

Российская академия наук

# РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

## Russian Journal of Immunology

Том 13 (22), №4

2019

Октябрь – Декабрь

Журнал основан в 1996 г.

Выходит 4 раза в год

ISSN 1028-7221

*Журнал издается под руководством отделения биологических наук РАН  
при участии Российского научного общества иммунологов*

*Главный редактор*

В.А. Черешнев

*Редакционная коллегия:*

В.А. Козлов (*зам. главного редактора*),  
И.Г. Козлов (*зам. главного редактора*), А.П. Ризопулу (*отв. секретарь*), Г.А. Бочаров,  
Ф.Ю. Гариб, З.Г. Кадагидзе, Э.В. Карамов (*зам. главного редактора*),  
А.В. Караулов, Е.А. Корнева, С.А. Недоспасов,  
И.В. Нестерова, Р.В. Петров, А.В. Полевщиков, А.П. Продеус, Р.И. Сепиашвили,  
А.С. Симбирцев, Н.Ю. Сотникова, А.А. Тотолян, Т.Г. Федоскова, И.С. Фрейдлин, Р.М. Хаитов,  
С.Б. Чекнёв, М.В. Черешнева

*Редакционный совет:*

А.Я. Арион, И.П. Балмасова, А.Н. Глушков, И.С. Гуцин, М.В. Дегтярева,  
Н.А. Зорин, И.П. Корюкина, Г.А. Невинский, М.Б. Раев, А.Г. Румянцев,  
Л.П. Сизякина, И.А. Тузанкина, В.С. Ширинский, К.В. Шмагель

*Международный редакционный совет (по согласованию)*

И. Беляков (США), Г.Н. Дранник (Украина), Д.К. Новиков (Белоруссия),  
А. Полторак (США), А. Руденский (США), М.С. Vene (Франция),  
J.L. Fahey (США), М. Sela (Израиль), Н. Stockinger (Австрия)

**Адрес редакции:** 119991 ГСП-1 Москва В-334 Ленинский проспект, 32а, каб. 423

Тел.: 8-903-567-0714, Факс: (495) 434-6212

E-mail: ruimm@yandex.ru

Сайт: [www.immunoforum.ru](http://www.immunoforum.ru)

**Журнал включен в перечень изданий, рекомендованных ВАК  
для публикации научных результатов диссертации на соискание  
ученой степени кандидата и доктора наук**

**Журнал цитируется в Chemical Abstracts, Index Medicus/Medline/PubMed**

**Москва**

---

© Российская академия наук, 2019

© Составление. Редакция

«Российский иммунологический журнал», 2019



# СОДЕРЖАНИЕ

Том 13 (22), № 4, 2019

## Обзор

- Г. Ф. Железникова, Н. В. Скрипченко, Л. А. Алексеева, Е. Ю. Скрипченко*  
Иммунный ответ на герпесвирусы и рассеянный склероз 1331

## Оригинальные статьи

- А. М. Тимофеева, Г. А. Невинский*  
Системная красная волчанка: анализ возможной локализации активных центров в белковой последовательности моноклональной легкой цепи (NGTA1-Me-pro) с двумя металлопротеазными активностями 1347
- Е. Г. Поленок, В. И. Минина, Л. А. Гордеева, С. А. Мун, А. В. Рыжкова, А. А. Глушков, А. И. Rogozin, В. А. Луценко, Н. Е. Вержбицкая, И. А. Вафин*  
Ассоциации специфических иммунных реакций на химические канцерогены и стероидные гормоны с генетическим полиморфизмом ферментов репарации ДНК при раке молочной железы 1365
- Л. М. Куртасова, Р. А. Зуков, А. А. Савченко, Н. А. Шакина*  
Изменение показателей интерферонового статуса у больных местно-распространенным раком почки в динамике заболевания 1372
- Ю. С. Анциферова, А. И. Малышкина, Л. Х. Абдуллаева*  
Нарушение дифференцировки В-лимфоцитов крови и перитонеальной жидкости у пациенток с эндометриозом и бесплодием 1377
- В. Д. Беленюк, А. А. Савченко, А. Г. Борисов, И. В. Кудрявцев*  
Зависимость фенотипа Т-лимфоцитов крови от исхода распространенного гнойного перитонита 1385
- И. В. Образцов, А. Ю. Рябов, Н. С. Цуранова, Е. В. Балыкова, А. И. Парамонов*  
Функциональная активность нейтрофилов у пациентов с послеоперационными инфекционно-септическими осложнениями 1393
- М. А. Смердова, Т. А. Мамаева, М. А. Наумова, К. А. Корецкий, Д. С. Иванов, А. П. Топтыгина*  
Опыт проведения внутрилабораторного контроля качества при определении антител класса G к вирусу кори методом иммуноферментного анализа с помощью контрольного препарата 1402
- С. Н. Клюева, А. Л. Кравцов, С. А. Бугоркова, Т. Н. Шуковская, В. А. Кожевников, А. Ю. Гончарова*  
Фагоцитарная и цитокин-продуцирующая активность лейкоцитов крови мышей линии BALB/C, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием 1412

## Краткие сообщения

- Пятая научно-практическая школа-конференция «АЛЛЕРГОЛОГИЯ и КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ПРАКТИКУЮЩИХ ВРАЧЕЙ» 1421
- А. А. Аклеев, И. И. Долгушин, Е. А. Блинова*  
Исследование динамики числа нейтрофилов в крови у облучённых лиц до развития острых лейкозов 1423
- А. Д. Алымкулова, К. А. Айтбаев, Б. Т. Орозбекова*  
Диагностическое значение определения общих антител класса IgE при аллергии к местным анестетикам 1426

<i>М. С. Бляхер, И. М. Федорова, С. И. Котелева, З. К. Рамазанова, С. Ю. Комбарова, И. Г. Мартыненко, Е. А. Тульская</i>	
Гуморальный и клеточный иммунитет у людей, вакцинированных и ревакцинированных против менингококковой инфекции	1429
<i>С. А. Борисов, А. А. Савченко, Э. В. Каспаров, М. В. Маценко, И. В. Кудрявцев</i>	
Типы иммунного реагирования при пролежнях	1432
<i>Е. Г. Бугаенко, Н. Л. Потапова, И. Н. Гаймоленко, А. Н. Власова</i>	
Витамин Д – статус детей с рекуррентными респираторными инфекциями и бронхиальной астмой	1435
<i>Ж. П. Васнева, М. В. Мокеева</i>	
Гистаминлиберация и динамика CD45 лейкоцитов у пациентов с лекарственной непереносимостью (ЛН)	1438
<i>Ж. П. Васнева, М. В. Мокеева</i>	
Характеристика спектра сенсибилизации у пациентов с аллергическими заболеваниями (АЗ)	1441
<i>М. А. Вульф, Д. А. Скуратовская, А. Р. Соболева, С. А. Степанян, Е. В. Кириенкова, Л. С. Литвинова</i>	
Роль висфатина в патогенезе инсулинорезистентности	1444
<i>И. Н. Гаймоленко, А. И. Петрова, Н. Л. Потапова</i>	
Механизмы формирования бронхиальной обструкции у детей дошкольного возраста	1447
<i>А. М. Гапонов, В. М. Писарев, А. В. Тутельян</i>	
Супрессия Т-клеточных ответов ГМКСФ-индуцированными гранулоцитарными миелоидными регуляторными клетками, активированными бактериальным липополисахаридом	1450
<i>Д. В. Горенков, Т. Н. Никитина, А. Р. Волгин, В. И. Климов</i>	
Характеристика вакцин против ВПЧ: мировой опыт применения	1454
<i>Л. А. Дмитриева, Ю. И. Пивоваров, В. Ф. Лебедев</i>	
Изменение характера связи между иммунологическими факторами у пациентов с коксартрозом до и после эндопротезирования	1457
<i>В. Г. Дробышевская, О. А. Кривицун</i>	
Клинический опыт применения препарата «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS» в качестве заместительной терапии у пациентов с первичным иммунодефицитом	1460
<i>Л. Ш. Дудченко</i>	
Патогенетические особенности фенотипов-кластеров бронхиальной астмы на этапе реабилитации	1463
<i>Ю. Н. Емелина, И. М. Криволапова</i>	
Значимость компонентной диагностики при респираторной пыльцевой аллергии	1466
<i>А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, М. А. Добрынина, Л. О. Фомина, А. И. Файзуллина, В. А. Гриценко</i>	
Нейтрофилы как цитокинопродуцирующие клетки	1469
<i>А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, М. А. Добрынина, Л. О. Фомина, А. И. Файзуллина, В. А. Гриценко</i>	
Различные применения метода исследования уровней цитокинов нейтрофилов	1472
<i>С. В. Кныш, Е. С. Мачтарева, А. И. Симакова, В. Е. Красников</i>	
Уровень основного белка миелина при варицелла зостерной инфекции	1476

