

## THE EFFECT OF LOCAL APPLICATION OF ERYTHROPOIETIN ON DEATH INDICATORS OF LYMPHOCYTES IN THE BLOOD IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

Osikov M. V., Simonyan E. V., Saedgalina O. T., Bivalkevich V. A.

*Of the South Ural state medical University, Chelyabinsk, Russia*

To investigate the effect of local application of erythropoietin (EPO) in the composition of transdermal film (TDF) on the death's indicators of lymphocytes in the blood in dynamics of experimental thermal trauma (TI). The experiment was made out on 90 white nonlinear rats that were divided into groups: 1 – intact rats; 2 – animals with the TI and an aseptic bandage (n=40), 3 – animals with the TI application of the TDF with EPO (n=40). Modeling TI IIIA degree and area of 3.5% was carried out by immersing the interscapular region of the skin of the animal in clean water with a temperature of 98-99°C 12 s. In the preliminary studies was developed TDF on the basis of sodium carboxymethyl cellulose with EPO at the dose of 500 IU/g. The dressing was carried out daily. The study was conducted for 3rd, 5th, 8th and 14th days. Death's indicators of lymphocytes was assessed by staining cells with fluorochrome conjugated with annexin V and 7-aminoantipyrine D in flow cytometer "Navios". It is established that at TI at 3, 5 and 8 day increase in the number of lymphocytes with the phenotype of the Annexin-5-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> and Annexin-5-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>, 5 and 8 day reduced the number of lymphocytes with the phenotype of the Annexin-5-FITC<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup>. In the application of TDF with the EPO at the TI for 5 and 14 days reduced the number of lymphocytes with the phenotype of the Annexin-5-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>, 8 and 14 days, reduced the number of Annexin-5-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup> cells at 5 and 14 days increased lymphocytes Annexin-5-FITC<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup>. Thus, in TT the application of TDF with EPO leads to a decrease in blood lymphocytes with signs of apoptosis and necrosis.

*Key words:* thermal injury, transdermal film, erythropoietin, lymphocytes

## ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ

Отавина Е. А., Долгих О. В.

*ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия*

Проведен анализ маркерных показателей иммунной регуляции у детей в условиях избыточного поступления стронция с питьевой водой. Исследование показало, что маркеры специфической гиперчувствительности и медиаторы межклеточной иммунной регуляции: IgG специфический к стронцию, цитокины IL-6, IL-12, IL-17, α-TNF, LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> – спонтанные и специфически стимулированные, RANKL и остеопротегерин могут быть использованы для оценки риска нарушения здоровья в качестве ранних маркеров изменений иммунорегуляции у детей, проживающих в условиях экспозиции стронцием.

*Ключевые слова:* иммунорегуляция, лейкотриены, стронций

**Введение.** Особенности функционального состояния системы иммунной регуляции, определяющей адаптационные возможности и устойчивость организма в условиях возросшего воздействия химических факторов, могут выступать в качестве индикаторных критериев для решения задачи своевременного выявления патогенетических предпосылок развития заболеваний, в том числе аутоиммунных и аллергических [1,2]. При этом,

важное значение приобретает формирование комплекса маркерных показателей, отражающих специфичность и степень влияния факторов среды на иммунологическое здоровье населения [3].

Цель – анализ изменения иммунных регуляторных показателей у детей в условиях экспозиции стронцием.

Проведено иммунологическое диагностическое обследование 27 детей в возрасте от 7 до 12 лет, постоянно проживающих на территории с повышенным содержанием стронция в воде хозяйственно-бытового водоснабжения. Группу сравнения составили 51 ребенок из «условно чистого» района.

Определение гиперчувствительности по критерию IgG специфический к стронцию осуществляли методом аллергосорбентного тестирования. Содержание RANKL (рецептор активации ядерного фактора каппа), остеопротегерина определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Анализ IL-6, IL-17,  $\alpha$ -TNF в сыворотке, а также оценка секреции данных цитокинов путем активации мононуклеарных клеток цельной крови *ex vivo* стронцием исследовали методом ИФА с использованием тест-систем для определения цитокинов и «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» фирмы «Вектор-Бест».

Содержание IL-12 определяли с помощью иммуноферментных наборов «hIL-12+p40». Количественное определение лейкотриенов (CysLTC4/D4/E4) осуществляли с помощью «CAST ELISA» и ИФА-метода. Оценку действия митогенов и стронция на продукцию цитокинов и интерлейкинов определяли с помощью индекса влияния (ИВ) – отношения продукции цитокина или интерлейкина стимулированными клетками крови к уровню спонтанной продукции. Измерение содержания стронция в пробах крови выполнено методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500cx («Agilent Technologies Inc.», США) в соответствии с МУК 4.1.3230-14. Анализ химических соединений в водопроводной воде выполняли в соответствии с НСАМ № 480-Х. Статистическая обработка результатов включала в себя описательную статистику, использованы t-критерий Стьюдента и Манна-Уитни. Расчёт корреляционных связей проведен методом Пирсона (r). Различия между группами считались значимыми при  $p < 0,05$ .

