболеваний с целью снижения активности воспаления и риска развития атеросклероза, его последствий.

Нами в «пилотных» исследованиях «до — после» было показано, что применение агониста PPAR фенофибрат у больных РА приводит на 12 неделе лечения к снижению активности болезни DAS-28. При этом умеренный EULAR-ответ выявлялся у 60 % пациентов. В динамике после лечения отмечено снижение уровня общего холестерина и триглицеридов [18].

Таким образом, результаты наших исследований и данные литературы обосновывают принципиально новую стратегию лечения АИЗ, связанную с применением ингибиторов ГМГ КоА редуктазы и агонистов PPAR как эффективных и безопасных средств с плеiotропным действием, одновременно направленным на подавление активности болезни и снижении риска развития коморбидной патологии — атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ширинский И.В., Желтова О.И., Ширинский В.С., Козлов В.А. Влияние симвастатина на активность болезни и содержание холестерина субфракций липопротеинов сыворотки крови у больных ревматоидным артритом // Терапевт. архив. — 2008. — № 3. — С. 63–65.

2. Ширинский И.В., Баровская Н.А., Леонова М.И., Кожевников В.С. и др. Опыт применения симвастатина при вульгарном псориазе // Вестн. дерматологии и венерологии. — 2009. — № 5. — С. 88–92.

3. Ширинский И.В., Желтова О.И., Соловьева Н.Ю., Ширинский В.С. и др. Эффективность и безопасность симвастатина при ревматоидном артрите: открытое контролируемое исследование // Мед. иммунология. — 2007. — № 4–5. — С. 477–482.

4. Ширинский И.В., Желтова О.И., Ширинский В.С., Козлов В.А. Связь активности болезни и липидного спектра крови у больных ревматоидным артритом // Клиническая медицина. — 2008. — № 12. — С. 40–43.

5. Ширинский И.В., Желтова О.И., Ширинский В.С., Козлов В.А. Содержание субфракций липопротеинов сыворотки крови и их связь с фенотипом иммунокомпетентных клеток у больных псориазом // Вестн. дерматологии. — 2008. — № 3. — С. 40–43.

6. Ширинский И.В., Козлов В.А., Ширинский В.С. Использование статинов — новый подход к терапии аутоиммунных заболеваний // Вестн. РАМН. — 2009. — № 2. — С. 26–32.

7. Ширинский И.В., Козлов В.А., Ширинский В.С. Влияние статинов и биологических препаратов на активацию митоген-активированных протеинкиназ у больных ревматоидным артритом // Мед. иммунология. — 2009. — № 1. — С. 71–78.

8. Ширинский И.В., Ширинский В.С. Влияние терапии симвастатином на иммунологические маркеры атеросклероза у больных ревматоидным

артритом // Мед. иммунология. — 2011. — № 1. — С. 101–104.

9. Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Targeting Nuclear Hormone Receptors: PPARalpha Agonists as Potential Disease-Modifying Drugs for Rheumatoid Arthritis // Int. J. Rheumatol. — 2011. — Vol. 20. — P. 93.

10. Shirinsky I.V., Zheltova O.I., Solovyova N.Y., Kozlov V.A. et al. Changes in disease activity, cytokine production, and proliferation of peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis after simvastatin treatment // Scand. J. Rheumatol. — 2009. — Vol. 38. — P. 23–27.

11. Valderas J.M., Starfield B., Sibbald B., Salisbury C. et al. Defining comorbidity: implications for understanding health and health services // Ann. Fam. Med. — 2009. — Vol. 7. — P. 357–363.

12. Abourbih S., Filion K.B., Joseph L., Schiffrin E.L. et al. Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: a systematic review // Am. J. Med. — 2009. — Vol. 122. — P. 961–968.

13. Boehncke W.H., Boehncke S. Cardiovascular morbidity in psoriasis: epidemiology, pathomechanisms, and clinical consequences // G. Ital. Dermatol. Venereol. — 2008. — Vol. 143. — P. 307–313.

14. Gabriel S.E. Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis // Am. J. Med. — 2008. — Vol. 121. — P. 9–14.

15. Gelfand J.M., Neimann A.L., Shin D.B., Wang X. et al. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis // JAMA. — 2006. — Vol. 296. — P. 1735–1741.

16. Salmon J.E., Roman M.J. Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus // Am. J. Med. — 2008. — Vol. 121. — P. 3–8.

17. Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. — 2009. — Vol. 49. — P. 123–150.

18. Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Safety and efficacy of fenofibrate in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study // Ann. Rheum. Dis. — 2010. — Vol. 69. — P. 218.