<i>М. Н. Козлова, В. М. Земсков, А. А. Алексеев, Н. С. Шишкина, А. А. Барсуков, В. С. Демидова</i>	
Характер иммунных нарушений и возможности иммунокоррекции при ожоговой болезни	1479
<i>Я. И. Козлова, Е. В. Бурьгина, А. В. Соболев, Н. Н. Климко</i>	
Тест активации базофилов в диагностике хронической крапивницы	1482
<i>Ю. А. Комах, С. А. Борзенко, Т. В. Радыгина, С. В. Петричук, Д. Г. Герасимова</i>	
Метаболизм популяций лимфоцитов в прогнозе результата повторной трансплантации роговицы	1485
<i>А. С. Кузнецов, А. С. Хохлова, М. С. Урбанова, Е. В. Маркелова, Н. П. Емельянова, А. А. Петров</i>	
Иммунологические предикторы неэффективности препаратов первой линии при первичной открытоугольной глаукоме	1488
<i>О. В. Курмышкина, А. А. Богданова, П. И. Ковчур, Т. О. Волкова</i>	
Коэкспрессия маркеров контрольных иммунных точек PD-1, PD-L1, TIM3 и LAG3 в популяциях циркулирующих и опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов при ранних формах рака шейки матки	1491
<i>В. А. Лазанович, А. В. Костюшко, В. Б. Шуматов</i>	
Определение уровня CD64 на нейтрофилах у пациентов с хирургическим сепсисом	1494
<i>Л. С. Литвинова, К. А. Юрова, В. В. Шуплецова, О. Г. Хазиахматова, Е. С. Мелашенко, В. В. Малащенко, Е. О. Шунькин, Ю. П. Шаркеев, Е. Г. Комарова, М. Б. Седельникова, И. К. Норкин, К. И. Прокин, П. А. Иванов, И. А. Хлусов</i>	
Реакция активированных моноклеаных клеток на сокультивирование с титановыми матриксами, несущими кальцийфосфатное покрытие	1497
<i>Э. С. Майназарова, В. С. Тойгомбаева, А. Ж. Мырзакулова, Н. С. Тюмонбаева</i>	
Анализ результатов реакции специфического лизиса лейкоцитов на лекарственные средства у лиц, страдающих ишемической болезнью сердца в Кыргызской Республике	1500
<i>Е. В. Маркелова, О. И. Фомина, В. Г. Фисенко, В. Ю. Арсенина</i>	
Уровень матриксной металлопротеиназы 8 и тканевого ингибитора 1 типа при остром повреждении почек после кардиохирургических вмешательств	1503
<i>М. Е. Меняйло, В. В. Малащенко, О. Б. Мелашенко, Е. О. Шунькин, А. Г. Гончаров</i>	
Интерлейкин-8 потенцирует провоспалительную активность активированных моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов человека	1506
<i>Т. А. Невежкина, Л. С. Матюшкина, А. П. Серебрякова, О. Н. Сидорова, М. С. Тулупова</i>	
Уровень интерферонов лямбда 1 и 3 типов в сыворотке крови у женщин с папилломавирусной инфекцией	1509
<i>И. В. Нестерова</i>	
Таргетная иммунотерапия при вторичных иммунодефицитах с инфекционным синдромом	1512
<i>Т. Н. Никитина, И. Е. Жук, Д. В. Горенков, В. И. Климов</i>	
Разработка национальных требований к проведению доклинических исследований вакцин против вируса папилломы человека, как важнейшая задача в регулировании исследований отечественных вакцин	1517
<i>М. С. Ниязалиева, В. С. Тойгомбаева, А. Э. Мергенов, И. Ш. Альджамбаева</i>	
Влияние иммунизации на заболеваемость вирусными гепатитами в Кыргызской Республике	1520
<i>М. С. Ниязалиева, В. С. Тойгомбаева, С. Т. Карагулова</i>	
Заболеваемость вирусным гепатитом В медицинских работников в Кыргызской Республике	1522

<i>Н. Ю. Пономарева, В. Г. Митьковский, Е. Н. Ямпольская, А. В. Кочетков, В. В. Лазарев</i> Генетически обусловленные молекулярные механизмы развития спинального инсульта у пациента с рецидивирующей вирусной инфекцией	1525
<i>О. А. Радаева, А. С. Симбирцев, Ю. А. Костина, М. С. Искандярова</i> Динамика уровней цитокинов в сыворотке крови у больных с метаболическим синдромом при применении статинов	1528
<i>Т. В. Радыгина, А. С. Илларионов, Д. Г. Герасимова, А. О. Анушенко, Ю. А. Комах, А. С. Потапов, С. В. Петричук, А. П. Фисенко</i> Эффективность инфликсимаба у детей с ВЗК в зависимости от уровня циркулирующих цитокинов и концентрации препарата	1531
<i>Е. С. Романова, О. М. Филипович, Н. И. Кузнецов</i> Некоторые факторы риска вертикальной передачи вирусного гепатита С	1534
<i>В. В. Трошина, Н. З. Зокиров, В. Д. Гладких</i> К вопросу диагностики дисфункции иммунитета у детей, проживающих в условиях воздействия потенциальных антропогенных нагрузок	1537
<i>З. А. Хохлова, Р. А. Гилёва, Т. В. Серeda, Т. В. Маянская, В. Н. Карпова, Н. А. Никифорова, Е. В. Захарова</i> Вирусный гепатит Е. Трудности диагностики	1540
<i>М. И. Худякова, Н. А. Черевко, К. В. Березовская</i> Связь витамина D, пищевой гиперчувствительности и провоспалительных цитокинов у детей с расстройством аутистического спектра	1543
<i>С. В. Чечетова, Р. М. Кадырова, З. К. Джолбунова, Э. С. Майназарова</i> Сравнительный анализ уровня IgE у детей с острыми вирусными инфекциями	1546
<i>Н. В. Шабашова, Е. В. Фролова, Л. В. Филиппова, А. Е. Учеваткина</i> Орофарингеальный кандидоз: этиология, факторы риска и иммунопатология развития у больных гемобластозами	1549
<i>В. А. Шмаров, А. Г. Гончаров</i> Применение моделей культивирования с интерлейкином-7 <i>in vitro</i> для оценки функциональной активности Т-лимфоцитов	1552
<i>Л. С. Литвинова, К. А. Юрова, В. В. Шуплецова, О. Г. Хазиахматова, Е. С. Мелашенко, В. В. Мелашенко, Е. О. Шунькин, Ю. П. Шаркеев, Е. Г. Комарова, М. Б. Седельникова, И. К. Норкин, К. И. Прокин, П. А. Иванов, И. А. Хлусов</i> Роль трехмерных матриц, имитирующих регенерирующую костную ткань в формировании пула гемопоэтических стволовых клеток в условиях культивирования <i>in vitro</i>	1555

# CONTENTS

---

---

Vol. 13 (22), No 4, 2019

---

---

## Review Articles

- G. F. Zheleznikova, N. V. Skripchenko, L. A. Alekseeva, E. Y. Skripchenko*  
Immune responses to herpesviruses and multiple sclerosis 1346
- 

## Research Articles

- A. M. Timofeeva, G. A. Nevinsky*  
Systemic lupus erythematosus: analysis of possible localization of active sites in a protein sequence of monoclonal light chain (NGTA1-Me-pro) with metalloprotease activities 1364
- E. G. Polenok, V. I. Minina, L. A. Gordeeva, S. A. Mun, A. V. Ryzhkova, A. A. Glushkov, A. I. Rogozin, V. A. Lutsenko, N. E. Verzhbitskaya, I. A. Vafin*  
Associations of the specific immune reactions on the chemical carcinogens and steroid hormones with the gene polymorphisms of DNA-repair enzymes in breast cancer patients 1371
- L. M. Kurtasova, R. A. Zukov, A. A. Savchenko, N. A. Shakina*  
Changes in the interferonal status indicators in patients of the local-distributed kidney cancer in the dynamics of the disease 1375
- Yu. S. Antsiferova, A. I. Malyshkina, L. H. Abdullaeva*  
Impairment of the differentiation of peripheral blood and peritoneal fluid B-lymphocytes in patients with endometriosis and infertility 1384
- V. D. Belenjuk, A. A. Savchenko, A. G. Borisov, I. V. Kudryavtsev*  
Dependence of the blood T-lymphocytes phenotype from the outcome of the widespread purulent peritonitis 1392
- I. V. Obraztsov, A. Yu. Ryabov, N. S. Tsuranova, E. V. Balykova, A. I. Paramonov*  
Neutrophil function in patients with postsurgery infectious septic complications 1401
- M. A. Smerdova, T. A. Mamaeva, M. A. Naumova, K. A. Koretsky, D. S. Ivanov, A. P. Toptygina*  
Experience of intra-laboratory quality control application at determination of class G antibodies to measles virus by immune-enzyme analysis method using control drug 1411
- S. N. Klyueva, A. L. Kravtsov, S. A. Bugorkova, T. N. Schukovskaya, V. A. Kozhevnikov, A. Yu. Goncharova*  
Blood leukocyte phagocytic and cytokine-producing activity of anti-plague vaccinated BALB/C line mice against the background of immunomodulation by polyoxidonium 1419
- 

## Short Communication

- The Fifth Scientific-Practical School-Conference «ALLERGOLOGY and CLINICAL IMMUNOLOGY» 1421
- A. A. Akleyev, I. I. Dolgushin, E. A. Blinova*  
Study of neutrophil count dynamics in exposed persons during the period prior to acute leukemias development 1425
- A. D. Alymkulova, K. A. Aitbaev, B. T. Orosbekova*  
Detection of IgE-antidodies to local anaesthetics and its diagnostic value 1428

<i>M. S. Blyakher, I. M. Fedorova, S. I. Koteleva, Z. K. Ramazanova, S. Yu. Kombarova, I. G. Martynenko, E. A. Tulskaya</i>	
Humoral and cellular immunity in humans vaccinated and revaccinated against meningococcal infection	1431
<i>S. A. Borisov, A. A. Savchenko, E. V. Kasparov, M. V. Matsenko, I. V. Kudryavtsev</i>	
Types of immune response during bedsores	1434
<i>E. G. Bugaenko, N. L. Potapova, I. N. Gaymolenko, A. N. Vlasova</i>	
Vitamin D status of children with recurrent infections and asthma	1437
<i>Zh. P. Vasneva, M. V. Mokeeva</i>	
Histaminliberation and CD45 dynamic in drug hypersensitivity (DHS) patients	1440
<i>Zh. P. Vasneva, M. V. Mokeeva</i>	
Characteristic of sensibilisation spectrum in atopic	1443
<i>M. A. Vulf, D. A. Skuratovskaya, A. R. Soboleva, S. A. Stepanian, E. V. Kirienkova, L. S. Litvinova</i>	
Role of visfatin in the pathogenesis of insulin resistance	1446
<i>I. N. Gaymolenko, N. L. Potapova, A. I. Petrova</i>	
Mechanisms of formation of bronchial obstruction in children of preschool age	1449
<i>A. M. Gaponov, V. M. Pisarev, A. V. Tutelyan</i>	
GM-CSF-induced granulocytic myeloid regulatory cells are activated by bacterial lipopolysaccharide to suppress human T-cell responses	1453
<i>D. V. Gorenkov, T. N. Nikitina, A. R. Volgin, V. I. Klimov</i>	
Characterization of human papillomavirus vaccines: the world experience	1456
<i>L. A. Dmitrieva, Yu. I. Pivovarov, V. F. Lebedev</i>	
Changes in the interrelations between immunological factors in patients with coxarthrosis before and after endoprothesis	1459
<i>V. G. Drobyshevskaya, O. A. Krivtsun</i>	
Clinical experience with immunoglobulin sigardis as replacement therapy in patients with primary immunodeficiency	1462
<i>L. Sh. Dudchenko</i>	
Pathogenetic features of phenotypes clusters of bronchial asthma at the rehabilitation stage	1465
<i>Yu. N. Emelina, I. M. Krivolapova</i>	
Significance of component diagnostic in pations with respiratory pollen allergy	1468
<i>A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, M. A. Dobrynina, L. O. Fomina, A. I. Fayzullina, V. A. Gritsenko</i>	
Neutrophils as the cytokine producing cells	1471
<i>A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, M. A. Dobrynina, L. O. Fomina, A. I. Fayzullina, V. A. Gritsenko</i>	
Various applications of a method of a research of levels of cytokin of neutrophils	1474
<i>S. V. Knysh, E. S. Machtareva, A. I. Simakova, V. E. Krasnikov</i>	
The level of myelin basic protein in varicella-zoster infection	1478
<i>M. N. Kozlova, V. M. Zemskov, A. A. Alekseev, N. S. Shishkina, A. A. Barsukov, V. S. Demidova</i>	
Nature of immune disturbances and possibility of immunocorrection in burn disease	1481