Результаты исследований качества воды хозяйственно-питьевого водоснабжения свидетельствовали о превышении концентрации стронция на территории наблюдения относительно контрольной зоны в 6 раз. Содержание стронция в крови детей основной группы в 1,4 раза превышало референтный уровень и в 4 раза значения группы контроля. Также, в группе наблюдения установлен повышенный по сравнению с возрастной нормой уровень специфической сенсибилизации к стронцию по критерию IgG ( $0,142 \pm 0,08$  у.е. при норме  $< 0,1$ ). Кроме того, среднее содержание специфического IgG к стронцию у детей основной группы в 1,2 раза выше, чем в контрольной.

Проведенное исследование влияния стронция на остеометаболизм установило повышенное в 1,5 раза значение RANKL у детей группы наблюдения по сравнению с контрольной группой. Содержание остеопротегерина напротив, в основной группе было в 4 раза достоверно ниже аналогичного показателя группы контроля ( $p < 0,05$ ). Баланс между маркерами, характеризующийся соотношением RANKL/остеопротегерин у детей, проживающих в условиях повышенного содержания стронция был выше данного показателя детей, проживающих на территории с удовлетворительными санитарно-гигиеническими условиями, и составил 0,16 и 0,10 соответственно. Кроме того, в кровотоке обследуемой группы отмечается достоверно повышенная концентрация  $\alpha$ -TNF по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Анализ отношения шансов позволил установить достоверное ( $p < 0,05$ ) понижение концентрации RANKL при увеличении концентрации стронция в крови ( $R^2 = 0,80$  при  $p < 0,05$ ).

В результате исследования *ex vivo* воздействия стронция на цитокин-продуцирующую активность иммунокомпетентных клеток крови отмечена разница в динамике стимулированной стронцием продукции медиаторов в условиях предварительной сенсибилизации стронцием и её отсутствии (табл. 1). Анализ индуцируемой продукции IL-6, участвующего в процессах костного ремоделирования, показал в обследуемой группе более низкое значение по сравнению с уровнем продукции контрольной группы. Под влиянием стронция секреция цитокина возрастает в обеих группах. При этом в обследуемой группе выше кратность значения стимуляции. ИВ

**Таблица 1.** Спонтанная и индуцированная продукция лейкотриенов и интерлейкинов клетками периферической крови у школьников, значение медианы (25-75 % перцентилей) пг/см<sup>3</sup>

Показатели		IL-6	IL-12	IL-17	LTC4/D4/E4
Спонтанная Продукция	Группа контроля	637,5 (262,5-957,5)	48,84 (43,12-67,95)	2,26 (1,8575-2,62)	0,13 (0,12-22,91)
	Группа наблюдения	415 (144-997,5)	18,53 (7,89-29,01)*	2,41 (1,33-2,8)	124,74 (8,23-194,935)*
Продукция, индуцированная стронцием	Группа контроля	101500 (81000-166750)	37,41 (25,0-81,69)	2,47 (2,20-2,55)	1,53 (0,15-208,59)
	Группа наблюдения	52500 (39100-86325)*	24,38 (13-45,36)	1,45 (1,18-1,84)*	22,71 (0,7-128,7)*
Индекс влияния стронция	Группа контроля	143,38 (93,58-530,92)	1,03 (0,61-1,42)	1,04 (0,89-1,39)	2,22 (1,10-19,75)
	Группа наблю- дения	201,96 (55,04-423,89)	1,29 (0,85-1,77)	0,79 (0,37-1,36)*	0,46 (0,06-0,85)*

Примечание: \* – Разница достоверна по сравнению с группой контроля при значении  $p < 0,05$

стронция на синтез IL-6, как раннего медиатора, показывающего выраженную реакцию в условиях активации, превышает данный показатель остальных изучаемых цитокинов. Спонтанный уровень IL-12 в обследуемой группе ниже, чем в контрольной ( $p < 0,05$ ). Более значимые изменения в индуцированной выработке цитокина обнаруживаются в обследуемой группе. Отсутствует активирующее влияние стронция на экспрессию IL-17 в контрольной группе. Однако в группе детей, имеющих предварительную сенсибилизацию стронцием, наблюдается угнетение IL-17 после инкубации с металлом ( $p < 0,05$ ).