19. Van Halm V.P., Peters M.J., Voskuyl A.E., Boers M. et al. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease, a cross sectional study. The CARRE Investigation // Ann. Rheum. Dis. — 2008. — Vol. 6. — P. 25–27.

20. Varga T., Nagy L. Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: the case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma // Eur. J. Clin. Invest. — 2008. — Vol. 38. — P. 695–707.

Сведения об авторах

Ширинский Иван Валерьевич – ведущий научный сотрудник, доктор медицинских наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: 3832282547)

Половникова Оксана Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН

Ширинский Валерий Степанович – заведующий лабораторией ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630049, г. Новосибирск, ул. Красный пр-т, д. 179, кв. 75; тел.: 228-2597, факс: 2282597)

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ В «БЮЛЛЕТЕНЬ ВСНЦ СО РАМН»

Настоящие Правила разработаны на основании требований Гражданского кодекса РФ, Закона РФ «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.1993 г. № 5351-1 с изменениями от 19 июля 1995 г. и 20 июля 2004 г., Закона РФ «О средствах массовой информации» от 27.12.1991 г. № 2124-1 с последующими изменениями, и регулируют взаимоотношения между издательством в лице редакционной коллегии «Бюллетеня ВСНЦ СО РАМН», в дальнейшем именуемой «Редколлегия», и автором, передавшим свою статью для публикации в журнал, в дальнейшем именуемый «Автор». Правила утверждены решением Президиума ВСНЦ СО РАМН № 6 от 29 ноября 2011 г.

Редколлегия «Бюллетеня ВСНЦ СО РАМН» просит внимательно ознакомиться с нижеследующими инструкциями по подготовке рукописей для публикации.

«Бюллетень ВСНЦ СО РАМН» публикует статьи по проблемам медико-биологической науки и практического здравоохранения, а также по смежным проблемам.

В журнале публикуются обзоры, оригинальные статьи, сообщения из практики, лекции, информационные сообщения. Все представленные материалы рецензируются и обсуждаются редакционной коллегией.

Рукопись статьи должна быть представлена в 2-х экземплярах, напечатана на одной стороне стандартного листа (шрифт Times New Roman 12 пт, межстрочный интервал «полуторный»). Размеры полей: левое — 30 мм, правое — 10 мм, верхнее и нижнее — каждое не менее 20 мм. В электронном виде статья представляется на CD или направляется прикрепленным файлом по электронной почте на адрес: scrrs.irk@gmail.ru в форматах doc, docx или rtf.

Образец оформления рукописи статьи см. на сайтах http://www.vsnr.ru/bulleten_pravila.htm; http://www.scrrs.ru/byulleten_vsnts_so_ramn.

Таблиц должно быть не более 3–4-х. При построении таблиц необходимо все пункты представлять отдельными строками. Буквы греческого алфавита в печатном варианте статьи должны быть подчеркнуты красным.

Иллюстрации выполняют в графических редакторах в виде чёрно-белых чётких файлов формата *.tif, *.jpg с разрешением не менее 300 × 300 dpi. Если необходима печать в цветном формате, это указывается в ходатайстве.

Рисунки следует выполнять компактно в целях экономии места. Наиболее удобны для типографского воспроизведения рисунки шириной в одну колонку (до 8 см), две колонки (до 16,5 см) или во весь лист (16,5 × 22 см). Рисунки необходимо представлять в отдельных файлах.

Графики и диаграммы следует представлять отдельными файлами в программах, в которых они были построены (Excel, Statistica, StatGraph и т.д.).

К статье должно быть приложено официальное направление учреждения, в котором проведена работа. На первой странице статьи должна быть подпись руководителя учреждения, заверенная круглой печатью учреждения. На последней странице статьи должны быть подписи всех авторов. К статье прилагаются сведения об авторе, ответственном за контакты с редакцией (фамилия, имя, отчество, полный почтовый адрес, контактные телефоны, адрес электронной почты). При необходимости прилагается почтовый конверт с маркой.

Первая страница включает: УДК, инициалы и фамилии авторов, название статьи, полное название учреждения, а также резюме.

Резюме должно кратко отражать цель, методы, результаты исследования. Объем резюме не более 12 строк. Резюме завершают «ключевые слова» (от 3 до 10), способствующие индексированию статьи в информационно-поисковых системах. Далее следует перевод на английский язык предыдущей информации.

Обычно объем оригинальных статей — 8 страниц, научного обзора литературы — 12–15 страниц, кратких сообщений — 1,5 страницы.