<i>Y. I. Kozlova, E. V. Burygina, A. V. Sobolev, N. N. Klimko</i>	
Basophil activation test in the diagnosis of chronic urticaria	1484
<i>Y. A. Komakh, S. A. Borzenok, T. V. Radygina, S. V. Petrichuk, D. G. Gerasimova</i>	
Metabolism of the lymphocyte populations in the outcome of repeat corneal transplantation	1487
<i>A. S. Kuznetsov, A. S. Khokhlova, E. V. Markelova, M. S. Urbanova, N. P. Emeiyanova, A. A. Petrov</i>	
The immunological predictors of the inefficiency first line therapy at the primary open-angle glaucoma	1490
<i>O. V. Kurmyshkina, A. A. Bogdanova, P. I. Kovchur, T. O. Volkova</i>	
Coexpression of immune checkpoint markers PD-1, PD-L1, TIM-3, and LAG-3 in circulating and tumor-infiltrating T cell populations in cervical cancer patients	1493
<i>V. A. Lazanovich, A. V. Kostyushko, V. B. Shumatov</i>	
Determination of the level of CD64 on neutrofiles in patients with surgical sepsis	1496
<i>L. S. Litvinova, K. A. Yurova, V. V. Shupletsova, O. G. Khazjakhmatova, E. S. Melashchenko, V. V. Malashchenko, E. O. Shunkin, Yu. P. Sharkeev, E. G. Komarova, M. B. Sedelnikova, I. K. Norkin, K. I. Prokin, P. A. Ivanov, I. A. Khlusov</i>	
Reaction of activated mononucleated cells to co-cultivation with calcium phosphate coating of titanium matrix	1499
<i>E. S. Mainazarova, V. S. Toigombaeva, A. J. Myrzakulova, N. S. Tyumonbaeva</i>	
Analysis of the results of the reaction of specific lysis of leucocytes to drugs in patients suffering from coronary heart disease in the Kyrgyz Republic	1502
<i>E. V. Markelova, O. I. Fomina, V. G. Fisenko, V. Yu. Arsenina</i>	
The level of matrix metalloproteinase 8 and tissue type 1 inhibitor in acute kidney injury after cardiac surgery	1505
<i>M. E. Meniailo, V. V. Malashchenko, O. B. Melashchenko, E. O. Shunkin, A. G. Goncharov</i>	
Interleukin-8 potentiated the pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages and T-lymphocytes	1508
<i>T. A. Nevezhkina, L. S. Matyushkina, A. P. Serebryakova, O. N. Sidorova, M. S. Tulupova</i>	
Level of interferons lambda 1 and 3 types in serial blood in women with papillomavirus infection	1511
<i>I. V. Nesterova</i>	
Target immunotherapy in secondary immune deficiency with infectious syndrome	1516
<i>T. N. Nikitina, I. E. Zhuk, D. V. Gorenkov, V. I. Klimov</i>	
Development of national requirements for nonclinical evaluation of human papillomavirus vaccines as an important task in the regulation of domestic vaccines research	1519
<i>M. S. Niiazalieva, V. S. Toigombaeva, A. E. Mergenov, I. Sh. Aldjambaeva</i>	
Effect of immunization on the incidence of viral hepatitis in the Kyrgyz Republic	1521
<i>M. S. Niiazalieva, V. S. Toigombaeva, S. T. Karagulova</i>	
Incidence of viral hepatitis B in health care workers in the Kyrgyz Republic	1524
<i>N. Yu. Ponomareva, V. G. Mitkovsky, E. N. Yampolskaya, A. V. Kochetkov, V. V. Lazarev</i>	
Genetically caused molecular mechanisms of development of the spinal stroke in the patient with the persistent viral infection	1527
<i>O. A. Radaeva, A. S. Simbirtsev, Yu. A. Kostina, M. S. Iskandyarova</i>	
Dynamics of cytokine levels in blood serum in patients with metabolic syndrome using statins	1530

<i>T.V. Radygina, A. S. Illarionov, D. G. Gerasimova, A. O. Anushenko, Y.A. Komakh, A. S. Potapov, S. V. Petrichuk, A. P. Fisenko</i>	
The effectiveness of infliximab in children with IBD, depending on the level of circulating cytokines and the concentration of the drug	1533
<i>E. S. Romanova, O. M. Filipovich, N. I. Kuznetsov</i>	
Some risk factors vertical transmission of viral hepatitis C	1536
<i>V. V. Troshina, N. Z. Zokirov, V.D Gladkich</i>	
The question of diagnosis dysfunction of the immune system in children living in conditions of exposure to potential anthropogenic loads	1539
<i>Z. A. Khokhlova, R. A. Gileva, T. V. Sereda, T. V. Mayanskaya, V. N. Karpova, N. A. Nikiforova, E. V. Zakharova</i>	
Viral hepatitis E. Diagnostic difficulties behind	1542
<i>M. I. Khudiakova, N. A. Cherevko, Berezovskaya</i>	
Correlation of vitamin D, food hypersensitivity and proinflammatory cytokines in children with autism spectrum disorders	1545
<i>S. V. Chechetova, R. M. Kadyrova, Z. K. Djolbunova, E. S. Mainazarova</i>	
Comparative analysis of IgE level in children with acute viral infections	1548
<i>N. V. Shabashova, E. V. Frolova, L. V. Filippova, A. E. Uchevatkina</i>	
Oropharyngeal candidiasis: etiology, risk factors and immunopathology of development in patients with hematological malignancies	1551
<i>V.A. Shmarov, A. G. Goncharov</i>	
Application of <i>in vitro</i> cultural models with interleukin-7 for estimating the functional activity of T-lymphocytes	1554
<i>L. S. Litvinova, K. A. Yurova, V. V. Shupletsova, O. G. Khazjakhmatova, E. S. Melashchenko, V. V. Malashchenko, E. O. Shunkin, Y. P. Sharkeev, E. G. Komarova, M. B. Sedelnikova, I. K. Norkin, K. I. Prokin, P.A. Ivanov, I.A. Khluso</i>	
The role of three-dimensional matrices imitating bone tissue regeneration in the formation of hematopoietic stem cells pool under <i>in vitro</i> cultivation conditions	1557

---

<b>Author Index</b>	1558
---------------------	------

---

## ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ГЕРПЕСВИРУСЫ И РАССЕЯННЫЙ СКЛЕРОЗ

© 2019 г. Г. Ф. Железникова<sup>1\*</sup>, Н. В. Скрипченко<sup>1,2</sup>, Л. А. Алексеева<sup>1</sup>,  
Е. Ю. Скрипченко<sup>1,2,3</sup>

\*E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

<sup>1</sup>ФГБУ Научно-исследовательский институт детских инфекций ФМБА России,  
Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУ Институт мозга человека РАН им. Н. П. Бехтеревой, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 27.07.2018. Принята: 25.08.2019

В обзоре представлены публикации в основном за последние 5–7 лет, посвященные дальнейшему изучению роли герпесвирусов в патогенезе рассеянного склероза. Рассмотрены сведения об особенностях иммунного ответа на вирус Эпштейна-Барр и герпесвирус человека 6-го типа при рассеянном склерозе. Описаны гипотезы, касающиеся участия этих герпесвирусов в иммунопатологических процессах при рассеянном склерозе.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, вирус Эпштейна-Барр, герпесвирус человека 6-го типа, иммунный ответ, полиморфизм генов иммунного ответа

DOI: 10.31857/S102872210007036-4

**Адрес:** 197022, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 9. ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России. Отдел клинической лабораторной диагностики и отдел нейроинфекций и органической патологии нервной системы, Железникова Галина Федоровна.

Тел.: (812) 234-90-06, 8 905 267 41 32 (моб).

E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

**Авторы:**

**Железникова Г. Ф.**, д.м.н., профессор, старший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Скрипченко Н. В.**, з.д.н. РФ, д.м.н., профессор, заместитель директора ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России по научной работе, Санкт-Петербург, Россия;

**Алексеева Л. А.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Скрипченко Е. Ю.**, к.м.н., старший научный сотрудник отдела нейроинфекций и органической патологии нервной системы ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России; заведующая детским неврологическим отделением ФГБУ «Институт мозга человека РАН им. Н. П. Бехтеревой», Санкт-Петербург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – тяжелое органическое заболевание центральной нервной системы (ЦНС), характеризующееся образова-

нием множественных очагов демиелинизации и нарастанием неврологической симптоматики. РС чаще поражает людей в молодом возрасте и ведет к инвалидизации больных. Этиопатогенез РС окончательно не установлен, хотя общепризнанным является аутоиммунный компонент заболевания. К концу первой декады века достигнуты определенные успехи в изучении иммунопатогенеза РС, генетических и внешних факторов предрасположенности к РС, введении новых лекарственных препаратов. Установлены сильные факторы риска развития РС в генах комплекса HLA и определен главный аллель риска – HLA-DRB1\*15. Кроме того, расширенным методом поиска по всему геному были выделены дополнительные факторы риска в виде полиморфных вариантов генов иммунного ответа, в частности, генов цитокинов и/или их рецепторов [1].

