

- И. А. Булатова, А. П. Щекотова, Ю. И. Третьякова и др. // Новости «Вектор-Бест» - № 2. - 2014. - С. 8-13.
2. Куликов В. Е., Тонеева М. А., Емелина Т. А. и др. // Международный научно-исследовательский журнал. 2015 № 4. DOI: 10.18454/IRJ.2227-6017-<http://research-journal.org/medical/citokinovyj-status-u-bolnyx-cirroزامi-pecheni-virusnoj-etologii/>
3. Пузырев В. П., Фрейдлин М. Б. Роль генов интерлейкинов и их рецепторов в формировании предрасположенности к атопической бронхиальной астме // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. - 1999. Т. 127. - Прил. 1. - С. 3-6

## PECULIARITIES OF IMMUNOLOGICAL RESPONSE DURING LIVER CIRRHOSIS DEPENDING ON SEVERITY LEVEL

Paducheva S. V.<sup>1</sup>, Dolgikh O. V.<sup>2</sup>, Bulatova I. A.<sup>1</sup>, Shyokotova A. P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>"Perm State Medical University named after E. A. Wagner" of the Ministry of Healthcare of Russia;  
<sup>2</sup>FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Perm, Russia

It has been established that the level of IL-6 in patients with subcompensated CP (class B) was significantly higher than in the compensated stage ( $p < 0.001$ ), and also had significant differences in patients with subcompensated and decompensated CP ( $p < 0.001$ ). The concentrations of VEGF and G-CSF significantly increased at the stage of severe cirrhosis ( $p < 0.001$  and  $p = 0.04$ , respectively). Proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and anti-inflammatory IL-4 significantly increased during transition to the subcompensated stage of the disease ( $p = 0.01$  and  $p = 0.04$ , respectively). There are no reliable differences between allelic variations of polymorphic gene loci *TNF* (G4682A), *IL-6* (C174G) and *VEGFA* (G-634C), associated with liver cirrhosis severity levels, detected by us.

*Key words:* IL-6, VEGF, gen *VEGFA* (G-634C), liver cirrhosis

## СПОНТАННАЯ И СТИМУЛИРОВАННАЯ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНОМ ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ CD25, CD38 И CD69 Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

Пашнина И. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница № 1; <sup>2</sup>ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Обследованы дети с системной красной волчанкой, ювенильным и реактивным артритом, хроническим гепатитом С, здоровые дети. Спонтанное количество CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> у детей с гепатитом и CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> у детей с ревматическими заболеваниями не отличалось от контроля, а после стимуляции фитогемагглютинином было ниже, чем у здоровых.

*Ключевые слова:* Т-лимфоциты, проточная цитометрия, дети

Исследование экспрессии маркеров активации широко используется для оценки функционального состояния лимфоцитов. Спонтанное количество клеток, экспрессирующих активационные маркеры, в физиологических условиях может составлять лишь несколько

процентов, использование стимуляции позволяет выявить не только повышение экспрессии исследуемой молекулы при патологии, но и ее снижение [1]. Стимуляция поликлональными активаторами *in vitro*, например, фитогемагглютинином (ФГА) или конкавалонином А,

позволяет исследовать общую реактивность той или иной популяции клеток, и может быть использована как универсальный метод для исследования различных патологических процессов, независимо от их этиологии и патогенетических особенностей. Выбор агента для стимуляции зависит от исследуемой клеточной популяции, поскольку существуют митогены, преимущественно активирующие определенные клетки. Например, ФГА в большей степени индуцирует пролиферацию Т-лимфоцитов [2].

Наиболее удобными объектами исследования при стимуляции *in vitro* являются рецепторы, экспрессия которых увеличивается за короткий промежуток времени, что облегчает выполнение лабораторных исследований. Молекулы CD25, CD38 и CD69 относятся к так называемым «ранним» активационным маркерам Т-лимфоцитов, экспрессия которых после индукции значительно возрастает уже в первые сутки [2]. CD25 является  $\alpha$ -цепью гетеродимерного компонента высокоаффинного рецептора IL-2, формирование которого необходимо для вступления Т-лимфоцитов в пролиферацию в ответ на антигенный стимул [3]. CD38 – мембранный фермент с целым рядом функций, одной из которых является регуляция концентрации внутриклеточного кальция, CD38 принимает участие в активации Т-лимфоцитов и в процессах их селекции в тимусе [4]. CD69 также участвует в повышении уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , усилении экспрессии генов IL-2 и IFN- $\gamma$ , в процессах выхода тимоцитов из тимуса и перемещениях периферических Т-клеток [5].

Целью настоящего исследования явилась оценка количества Т-лимфоцитов, экспрессировавших маркеры «ранней» активации CD25, CD38 и CD69, при заболеваниях различной этиологии у детей.