Структура оригинальной статьи включает: введение — в нем формулируются цель и необходимость проведения исследования, кратко освещается состояние вопроса со ссылками на наиболее значимые публикации; материалы и методы — приводятся количественные и качественные характеристики исследованных (объектов исследования), а также упоминаются все методы исследований, применявшиеся в работе, включая методы статистической обработки данных. Результаты следует представлять в логической последовательности в тексте, таблицах и на рисунках. В обсуждении выделяются новые и важные аспекты результатов исследования, могут быть включены обоснованные рекомендации и краткое заключение.

Все аббревиатуры расшифровываются при первом упоминании в тексте.

Библиография. Список литературы составляется в алфавитном порядке (сначала работы отечественных авторов, затем — иностранных), печатается на отдельном листе. В тексте статьи библиографические ссылки обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках, в соответствии с нумерацией в списке литературы. При упоминании отдельных фамилий авторов в тексте им должны предшествовать инициалы

(фамилии иностранных авторов даются в оригинальной транскрипции). Рекомендуется в оригинальных статьях цитировать не более 15, а в обзорах — 50 источников. Пример составления списка литературы приводится ниже.

Статья должна быть написана грамотно, текст, таблицы и другие материалы тщательно выверены. Рукописи, оформленные не в соответствии с указанными правилами, к рассмотрению не принимаются и возвращаются авторам на доработку. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи.

Правила рецензирования рукописей. Все поступившие работы рецензируются специалистами в области, соответствующей профилю поступившей статьи. При необходимости осуществляется научное рецензирование с участием нескольких специалистов. По результатам рецензирования авторам направляются отзывы рецензентов и просьба внести в работы исправления. После исправления работы рецензируются повторно, при несогласии автора с мнением рецензента — направляются на рецензию независимому специалисту. Результаты рецензирования обсуждаются на заседаниях редакционной коллегии, где принимается окончательное решение о публикации работы. Рецензии в обязательном порядке предоставляются авторам рукописей и по запросам экспертных советов в ВАК.

Авторские права и ответственность. Редакция не несет ответственность за достоверность информации, приводимой авторами. Автор, направляя рукопись в Редакцию, поручает Редакции обнародовать произведение посредством его опубликования в печати.

Редакция при использовании рукописи вправе снабжать ее любым иллюстрированным материалом, рекламой и разрешать это делать третьим лицам. Автор, направляя рукопись в Редакцию, соглашается с тем, что Редакция переходит исключительные имущественные права на использование рукописи (переданного в редакцию журнала материала, в т.ч. такие охраняемые объекты авторского права как фотографии автора, рисунки, схемы, таблицы и т.п.), в том числе на воспроизведение в печати и в сети Интернет; на распространение; на перевод рукописи (материалов) на любые языки народов мира; экспорта и импорта экземпляров журнала со статьей Автора в целях распространения, на переработку, на доведение до всеобщего сведения. Указанные выше права Автор передает Редакции без ограничения срока их действия и на территории всех стран мира без ограничения, в т.ч. на территории Российской Федерации.

Редакция вправе переуступить полученные от Автора права третьим лицам и вправе запрещать третьим лицам любое использование опубликованных в журнале материалов. Автор гарантирует наличие у него исключительных прав на использование переданного Редакции материала. В случае нарушения данной гарантии и предъявления в связи с этим претензий к Редакции Автор самостоятельно и за свой счет обязуется урегулировать все претензии.

Редакция не несет ответственности перед третьими лицами за нарушение данных Автором гарантий. За Автором сохраняется право использования его опубликованного материала, его фрагментов и частей в личных, в том числе научных, преподавательских, целях. Права на рукопись считаются переданными Автором Редакции с момента подписания в печать номера журнала, в котором она публикуется. Перепечатка материалов, опубликованных в журнале, другими физическими и юридическими лицами возможна только с письменного согласия Редакции, с обязательным указанием номера журнала (года издания), в котором был опубликован материал.

Правила публикации. Публикация статьи платная и составляет в 2012 году 1300 рублей (до 8 страниц включительно), свыше — производится доплата 150 рублей за каждую страницу. Бесплатная публикация статьи предоставляется аспирантам, если аспирант является единственным автором научной статьи.

В обязательном порядке при направлении статьи в редакцию журнала просим Вас подписывать у каждого автора договор на передачу исключительных прав на произведение в соответствии с Частью 4 Гражданского кодекса РФ. Без подписания этого документа статьи не рассматриваются и к публикации не принимаются.

Договор автора с издательством (заполняется и подписывается всеми авторами и отправляется письмом, даты в договоре и акте указываются с интервалом в 10 дней).