Среди внешних факторов этиопатогенеза РС большой исследовательский интерес вызывают вирусы группы герпес (ГВ), особенно два из них – вирус Эпштейна-Барр (EBV) и герпесвирус человека 6-го типа (HHV-6), хотя имеются отдельные сообщения о связи с РС и других ГВ: вируса ветряной оспы-опоясывающего лишая

(VZV), вируса простого герпеса (HSV-1,2) и цитомегаловируса (CMV) [2]. В отношении EBV-инфекции были неоднократно подтверждены два предрасполагающих к развитию РС фактора: перенесенный ранее инфекционный мононуклеоз (ИМ) и высокие титры анти-EBNA-1 IgG-антител (АТ) [2]. Sundqvist E. и соавторы [3] обнаружили, что высокий титр анти-EBNA-1 АТ ассоциирован с присутствием в генотипе основного аллеля риска РС HLA-DRB1\*15 и предположили, что механизм влияния этого аллеля риска включает иммунный контроль EBV-инфекции. Подобные сообщения открыли новое направление исследований, заключающееся в оценке роли генетически обусловленных особенностей иммунного ответа на внешние факторы влияния (в частности, ГВ) в контексте развития РС как полигенного заболевания ЦНС.

В предлагаемом обзоре представлен анализ публикаций в основном за последние 5 лет, посвященных характеристике иммунного ответа на EBV и HHV-6 у больных РС, в сопоставлении с уже известными факторами риска РС.

### **Иммунный ответ на EBV при рассеянном склерозе**

В настоящее время новой ведущей гипотезой патогенеза РС является инициация или активация аутоиммунного ответа одним или более из распространенных инфекционных агентов у генетически чувствительных лиц. В этом отношении самый устойчивый интерес вызывает EBV, который инфицирует 95% популяции и обладает уникальной тропностью к В-лимфоцитам, персистируя в В-клетках памяти в течение всей жизни хозяина. EBV-инфекция ассоциирована с развитием и других аутоиммунных или онкологических заболеваний [4]. Показано, что ассоциация с РС зависит от генетических вариантов латентного антигена EBNA-2 как наиболее полиморфного региона генома EBV [5]. Недавно впервые установлено, что EBV способен продуктивно инфицировать нейроны в различных культурах, в том числе в первичной культуре нейронов плода человека [6]. Существует ряд доказательств, что латентно инфицированные EBV В-клетки влияют на реакции иммунной системы, способствуя развитию РС. В частности, показана перекрестная реактивность анти-EBNA-1 АТ с эпитопами клеток нейроглии и трансальдозой, селективно экспрессируемой олигодендроцитами. Однако ауто-АТ не так важны в патогенезе РС, как сами В-клетки в ка-

честве антигенпредставляющих (АПК) и иммуномодуляторных клеток, влияющих на функции дендритных клеток (ДК) и Т-лимфоцитов [7].

Несмотря на широкий спектр специфичностей анти-EBVAT, наиболее постоянно у больных РС обнаруживают высокие титры IgG-АТ к главному ядерному антигену EBV – EBNA-1 [2, 7]. Этот антиген экспрессирован при литической и трех типах латентной EBV-инфекции (I, II, III), обеспечивая стабильное существование вирусного генома в инфицированных клетках. EBNA-1 имеет сайт связывания ДНК и взаимодействует с другими латентными генами вируса, а также с генами клеточных факторов, важных для персистенции вируса и выживания клетки. EBNA-1 слабо экспрессирован в контексте главного комплекса гистосовместимости I класса (HLA I), в связи с чем несущие этот антиген EBV-инфицированные В-клетки памяти отчасти защищены от распознавания цитотоксическими CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами [8]. Как выяснилось недавно, экспрессия EBNA-1 снижается также под действием кодируемых EBV микроРНК (miRNAs), которые посредством множества механизмов нарушают контроль EBV-инфекции со стороны CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [9].

Возникает вопрос, является ли высокий уровень анти-EBNA-1 АТ врожденной особенностью ответа на EBV-инфекцию лиц, склонных к заболеванию РС, или он формируется вторично в ходе самого иммунопатологического процесса? Неоднократные попытки обнаружить связь между уровнем анти-EBNA-1 АТ и главным аллелем риска РС в системе HLA дали неоднозначные результаты. Показано, что уровень IgG-АТ к EBNA-1 ассоциирован с риском РС в корреляции с наличием HLA-DRB1\*15 и отсутствием протективного аллеля HLA-A\*02 [3]. В работе Pandit L. и соавторов (2013) установлено, что титры анти-EBNA-1 АТ прямо коррелируют с наличием HLA-DRB1\*15 у пациентов с РС (n=140), но не здоровых доноров (цит. в [2]). Мета-анализ результатов 5 исследований, проведенных в разных странах с 2008 по 2013 гг и охватывающих более 2500 лиц, из которых 1069 – пациенты с РС, подтвердил, что высокий титр анти-EBNA-1 IgG-АТ и аллель HLA-DRB1\*15 по отдельности или во взаимодействии между собой ассоциированы с повышенным риском РС [10]. Предприняв полногеномное исследование ассоциаций с уровнем IgG-ответа на 14 вирусов, в том числе EBV, у 2363 иммунокомпетентных взрослых, Hammer C. и соавторы [11]

установили значительные ассоциации ответа на EBV с заменой аминокислот в ряде аллелей региона HLA. Высокий уровень анти-EBV IgG был ассоциирован с аллелями HLA-DRB1\*15:01, HLA-DRB1\*16:01 и HLA-DRB1\*01:01. Позднее пятикратное определение (в течение 2 лет с интервалом в 6 месяцев) титра сывороточных анти-EBNA-1 IgG-АТ у 90 пациентов с ремиттирующе-рецидивирующим РС (PPPC) в сопоставлении с наличием HLA-DRB1\*15 и уровнем 25-hydroxyvitamin D (25(OH) D) выявило значительные колебания уровня АТ в прямой корреляции с HLA-DRB1\*15 и обратной — с уровнем 25(OH)D. Авторы заключили, что сывороточный уровень анти-EBNA-1 IgG-АТ у пациентов с РС находится под влиянием HLA-DRB1\*15 и уровня 25(OH)D, причем оба фактора связаны с риском РС [12].

Имея ввиду возможность молекулярной микрии, Tschochner M. и соавторы [13] отобрали эпитопы EBNA-1 с высокой аффинностью связывания с HLA и затем идентифицировали кандидатные эпитопы протеинов мозга, которые гомологичны эпитопам EBNA-1 и могут связываться с HLA-DRB1\*15 с аффинитетом, достаточным для презентации антигена. Определили потенциально перекрестные HLA-DRB1\*15-ограниченные реакции с участием известных (alpha B crystallin, myelin basic protein, oligodendrocyte-specific protein) и ряда новых антигенов ЦНС. Кроме того, обнаружено, что анти-EBNA-1 АТ перекрестно связывают антиген мозга человека, который идентифицирован как heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (HNRNPL). Значение этого факта не ясно, так как анти-HNRNPL АТ присутствуют в плазме как пациентов с РС, так и здоровых лиц [14].

Поиск генов чувствительности к EBV-инфекции и развитию различных EBV-ассоциированных заболеваний был предметом ряда исследований за последние 25 лет, включенных в обзор [15]. Поскольку EBV определен как онкогенный вирус, большинство работ имело отношение к EBV-ассоциированным опухолям. Среди немногих исследований, касающихся РС, Rubick R. и соавторы (2013) [15] осуществили полногеномный поиск генетических факторов, влияющих на уровень анти-EBNA-1 IgG-АТ, в большой когорте американцев мексиканского происхождения (более 1300 лиц). Признаки ассоциации обнаружили на хромосоме 6, по крайней мере в двух отдельных локусах региона HLA II. С использованием 60 больших семейных ро-

дословных показано, что уровень анти-EBNA-1 IgG-АТ наследуется в 43% случаев. Позднее та же группа австралийских ученых [16] провела сопоставление генетических факторов риска высокого уровня анти-EBNA-1 АТ и риска развития РС в двух больших полногеномных исследованиях ассоциаций (GWAS) с охватом более 5 и 15 тысяч обследуемых соответственно. Авторы подтвердили, что HLA является главным регионом локусов влияния на уровень анти-EBNA-1 АТ и содержит множество полиморфизмов одного нуклеотида (SNP), преодолевающих установленный в GWAS порог значимости ассоциаций с титром анти-EBNA-1 IgG ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ). Максимальный уровень достоверности ассоциаций проявлял SNP в рестрикте (rs)2516049, расположенном между генами HLA-DRB1 и HLA-DQA1. Однако соединенный мета-анализ материала двух GWAS (анти-EBNA-1 и РС) показал и другие значимые ассоциации в локусах вне региона HLA, в хромосомах 1p22.1, 3p24.1, 3q13.33 и 10p15.1. Интересно отметить, что последний локус соответствует гену рецептора IL-2 (IL2RA), одному из уже известных иммунных факторов риска РС [1]. Выявлено синергичное взаимодействие между SNPs в rs2516049 (6p21.32) и rs11808092 (1p22.1), относящегося к гену EVI5 (Ecotropic viral integration site 5), активно изучаемому фактору риска РС. Таким образом, имеются общие генетические факторы риска повышенного уровня анти-EBNA-1 АТ и развития РС как в системе HLA, так и вне ее.

Среди более 30 генов, влияющих на анти-EBV иммунный ответ и риск развития EBV-ассоциированных заболеваний, уже отмечены гены цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , а также рецепторов I типа TNF- $\alpha$  и IL-2 [15]. Полиморфные варианты ряда этих генов влияют также и на риск заболевания РС, однако нам не встретились сообщения о совпадении эффекта конкретных SNPs на уровень анти-EBNA-1 IgG и риск РС.

Если связь повышенного уровня анти-EBNA-1 IgG с РС можно считать установленной, то клиническое значение этого параметра подвергается сомнению [2]. В подтверждение полученным ранее результатам Gies R. и соавторы недавно сообщили, что сывороточные уровни IgG-АТ к EBNA-1 и вирусному капсидному антигену (VCA), хотя и значительно повышены относительно контроля у больных с клинически изолированным синдромом (КИС), не коррелируют с клиническими и радиологическими параме-

трами болезни и не прогнозируют риск конверсии КИС в РРРС [17].