Обследованы дети 6-17 лет с различными заболеваниями в стадии активности: с хроническим вирусным гепатитом С (n=23), с аутоиммунным заболеванием – системной красной волчанкой (СКВ, n=13), с аутоиммунно-аутовоспалительным заболеванием – ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, n=61), с заболеванием смешанной инфекционно-аутоиммунной природы – реактивным артритом (РеА, n=11), а также условно здоровые дети в качестве контрольной группы (n=31). Оценка спонтанной и индуцированной экспрессии CD25, CD38 и CD69 на Т-лимфоцитах (CD3<sup>+</sup>)

проводилась методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA). Предварительно образцы цельной гепаринизированной периферической крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия) в соотношении 1:9 и инкубировали при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> в течение 4-х часов (CD69) и в течение 24-х часов (CD25, CD38) без стимулятора и при стимуляции фитогемагглютинином (ФГА, Sigma) в конечной концентрации 20 мкг/мл. Для математического анализа данных использовали ковариационный анализ в рамках унифицированного аппарата теории общих линейных моделей. Результаты представлены в процентах от общего количества CD3<sup>+</sup> лимфоцитов в виде средних значений и 95 % доверительных интервалов: М (95 % ДИ).

Согласно полученным результатам, у здоровых детей количество CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> после инкубации без стимулятора составило 1,6 (1,3-2,0)%. У больных с РеА, ЮИА и СКВ численность этой субпопуляции не отличалась от таковой в контрольной группе. При ХГС количество CD69-позитивных Т-лимфоцитов было существенно выше, чем у здоровых детей (4,8 (3,7-6,2)%;  $p < 0,001$ ). После инкубации с ФГА количество CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, у здоровых детей и больных с ХГС, напротив, не различалось (73,7 (61,4-81,5)% и 66,4 (54,9-76,3)%, соответственно), а у детей с ревматическими заболеваниями было в 0,5-0,7 раза ниже, чем в контроле ( $p < 0,05$ ).

Количество Т-лимфоцитов, экспрессировавших CD25, в группе УЗД в среднем равнялось 8,9 (7,9-10,1)%. У больных с ХГС число этих клеток не отличалось от контрольного значения, а у детей с РеА, ЮИА и СКВ было в 0,6-0,7 раза меньше, чем у здоровых детей ( $p < 0,05$ ). После инкубации с митогеном количество CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> у больных с ревматическими заболеваниями было также в 0,7 раза ниже, чем в контрольной группе (50,9 (44,8-56,9)%), однако статистически значимые различия выявлены только для группы с ЮИА ( $p < 0,01$ ). Стимулированное количество CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> у детей с вирусным гепатитом С было в 0,6 раза ниже, чем в контроле ( $p < 0,01$ ).

Спонтанное и стимулированное количество CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> у здоровых детей составило 37,8 (33,1-42,7)% и 66,2 (59,7-72,2)%, соответственно. Спонтанное количество CD38-позитивных клеток во всех исследованных группах больных было ниже контрольных значений в 0,4-0,7 раза

( $p < 0,001$ ), а стимулированное – в 0,5-0,8 раза ( $p < 0,05$ ).

Можно заключить, что стимуляция митогеном позволила выявить закономерности, не проявлявшиеся при оценке спонтанной экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитами. В частности, спонтанное количество CD25-позитивных клеток у детей с ХГС и CD69-позитивных клеток у больных с ревматическими заболеваниями не отличалось от контрольных значений, а после стимуляции митогеном численность этих субпопуляций была ниже, чем у здоровых детей. Таким образом, стимуляция *in vitro* может служить дополнительным источником информации о функциональном состоянии лимфоцитов при различной патологии.

Автор приносит искреннюю благодарность врачам ГБУЗ СО «ОДКБ № 1» Козловой Е. С., Скоробогатовой О. В., Салехиной Е. Н. и Каракиной М. Л. за подбор пациентов для исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lisowska K. A., Dębska-Ślizień A., Jasiulewicz A., Heleniak Z., Bryl E. et al. Hemodialysis Affects Phenotype and Proliferation of CD4-Positive T Lymphocytes. *J. Clin. Immunol.* 2012, 32, 189-200.
2. Lastovicka J., Budinsky V., Spisek R., Bartunkova J. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. *Cellular Immunology.* 2009, 256, 79-85.
3. Benczik M., Gaffen S. L. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol. Invest.* 2004, 33 (2), 109-142.
4. Bahri R., Bollinger A., Bollinger T., Orinska Z., Bulfone-Paus S. Ectonucleotidase CD38 Demarcates Regulatory, Memory-Like CD8<sup>+</sup> T Cells with IFN- $\gamma$ -Mediated Suppressor Activities. *PLoS ONE*, 2012, 7(9), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3444472/>
5. Feng C., Woodside K. J., Vance B. A., Vance B. A., El-Khoury D. et al. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int. Immunol.* 2002, 14, 535-544.

## SPONTANEOUS AND PHYTOGEMAGGLUTININ-STIMULATED EXPRESSION OF ACTIVATION MARKERS CD25, CD38, CD69 ON T-LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH DIFFERENT PATHOLOGY

Pashnina I. A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Regional Children's Clinical Hospital № 1, <sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology,  
Urals Branch of the Russian Acad. Sci., Yekaterinburg, Russia

Children with systemic lupus erythematosus, juvenile arthritis, reactive arthritis, chronic hepatitis C and conditionally healthy children were investigated. Spontaneous number of CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in children with hepatitis and number of CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> in patients with rheumatic diseases were similar to the control, after stimulation by phytohemagglutinin the amount of these subpopulations was less, then in healthy children.

*Key words:* T-lymphocytes, flow cytometry, children