Исследование продукции лейкотриенов LTC4/D4/E4 показало, что у детей, подвергающихся воздействию стронция, по сравнению с детьми, проживающими в «условно чистом» районе, выше уровень спонтанного синтеза эйкозаноидов ( $p < 0,05$ ), при этом отмечается положительная коррелятивная взаимосвязь между уровнем металла в крови и концентрацией LTC4/D4/E4 ( $r = 0,42$ ;  $p < 0,05$ ). После проведения клеточной стимуляции в обследуемой группе наблюдается ингибирующий эффект, синтез лейкотриенов составляет 0,46 от спонтанного уровня, в то время как активация высвобождения *de novo* лейкотриенов в контрольной группе повышена в 2,22 раза ( $p < 0,05$ ). При этом уровень стронций-индуцированной продукции LTC4/D4/E4 в обследуемой группе

достоверно выше, чем в контрольной. Кроме того, отмечено, что при возрастании концентрации стронций-индуцированных лейкотриенов LTC4/D4/E4 детектируется достоверно повышенный уровень секреции индуцированного IL-17, а также повышается кратность индукции стронцием синтеза IL-17 и  $\alpha$ TNF.

Таким образом, по результатам иммунологического обследования школьников, экспонированных стронцием, выявлены нарушения иммунной реактивности и гиперчувствительности, которые проявились супрессией ИЛ-17, повышением содержания антител к стронцию в группе наблюдения в 1,2 раза, а также повышением отношения RANKL/остеопротегерин и изменением спонтанной и индуцированной продукции лейкотриенов и интерлейкинов клетками периферической крови у группы наблюдения по сравнению с контролем.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Лужецкий К. П., Андреева Е. Е. Российский иммунологический журнал 2014; 8(3):299-302. [Dolgikh O. V., Zaitseva N. V., Luzhetsky K. P., Andreeva E. E. Russian Journal of Immunology 2014; 8 (3): 299-302.]
2. Ланин Д. В., Лебедева Т. М. Гигиена и санитария 2016; 1: 94-96. [Lanin D. V., Lebedeva T. M. Hygiene and Sanitation 2016; 1: 94-96.]
3. Онищенко Г. Г. Гигиена и санитария 2015; 3: 5-9. [Onishchenko G. G. Hygiene and Sanitation 2015; 3: 5-9.]

## CHANGES OF IMMUNE REGULATORY INDICATORS AT CHILDREN IN THE CONDITIONS OF AN EXPOSITION STRONTIUM

Otavina E. A., Dolgich O. V.

*FBUN «Federal scientific center of medico-preventive technologies  
of risk management to health of the population, Perm, Russia*

The analysis of marker indicators of immune regulation at children in the conditions of excess intake of strontium with drinking water is carried out. Research showed that markers of specific hypersensitivity and mediators of intercellular immune regulation: IgG specific to strontium, cytokines of IL-6, IL-12, IL-17,  $\alpha$ -TNF, LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> – spontaneous and specifically stimulated, and osteoprotegerin can be used by RANKL for an assessment of risk of violation of health as early markers of changes of immunoregulation at the children living in exposition conditions strontium.

*Key words:* immunoregulation, leukotrienes, strontium

---

---

## УРОВЕНЬ СПОНТАННОЙ И СТИМУЛИРОВАННОЙ АНТИТЕЛАМИ К CD3 ЭКСПРЕССИИ CD38 НА Т-ЛИМФОЦИТАХ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Пашнина И. А.<sup>1,2</sup>

*<sup>1</sup>Областная детская клиническая больница; <sup>2</sup>Институт иммунологии  
и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия*

Обследованы дети 6-17 лет с системной красной волчанкой (n=10), с ювенильной склеродермией (n=10), с ювенильным идиопатическим артритом (n=47), а также здоровые дети соответствующего возраста (n=30). Методом проточной цитометрии выявлено, что после 24-х часовой инкубации (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) спонтанное и стимулированное антителами к CD3 количество CD38-позитивных Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток у больных с ревматическими заболеваниями было ниже контрольного уровня.

*Ключевые слова:* экспрессия CD38, аутоиммунные заболевания, проточная цитометрия

**Введение.** CD38 – мембранный гликопротеин, обладающий рядом ферментативных функций, является одним из «ранних» активационных маркеров лимфоцитов. Он участвует в регуляции концентрации внутриклеточного кальция, в активации Т-лимфоцитов и в процессах их селекции в тимусе, проявляет эктонуклеотидазную, аденозиндифосфат-рибозил-циклазную, циклический аденозиндифосфат-рибозил-гидролазную и другие активности [1, 2]. Т-лимфоциты экспрессируют CD38 после стимуляции антителами против специфических антигенных рецепторов, взаимодействие CD38 с экто-моно-АДФ-рибозилтрансферазами является одним из меха-

низмов, определяющих баланс между выживанием и программируемой клеточной гибелью активированных клеток [3].

Наибольшее число публикаций, в которых оценена экспрессия CD38 на Т-лимфоцитах, посвящено ВИЧ-инфекции и СПИД, при которых наблюдается экстремальное увеличение CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> и, особенно, CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-лимфоцитов, причем число этих клеток позитивно коррелирует с тяжестью заболевания и с неблагоприятным прогнозом [4,5]. Имеются лишь единичные литературные источники, посвященные исследованию уровня экспрессии CD38 при аутоиммунной патологии [6, 7, 8].