С учетом известной конкуренции между клеточным и гуморальным адаптивным иммунитетом в виде взаимной негативной регуляции субпопуляций Th1 и Th2, можно предположить, что повышенные титры анти-EBNA-1 IgG отражают недостаточность клеточного иммунного ответа на EBV. Действительно, у пациентов с РС отмечены нарушения иммунной защиты против EBV (Yea S. et al., 2013; Jaquier E. et al., 2010), хотя ранее были сообщения о повышенном числе анти-EBNA-1 CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на ранних стадиях болезни (Jilek S. et al., 2008; Lunemann J. et al., 2008) [2]. Позднее Jilek S. et al. [18] показали, что EBV-специфические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты пациентов с РС проявляют редуцированную функциональную активность после стимуляции протеином EBV *ex vivo* (по продукции IL-2, перфорина, гранзима В и цитотоксичности). Van Nierop и соавторы установили, что среди Т-клеток ЦСЖ пациентов с КИС или РС значительно больше CD4<sup>+</sup> Т-клеток (а у пациентов с КИС и CD8<sup>+</sup> Т-клеток), реагирующих на аутологичные трансформированные EBV В-клетки (autoBLCL) CD8<sup>+</sup> Т-клетки направлены против литических протеинов вируса, что свидетельствует о локальном Т-клеточном иммунном ответе против EBV при РС [19]. В то же время изучение репертуара Т-клеточного рецептора (TCR-β) клонов EBV-специфических Т-клеток в крови и ликворе пациентов с РС и группы контроля (другие воспалительные заболевания ЦНС) показало, что в ЦСЖ последовательности TCR-β CD8<sup>+</sup> Т-клеток обогащены только у пациентов с РС, а CD4<sup>+</sup> Т-клеток — в обеих группах пациентов. Другими словами, интраклеточное накопление EBV-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток более характерно для РС, чем CD4<sup>+</sup> Т-клеток [20].

Latham L. и соавторы [21], сопоставив показатели Т-клеточного противовирусного иммунитета с результатами МРТ (магнитно-резонансной томографии) у 20 пациентов с ранней стадией РС, обнаружили, что пролиферативный ответ и число IFN-γ-секретирующих клеток среди мононуклеаров крови (МК), стимулированных клетками аутологичной EBV-инфицированной лимфобластоидной культуры (LCL), значимо коррелирует с числом активных очагов РС на МРТ при сканировании спустя 4–8 недель после взятия крови. Эти результаты свиде-

тельствуют в пользу причинной роли реактивации EBV-инфекции и усиления Т-клеточного анти-EBV иммунного ответа в повышении активности РС.

Полагая, что противоречия в сообщениях о состоянии анти-EBV Т-клеточного иммунного ответа при РС обусловлены различиями в изучении антигенов EBV, популяций и функций Т-клеток, а также стадий заболевания, Pender M. и соавторы [22] провели комплексный анализ Т-клеточного ответа на литические и латентные антигены EBV, экспрессируемые EBV-инфицированными В-клетками (LCL) у 95 пациентов с РС и 56 EBV-серопозитивных здоровых лиц, с учетом присутствия в генотипе протективного аллеля HLA-A\*02. Среди МК пациентов и здоровых лиц значительно преобладали EBV-специфические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, хотя их число коррелировало с числом CD4<sup>+</sup> EBV-специфических Т-клеток. Не обнаружено различий частоты EBV-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток у пациентов и здоровых лиц в зависимости от статуса HLA-A\*02. Сниженное количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток, реагирующих на литические антигены EBV, отмечено с начала болезни и во все последующие стадии РС, что свидетельствует о нарушении контроля реактивации вируса у пациентов с РС. Напротив, число CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, специфических к латентным антигенам EBV, среди МК пациентов с РС было выше, чем в контроле, однако они проявляли сниженную способность к продукции *in vitro* IFN-γ, TNF-α и IL-2. Повидимому, это отражает истощение ответа на популяцию латентно инфицированных В-лимфоцитов, расширенную в результате нарушенного контроля реактивации EBV со стороны CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Эффект истощения иллюстрирует постепенное снижение числа EBV-специфических Т-клеток с ростом продолжительности болезни.

#### *Иммунный ответ при острой первичной EBV-инфекции (ИМ)*

Более 70% лиц, первично инфицированных EBV в подростковом или молодом возрасте, переносят первичную EBV-инфекцию в форме острого инфекционного мононуклеоза (ИМ) — самолимитирующегося лимфопролиферативного заболевания с симптомами фарингита, лихорадки, лимфаденопатии, гепатоспленомегалии и Т-клеточного лимфоцитоза. Перенесенный ранее ИМ является еще одним многократно подтвержденным фактором риска РС, иллюстрирующим связь EBV-инфекции с этим забо-

лением [2]. Еще в конце прошлого века было замечено сходство демографического распределения РС и ИМ. В Европе и Северной Америке оба заболевания встречаются относительно часто, тогда как в развивающихся странах, где заражение EBV происходит в первые годы жизни, заболеваемость ИМ и РС намного ниже. Возникло предположение, что связь между EBV и РС относится к периоду жизни, когда развивается острая первичная EBV-инфекция в виде ИМ [7]. Эту закономерность недавно еще раз подтвердили отечественные исследователи, которые выявили достоверную ассоциацию между заболеванием РС и перенесенными в возрасте от 7 до 15 лет ИМ или в возрасте от 0 до 7 лет ветряной оспой, но не другими вирусными или бактериальными инфекциями [23]. Склонность к развитию РС после перенесенного ИМ связывают также с «гигиенической» гипотезой, которая объясняет рост аллергических и аутоиммунных заболеваний в развитых странах слабой экспозицией инфекционных агентов в первые годы жизни. Вполне возможно, что лица, перенесшие ИМ, в первые годы жизни меньше встречались не только с EBV, но и другими возбудителями, в связи с чем приобрели склонность к развитию аутоиммунных болезней, в том числе к РС [24].

ИМ рассматривается как фактор риска не только РС, но и ряда других EBV-ассоциированных заболеваний, в частности, лимфомы Ходжкина (ЛХ). Поэтому генетически обусловленная предрасположенность к ИМ представляет интерес для широкого круга специалистов, что отражено в обзоре [15]. Еще в первой декаде века Diepstra A и соавторы (2005) показали, что фактором риска EBV-позитивной ЛХ являются микросателлитные маркеры D6S510 and D6S265 в регионе HLA I класса. Позднее McAulay K. и соавторы (2007) изучили частоту встречаемости этих маркеров у EBV-серопозитивных лиц с ИМ или без симптомов ИМ, а также EBV-серонегативных лиц. Обнаружили значительно бóльшую частоту аллеля 1 D6S510 и аллеля 3 D6S265 у лиц с ИМ по сравнению с EBV-позитивными без ИМ или EBV-негативными. Однако присутствие этих аллелей риска оказалось ассоциированным с более слабой лимфопрлиферацией и мягким течением ИМ, при относительно высокой вирусной нагрузке. Авторы предположили, что каждый из этих аллелей риска ведет к ослаблению иммунного ответа с редукцией CD8<sup>+</sup> Т-клеточного контроля EBV-инфекции [15].

Изучая связь между главным аллелем риска РС HLA-DRB1\*15 и ИМ, Nielsen T. и соавто-

ры [25] сравнили частоту HLA-DRB1\*15 среди пациентов с РС, имевших или не имевших в анамнезе ИМ, и в соответствующих подгруппах здоровых доноров. У лиц, не переносивших ИМ, носительство аллеля HLA-DRB1\*15 оказалось ассоциированным с 2,4-кратным, а у переносивших — с 7-кратным ростом риска РС. Отсюда следует, что у носителей HLA-DRB1\*15 с ИМ в анамнезе риск развития РС возрастает втрое. Авторы полагают, что HLA-DRB1\*15 и ИМ действуют в синергизме, усиливая предрасположенность к развитию РС. В поисках общих факторов риска заболевания ИМ и РС в системе HLA Ramagopalan S. и соавторы [26] осуществили генотипирование 5 локусов HLA (включая DRB1) у 175 пациентов с ИМ и 179 бессимптомной EBV-сероконверсией. Установлена значительная позитивная ассоциация с ИМ аллеля HLA-DRB1\*01:01 (OR=3,2; p=0,001), но не всех остальных, включая аллель риска РС HLA-DRB1\*15. При этом пациенты с ИМ, несущие аллель HLA-DRB1\*01:01, имели существенно меньшую вирусную нагрузку по сравнению с не несущими (в среднем 783 против 7366 копий ДНК EBV на 10<sup>6</sup> МК). Поскольку аллель DRB1\*01:01 известен как фактор протекции от заболевания РС, и в то же время аллель риска РС DRB1\*15 не влиял на заболевание ИМ, полученные результаты не подтверждают тезис о возможной общности генетической основы ИМ и РС. Дальнейшее изучение взаимосвязи между HLA-DRB1\*15 и ранее перенесенным ИМ в повышении риска РС было проведено на материале двух исследований с охватом 733 случаев (РС или КИС) и 1089 контрольных лиц с использованием двух статистических моделей причинной связи — обычной мультипликативной модели логистической регрессии и аддитивной модели, предложенной Rothman в 1976 году [27]. Присутствие обоих факторов значительно усиливало риск РС (OR=7,5), в подтверждение данных [25]. В мультипликативной модели оба фактора были независимыми предикторами РС, без доказательства взаимодействия между ними. Однако в аддитивной модели взаимодействие между DRB1\*15 и ИМ оказалось статистически существенным. Это означает, что DRB1\*15 и ИМ могут быть компонентами одного и того же процесса, ведущего к развитию РС, подтверждая предположение, высказанное ранее Nielsen T. и соавторами [25].

Изучалась связь между полиморфизмом генов ряда цитокинов и предрасположенностью к заболеванию ИМ. Еще в начале века Helmin-

en M. и соавторы (2001, ссылка в [15]) провели генотипирование 116 детей по трем известным SNPs в области промотора гена IL-10, в позициях –1082(G/A), –819(C/T) и –592(A/C), формирующих 3 гаплотипа: GCC, ACC и ATA. Серодиагностика EBV-инфекции выявила 13,3% EBV-позитивных среди детей младше 2 лет, 46,3% среди детей от 2 до 10 лет и 63,3% – старше 10 лет. Логистический регрессионный анализ с учетом возраста детей показал, что носительство ATA значимо ассоциировано с EBV-серонегативностью (OR=2,6; p=0,04). При этом уровень IL-10 в плазме оказался достоверно выше у носителей гаплотипа ATA, чем не имеющих его, среди здоровых новорожденных и взрослых. Авторы предположили, что носители гаплотипа ATA гена IL-10 оказываются защищенными от EBV-инфекции в первые годы жизни, что повышает риск развития ИМ в последующем периоде. Однако неоднократные попытки найти взаимосвязь между теми же тремя SNPs промотора гена IL-10 и предрасположенностью к РС чаще имели отрицательный результат [28].

Японские авторы (Natta K. и соавторы, 2007; цит. в [15]) не обнаружили различий в распределении вариантов генов цитокинов IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 и IL-6 в группах пациентов с ИМ и здоровых. Однако у пациентов с ИМ основной аллель С SNP гена IL-1 $\alpha$  в позиции (–889) С/Т встречался реже, чем в контроле (44/60 против 138/162; p=0,041). Кроме того, у пациентов с ИМ значительно чаще встречался аллель С кодона 10(Т/С) гена TGF- $\beta$ 1 (43/60 против 73/162; p<0.001). Имеются сообщения, что именно аллель С кодона 10 связан с высоким уровнем продукции TGF- $\beta$ 1, тогда как высокий уровень IL-1 $\alpha$  ассоциирован с минорным аллелем Т SNP гена IL-1 $\alpha$  (–889)С/Т, чаще встречающимся у пациентов с ИМ. По мнению Natta K. и соавторов, избыток TGF- $\beta$ 1 при первой экспозиции вируса может подавлять врожденный иммунный ответ, способствуя репликации EBV и пролиферации EBV-инфицированных В-клеток, с последующим ростом продукции IL-1 $\alpha$  и развитием клиники ИМ.

Влияние SNP гена IL-1 $\alpha$  (–889)С/Т на риск развития РС не установлено, о чем свидетельствуют, в частности, данные мета-анализа 15 исследований [29]. Связь вариантов гена TGF- $\beta$ 1 с РС мало изучена. Иранские авторы не нашли различий в распределении С и Т аллелей SNP кодона 10 в группах пациентов с РС и здоровых лиц. Однако гомозиготный генотип СС кодона

10 в составе генотипа из двух кодонов (10 и 25) встречался у пациентов с РС значительно реже, чем в контроле [30].

Akay E. и соавторы [31] с целью выявить связь между вариантами гена IL-28В, кодирующего IFN III типа (IFN- $\lambda$ ), и развитием вирусемии при остром ИМ, сравнили распределение аллелей SNPs гена (rs12979860 и rs8099917) в группах больных ИМ и здоровых EBV-позитивных доноров, а также определили уровень ДНК EBV в плазме 45 пациентов с ИМ и 46 здоровых лиц. Различий в распределении обоих SNPs не обнаружили, но отметили, что у пациентов с ИМ, имеющих генотип СС SNP rs12979860, уровень ДНК EBV был существенно ниже, чем у носителей других (СТ и ТТ) генотипов (p=0,011). По-видимому, генотип СС влияет на ответ IFN- $\lambda$ , обеспечивая лучший контроль репликации EBV при ИМ. К вопросу о связи этого гена с РС есть сообщение о том, что SNPs гена IL-28В (rs12979860 и rs8099917) не влияют на результат терапии IFN- $\beta$  у пациентов с РС [32]. Не обнаружено также достоверных ассоциаций с РС вариантов гена IL-28RA, кодирующего трансмембранный компонент гетеродимерного рецептора для IFN- $\lambda$  (IL-28A, IL-28В и IL-29) [33]. В целом не доказано существование общих генетических факторов предрасположенности к ИМ и РС, хотя наличие в генотипе HLA-DRB1\*15 и перенесенный ранее ИМ вместе многократно повышают риск заболевания РС [25, 27].

Какие же особенности иммунной защиты при остром ИМ делают его более значимым фактором риска РС, чем бессимптомная EBV-инфекция? Тот факт, что ИМ часто предшествует и другим EBV-ассоциированным заболеваниям, предполагает наличие общих неблагоприятных черт иммунного ответа при острой первичной EBV-инфекции. По-видимому, эти особые черты лежат в сфере врожденного иммунного ответа при первичной экспозиции вируса [34]. На самом раннем этапе первичной инфекции распознавание EBV осуществляют миелоидные и плазмацитоидные дендритные клетки (мДК и пДК) через экспрессию Toll-рецепторов (TLR3 и TLR9), распознающих разные патоген-ассоциированные паттерны вируса – EBER (EBV-encoded small RNA) и метилированную ДНК соответственно. Оба типа ДК способны активировать цитотоксические клетки врожденного иммунитета – естественные (натуральные) киллеры (NK), которые уничтожают В-клетки, экспрессирующие литические антигены EBV, тем



самым ограничивая трансформацию В-лимфоцитов и EBV-инфекцию на самой ранней фазе ее развития. Однако распознавание ДНК вируса пДК подавляет сам EBV через свои литические (BGLF5) и латентные (LPM-1) антигены, поэтому основным механизмом активации NK и примирования протективного Т-клеточного ответа в ходе инфекции служит распознавание EBNA1 вируса, с чем согласуются данные о высоких концентрациях EBNA1 в сыворотке крови пациентов с ИМ. Сведения о накоплении NK в крови пациентов с ИМ косвенно свидетельствуют об участии этих клеток в защите от первичной EBV-инфекции.

Изучив кинетику, дифференцировку и пролиферацию NK у 22 детей с ИМ, Azzi T. и соавторы [35] обнаружили в острой фазе ИМ селективный рост субпопуляции промежуточной стадии дифференцировки CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> NK, экспрессирующих рецептор NKG2A, но не KIR (killer immunoglobulin-like receptor), абсолютное число которых у детей с ИМ оказалось в 5 и 3,5 раз больше, чем в группах EBV-негативного и EBV-позитивного контроля соответственно. Частота (%) CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup> NK оставалась значительно повышенной в течение 6 месяцев, возвращаясь к базальному уровню через 2 года. Эти клетки подвергались дегрануляции и пролиферации при экспозиции с В-лимфоцитами, экспрессирующими литические антигены EBV. Характерна динамика этой субпопуляции в течение первых 5 лет жизни, описанная ранее Sundström Y. и соавторами (2007). Сравнение пропорций разных субпопуляций NK в пуповинной крови и в крови здоровых детей 2-х и 5-летнего возраста показало, что доля NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup> NK снижается в среднем с 70% до 57% и 51% ( $p < 0,001$ ), в то же время доля KIR<sup>+</sup> NK нарастает с 8 до 19 и 29% ( $p < 0,001$ ). С учетом этих данных Azzi T. и соавторы [35] предполагают, что именно субпопуляция CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup> NK обеспечивает иммунный контроль при первичной EBV-инфекции в первые годы жизни, а ее уменьшение (и/или рост субпопуляции KIR<sup>+</sup> NK) после 5 лет его нарушает, что и является одной из причин заболевания ИМ в подростковом возрасте.

В недавнем обзоре C. Münz [36] подчеркивает особое значение цитотоксических клеток врожденного иммунитета (NK, NKT и  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов), представленных в местах первичной экспозиции EBV в гораздо большем количестве, чем CD8<sup>+</sup> Т-клетки, и способных немедленно отве-

тить на его внедрение. Перечисленные клетки врожденного иммунитета распознают EBV-инфицированные мишени с помощью различных механизмов, соответствующих стадиям EBV-инфекции, формируя комплексный контроль всех программ EBV в организме хозяина, напоминая комплексного эпитоп-специфического адаптивного Т-клеточного иммунитета. Так, NK распознают литически EBV-инфицированные В-клетки за счет снижения ими экспрессии молекул HLA I класса и роста экспрессии лиганда NKG2D.  $\gamma\delta$  (V $\gamma$ 9V $\delta$ 2) Т-клетки распознают В-клетки с латенцией EBV I типа, экспрессирующих лишь один протеин вируса – EBNA-1, дополняя (наряду с NKT, контролирующими другие типы латенции) действие NK механизмами защиты от латентной EBV-инфекции. Djaoud Z. и соавторы [37] обнаружили бимодальный врожденный ответ на EBV в отношении участия  $\gamma\delta$  (V $\gamma$ 9V $\delta$ 2) Т-клеток. Изучая ответ разных субпопуляций лимфоцитов на клетки линии Akata (BL, Burkitt lymphoma), экспрессирующие латентный (EBNA-1) и литический (BZLF1) протеины EBV, авторы выделили среди здоровых доноров ( $n=24$ ) две группы: с мощным ответом как NK, так и  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов (1-я группа,  $n=13$ ) или сильным ответом NK, но слабым –  $\gamma\delta$  Т-клеток (2-я группа,  $n=11$ ). Далее оказалось, что двойной ответ NK и  $\gamma\delta$  Т-клеток чаще представлен среди здоровых EBV-позитивных детей (46%), чем среди детей с ИМ (23,5%).

Критическим механизмом адаптивного иммунного ответа против EBV-инфекции считают накопление CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, специфических к ранним литическим антигенам вируса, которые могут составлять до 40% общего расширенного циркулирующего пула CD8<sup>+</sup> Т-клеток, характерного для ИМ [36]. Были сделаны попытки установить различия клеточно-опосредованного ответа при острой первичной (ИМ) и бессимптомной первичной EBV-инфекции у детей [38] и юных взрослых [39]. Jayasooriya S. и соавторы [38] изучили статус EBV у 114 здоровых детей из Африки (Гамбия) в возрасте 14–18 месяцев, характерном для первичного инфицирования. По результатам определения титра АТ против VCA EBV были выделены три группы детей: не инфицированные (IgM<sup>-</sup>IgG<sup>-</sup>), с установленной EBV-инфекцией (IgM<sup>-</sup>IgG<sup>+</sup>) и недавно инфицированные (IgM<sup>+</sup>IgG<sup>+/-</sup>). В следующие 6 месяцев повторно определяли титры анти-VCA АТ, уровень ДНК вируса в МК, общий пул CD8<sup>+</sup> Т-клеток и количество EBV-

специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Группой сравнения были 6 подростков европейского происхождения, переносящих острый ИМ. При первичном обследовании вирусная нагрузка у детей с установленной EBV-инфекцией существенно не отличалась от показателей при ИМ, но через 6 месяцев ее средний уровень оказался сниженным в 8–10 раз относительно исходного. При остром ИМ обнаружен значительный рост пула CD3<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> (но не CD4<sup>+</sup>) Т-клеток при редукции пула В-лимфоцитов, но в группах с бессимптомной EBV-инфекцией изменений субпопуляций лимфоцитов не наблюдали. Однако у недавно инфицированных (IgM<sup>+</sup>) детей активированные EBV-специфические CD8<sup>+</sup> Т-клетки составляли до 15% общего пула, причем фенотип этих клеток соответствовал их фенотипу при ИМ. Таким образом, бессимптомная EBV-инфекция у детей сопровождается генерацией EBV-специфических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов без сверх-экспансии общего пула CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а причиной симптомов острого ИМ является скорее сверх-экспансия пула CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, чем вирусная нагрузка в чистом виде.

Abbott R. и соавторы [39] предприняли анализ результатов скрининга EBV-инфекции у 448 абитуриентов высшей школы (из которых 278 уже имели анти-VCA IgG) и по сочетанию высокого уровня ДНК EBV в МК с анти-EBV АТ выделили 5 лиц с первичной бессимптомной EBV-инфекцией (ПБС) для оценки их иммунологического профиля в сопоставлении с данными группы пациентов с острым ИМ. Серологический профиль у трех из 5 студентов с ПБС соответствовал профилю в острой фазе ИМ (анти-VCA IgM<sup>+</sup>, анти-VCA IgG<sup>+/-</sup>, анти-EBNA1 IgG<sup>-</sup>), но у двух других (при наличии ДНК EBV в МК) анти-EBV АТ еще отсутствовали, что соответствует очень раннему сроку инфекции. В трех первых случаях уровень ДНК вируса совпадал с его рангом при ИМ, в двух других – был заметно ниже. Два студента с ПБС и высоким уровнем ДНК EBV имели EBV-специфические CD8<sup>+</sup> Т-клетки в количестве, сопоставимом с ответом при остром ИМ, в сопровождении небольшого роста общего пула CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и умеренной экспансии активированных (CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) клеток (40–45% из всех CD8<sup>+</sup> Т-клеток против 77–95% при остром ИМ). У этих двух студентов уровень ДНК EBV снижался через 1–2 года до значений, типичных для здоровых носителей. В двух случаях очень ранней ПБС эпитоп-специфический ответ CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов развивался через 3–5 меся-

цев, без общей экспансии CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Ни в одном из 5 случаев не обнаружено характерного для острого ИМ изменения пропорций CD56<sup>bright</sup> и CD56<sup>dim</sup> NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup> субпопуляций НК. Интригующими оказались результаты обследования третьего студента с изначально высоким уровнем ДНК EBV. В отличие от двух других студентов с таким же вирусологическим и серологическим профилем, эпитоп-специфический ответ CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у этого студента не обнаруживался в течение 16 месяцев, хотя уровень ДНК вируса в МК уже через 3 месяца снизился до нормы (у здоровых носителей). Этот случай заостряет внимание на индивидуальных различиях «оркестровки» механизмов иммунной защиты при первичной бессимптомной EBV-инфекции. Вслед за авторами предыдущей публикации [38] Abbott R. и соавторы [39] заключают, что острый ИМ развивается как следствие гипер-активированного иммунного ответа на первичную EBV-инфекцию.

С острой первичной EBV-инфекцией (ИМ) связана интересная гипотеза, предложенная Otto C. и соавторами [40] в объяснение известного парадокса во взаимосвязи между EBV и РС. Характерным лабораторным признаком РС является интратеккальный синтез IgG к распространенным вирусам (кори, краснухи, VZV), определяемый у большинства (90%) больных по величине индекса (>1,5) титра противовирусных антител (AI) в ликворе и крови по формуле, предложенной Reiber H. (1991). Доказана связь между EBV-инфекцией и интратеккальным синтезом IgG: титры анти-EBNA-1 АТ (но не АТ к другим вирусам) у пациентов с РС оказались значительно более высокими при наличии интратеккальной продукции IgG, чем в ее отсутствие [41]. Однако, несмотря на практически 100%-ную инфицированность EBV, у пациентов с РС очень редко обнаруживают повышенный AI IgG к EBV в сравнении с другими вирусами, например, в 2–8% против 32–60% по данным Pohl D. и соавторов (2009). Otto C. и соавторы [40] предположили, что В-клетки, продуцирующие IgG-АТ к этим вирусам, проникают в ЦНС в острой фазе ИМ, когда В-клетки, продуцирующие анти-EBV IgG-АТ еще отсутствуют. Известно, что IgG, специфичные к разным антигенам EBV, появляются в крови только через 25–90 дней после начала болезни, в периоде реконвалесценции. Эта гипотеза, с одной стороны, может объяснить происхождение вирус-специфических IgG в ликворе больных РС, а с дру-

гой – заостряет внимание на некотором иммунологическом событии при острой первичной EBV-инфекции, ведущем к инвазии В-клеток в ЦНС, которую рассматривают как критический механизм развития РС. В последнем обзоре публикаций по этому вопросу [42] авторы, на основании данных 9 независимых исследований, подтвердили, что у взрослых пациентов с РС интратекальный синтез IgG-АТ к EBNA-1 обнаруживается в 9,7% случаев, к VCA EBV – в 4,3%, к антигенам из EBV-инфицированных клеточных линий – в 15,6% случаев, что существенно ниже, чем к вирусам кори (66,4%), краснухи (56,5%), VZV (51%) и HSV (28%). Сходные соотношения найдены и у детей с РС.

Неспецифический интратекальный синтез Ig при РС ранее связывали с идиоспецифическим взаимодействием В- и Т-лимфоцитов (Holmou T. et al., 2010) или образованием третичных лимфоидных органов (Bonnan M., 2014) [2]. На том основании, что у большинства пациентов с РС нет корреляции между содержанием антивирусных IgG в ликворе и крови, Reiber H. и соавторы (2009) предположили, что репертуар В-клеток мозга у пациентов с РС отражает репертуар В-клеток крови в момент начала их проникновения в ЦНС, обусловленного ранними патологическими событиями при развитии РС (цит. в [42]). Гипотеза Otto C. и соавторов [40] относит эти события в прошлое пациентов с РС, в период острой первичной EBV-инфекции, сопровождающейся мощной поликлональной активацией лимфоцитов, которая, возможно, и является основой связи между ИМ и РС. К тому же недавно было показано, что у пациентов с ИМ появляются ауто-АТ к MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), которые, по данным литературы, обнаруживаются у 40% детей с демиелинизирующими заболеваниями ЦНС. Анти-MOG IgG найдены у 7 из 35 (20%) пациентов с ИМ против 0 из 23 лиц контроля (ИМ-подобное заболевание без EBV) [43].

#### Иммунный ответ на HHV-6 при рассеянном склерозе

HHV-6 был выделен из лимфом и других лимфопрлиферативных образований в 1986 году (Северная Америка). Два варианта вируса – HHV-6A и HHV-6B, гомологичные на 88%, в 2012 году были определены Международным комитетом таксономии вирусов как два отдельных вируса, различных по эпидемиологическим данным, биологическим и иммунологическим

свойствам. HHV-6A/B продуктивно инфицируют активированные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, непродуктивно – моноциты-макрофаги и ДК, а *in vitro* астроциты и олигодендроциты. HHV-6A более нейротропен и оказывает более сильный цитопатический эффект в культуре олигодендроцитов (Ahlqvist J. et al., 2005). Основным рецептором для HHV-6A служит CD46, который найден на всех ядродержащих клетках человека, а для HHV-6B – CD134, член суперсемейства TNF, присутствующий на активированных Т-клетках. В инфицированных клетках HHV-6A/B устанавливают латенцию, причем оба вируса обладают уникальной способностью к интеграции в теломеры хромосом любых инфицированных клеток. Поскольку большинство серологических методов не могут различить HHV-6A и HHV-6B, часто используется прежнее общее обозначение двух вирусов – HHV-6. Серопозитивность по HHV-6 достигает 80–100% в большинстве регионов мира, однако бессимптомная латентная инфекция у взрослых чаще связана с HHV-6B, который у детей вызывает инфекционную экзантему (exanthema subitum). HHV-6A более известен как фактор риска РС [44].

По-видимому, HHV-6-инфекция оказывает сильное воздействие на иммунорегуляторные функции Т-клеток в раннем постнатальном онтогенезе, о чем свидетельствуют данные Nordström I. и соавторов [45]. Авторы этой публикации показали, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки из пуповинной крови, инфицированные *in vitro* HHV-6, слабее, чем неинфицированные, продуцируют цитокины Th2-типа. К тому же дети в возрасте 18 месяцев, серопозитивные к HHV-6, реже имеют IgE-АТ к обычным аллергенам. В обзоре Dagna L. и соавторов [46] рассматриваются некоторые механизмы взаимодействия HHV-6A/B с иммунной системой, которые могут иметь отношение к патогенезу РС. Установлено, что HHV-6A продуктивно инфицирует CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, NK и  $\gamma\delta$ Т-клетки. В-клетки обычно не инфицируются HHV-6, но после иммортализации EBV они становятся чувствительными к инфекции HHV-6A (Ablashi D. et al., 1988). HHV-6A/B редуцируют экспрессию HLA I на поверхности инфицированных ДК, но эффект HHV-6A значительно сильнее (Glosson N., Hudson A., 2007). Оба вируса кодируют вирусные гомологи хемокинов (U22 и U83) и их рецепторов (U12 и U51), которые изменяют ход физиологического иммунного ответа. Интересно, что первый синтезируемый протеин HHV-6A/B – IE (immediate-ear-

ly)-1 является мощным супрессором индукции гена IFN- $\beta$  (Jaworska J. et al., 2007) [46].

Сообщения о связи инфекции HHV-6 с РС появлялись в течение более чем двух десятилетий, в том числе установлены корреляции высокого уровня IgG-АТ к HHV-6 или его латентному протеину U94/REP с периодом обострения болезни [2, 46]. Серологические исследования инфекции HHV-6А, более тесно связанной с РС, ограничены из-за высокой степени гомологии HHV-6А и HHV-6В. Поэтому антительный ответ к HHV-6А у пациентов с РС изучен гораздо слабее, чем к EBV [24]. Обзоры [24, 46] включают ряд сообщений о том, что активная HHV-6А-инфекция идентифицирована в крови и ЦСЖ пациентов с РППС. Кроме того, антигены HHV-6А неоднократно обнаруживали в бляшках РС, главным образом в олигодендроцитах, реже в астроцитах (Goodman A. et al., 2003; Cermelli S. et al., 2003; Virtanen J. et al., 2005) [24]. Alenda R. et al. [47], подтвердив наличие анти-HHV-6 IgG в ЦСЖ у части пациентов с РС, уточнили, что эти АТ распознают главный капсидный протеин HHV-6.

В недавнем обзоре публикаций (1992–2016) проведен мета-анализ данных из 39 отобранных статей, который подтвердил статистически значимую взаимосвязь между инфекцией HHV-6 и РС. При этом подтверждено диагностическое значение не только IgG-АТ к HHV-6, но и IgM-АТ, уровень которых оказался достоверно ассоциирован с РС [48]. В дополнение к прежним исследованиям Ortega-Madueño I. с соавторами [49] сравнили частоту обострений у пациентов с РС (n=301) после 2 лет разных курсов модифицирующей болезнью терапии, в зависимости от динамики анти-HHV-6А/В Ig G. В группе пациентов со снижением титра анти-HHV-6А/В IgG (n=187) большинство (69%) не имели обострений РС, тогда как в группе с нарастанием титра (n=113) без обострений оказалось только 46 (41%). Титры анти-HHV-6А/В IgG достигали пика за 2 недели до обострения РС, тогда как титры анти-HHV-6А/В IgM – за 1 месяц до обострения. Таким образом, рост уровня анти-HHV-6А/В IgM и IgG может быть использован как прогностический маркер неэффективности проводимой терапии.

Адаптивный клеточный иммунитет к HHV-6А/В был изучен у здоровых носителей. Nastke M. и соавторы (2012) использовали МК и Т-клеточные линии от здоровых HHV-6-инфицированных доноров для характеристики

вирус-специфических CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Ответы на HHV-6А и HHV-6В имели высокую степень перекрестной реактивности. Клетки, стимулированные HHV-6 *in vitro*, продуцировали цитокины, из которых IFN- $\gamma$  и IL-10 авторы рассматривают как маркеры Т-клеточного ответа на HHV-6 (цит. в [46]). В аналогичных условиях Wang F. и соавторы показали, что HHV-6 индуцирует вирус-специфические CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, секретирующие IFN- $\gamma$  и IL-10, но несущие на поверхности типичные маркеры регуляторных Т-лимфоцитов (CD25, FoxP3, GITR). Эти HHV-6-специфические Treg путем межклеточного контакта подавляли *in vitro* не только эффекторные HHV-6-специфические CD4<sup>+</sup> Т-клетки, но и ДК, их созревание и функции [50].

Состояние Т-клеточного иммунитета к HHV-6А/В у пациентов с РС мало изучено. Одно исследование на эту тему было предпринято еще в начале века Tejada-Simon M. с соавторами [51]. В крови 33 пациентов с РС и 27 лиц контроля авторы сравнили число Т-клеток, распознающих HHV-6А/В, и спектр продуцируемых ими цитокинов при экспозиции с рекомбинантным протеином 101-kDa (p101K), общим для HHV-6А и HHV-6В. Оказалось, что число HHV-6-специфических Т-лимфоцитов существенно ниже у пациентов с РС, чем лиц контроля. Кроме того, Т-клеточные линии от пациентов с РС отвечали на стимуляцию p101K *in vitro* продукцией IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , но не IL-4 и IL-10, как Т-клетки от контрольных лиц. Авторы полагают, что сниженный Т-клеточный ответ и нарушение баланса цитокинов Th1/Th2 могут препятствовать клиренсу HHV-6, создавая условия для его периодической реактивации, что характерно для РС.

Изучая роль CD46 как рецептора для HHV-6 в патогенезе РС Yao K. и соавторы [52] предположили, что связывание гликопротеина HHV-6 на поверхности инфицированных клеток с молекулой CD46 на HHV-6-специфических Т-клетках может усиливать провоспалительный ответ, участвуя тем самым в обострении РС. Имитируя перекрестное связывание CD3 и CD46 с помощью анти-CD3 и анти-CD46 моноклональных АТ, авторы сравнили ответ CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов здоровых доноров (n=5) и пациентов с РППС (n=5). Оценив продукцию *in vitro* 9 цитокинов, авторы обнаружили, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки пациентов с РС в ответ на костимуляцию CD3/CD46 продуцируют в 7 раз большее количество IL-1 $\beta$ , чем клетки здоровых лиц. Кроме того, это воздействие приводило к значительному росту числа CD4<sup>+</sup>

Т-клеток, продуцирующих IL-17A (Th17), у пациентов с РС, но не здоровых доноров. Таким образом, отмеченные рядом исследователей повышенные концентрации IL-1 $\beta$  и IL-17 в крови и ЦСЖ пациентов с РС [53] могут быть отчасти связаны с реактивацией HHV-6, сопровождающей обострение РС.

Генетические основы чувствительности к HHV-6 инфекции в контексте РС изучались лишь фрагментарно. Оценивая возможную взаимосвязь между факторами риска РС в системе HLA и анти-HHV-6A/B иммунным ответом, Engdahl E. и соавторы [54] сравнили уровень IgG АТ у пациентов с РС (n=446) и здоровых лиц (n=487) с известным HLA-генотипом. Определяли IgG-АТ к лизату полного вириона или к раннему антигену HHV-6 p41. Анти-HHV-6 IgG обнаружены в 90% случаев, без различий между группами с РС и контрольной, в том числе по уровню IgG к полному вирусу или p41. Не найдено влияния главного фактора риска РС HLA-DR\*15 на уровень анти-HHV-6 IgG, но установлена значительная ассоциация носительства протективного аллеля HLA-A\*02 с низкими титрами АТ против HHV-6 (p=0,0015). Интересно, что аналогичную взаимосвязь выявили ранее между наличием в генотипе HLA-A\*02 и низким уровнем IgG против EBNA-1 [3]. Вероятно, низкий уровень АТ против HHV-6 и EBV косвенно отражает наличие более сильного Т-клеточного контроля реактивации этих ГВ у носителей HLA-A\*02, с чем также может быть связан и протективный эффект этого аллеля в отношении развития РС.

В обзоры [2, 46] включены сообщения группы испанских исследователей Alvarez-Lafuente R. с соавторами (2010–2012) о контроле реактивации HHV-6 со стороны гена трансактиватора экспрессии HLA II класса (MHC2TA). Показано, что у HHV-6-позитивных пациентов SNP (rs4774) гена MHC2TA влияет на частоту реактивации вируса, прогрессирования РС и ответа на терапию IFN- $\beta$ . Маркером ответа на терапию IFN- $\beta$  может быть также генотип по SNP (rs2724385) гена CD46 [46]. Кроме того, Vandebroek K. и соавторы [55] обнаружили, что аллель T SNP rs3807306T/G гена IRF-5 (interferon regulatory factor-5) ассоциирован одновременно с риском РС и наличием HHV-6 инфекции у пациентов с РС. Недавно китайские исследователи впервые предприняли транскриптомное секвенирование генома астроцитов человека линии HA1800, инфицированных HHV-6, по сравнению с не инфицированными клетками той же линии [56].

Обнаружили 249 дифференциально экспрессированных генов, из них 9 оказались ассоциированы с РС, причем 4 из 9 ассоциированы также с болезнью Альцгеймера: CH13L1 (chitinase 3-like 1), SERPINA1 (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1), PTX3 (pentraxin 3) и Mx1 (mixovirus resistance 1). По данным литературы продукты этих 4 генов и гена хемокина CXCL16, также ассоциированного с РС, уже известны как биомаркеры РС.

### Сочетанная инфекция EBV и HHV-6 при рассеянном склерозе

Оба ГВ, EBV и HHV-6, как наиболее реальные внешние факторы патогенеза РС, лимфотропны и способны к пожизненному бессимптомному существованию в организме человека несмотря на перекрестную реактивность ряда эпитопов с собственными белками ЦНС хозяина, в том числе антигенами миелина (Cheng W. et al., 2012) [2]. Не только нейротропный HHV-6, но и EBV может инфицировать нейроны человека [6]. Важным общим свойством EBV и HHV-6 является также способность активировать эндогенные ретровирусы человека (HERVs) [2], связь которых с ГВ и роль в патогенезе РС активно изучается [57, 58].

Установление бессимптомной латентной инфекции EBV и HHV-6 у абсолютного большинства инфицированных предполагает развитие стойкого равновесия в системе вирус-хозяин, обусловленного оптимизированным комплексом механизмов иммунной защиты, включающим эффекторные и регуляторные факторы. Какова же причина срыва аутоотолерантности, ведущего к развитию РС в ассоциации с EBV-или HHV-6-инфекцией? Было высказано обоснованное предположение, что критическим моментом может быть время и форма первичной EBV-инфекции [7]. Однако с учетом гетерогенности клинических вариантов РС преобладает мнение, что ни один из «кандидатных» вирусов в отдельности не может вызвать столь комплексное заболевание ЦНС. Скорее взаимодействие разных ГВ, чаще EBV и HHV-6, лежит в основе длительного иммунопатологического процесса в ЦНС с конечным результатом в виде РС [24, 59, 60].

С позиций «гигиенической гипотезы» Krone B. и соавторы [59] предположили, что строгие требования гигиены, изменяя естественную последовательность инфекций в периоде постнатального развития иммунной системы, вызывают

и поддерживают некий дефицит в иммунологической сети, который впоследствии способствует ранним событиям в развитии РС. С этой точки зрения РС с началом в детстве открывает уникальную возможность изучения инфекционной основы этого заболевания. Предполагаемым критическим фактором является отсроченная первичная EBV-инфекция на фоне уже имеющейся инфекции HHV-6, которая ограничивает генерацию Treg как главного фактора регуляции иммунного ответа на EBV. Отметим, что эта мысль находит косвенное подтверждение в сообщении [45] об изменении профиля Т-клеточного ответа у детей с HHV-6 инфекцией. Недостаток негативной регуляции Т-клеточного ответа становится причиной его гиперактивации с лимфопролиферацией, характерной для ИМ. В процесс включаются также гены HERVs, которые активируются под действием широко распространенных ГВ (EBV, HHV-6, VZV и HVS-1,2) [59].

На основании уже известных из литературы сведений Fiertz W. сформулировал гипотезу о взаимодействии двух ГВ (EBV и HHV-6A) как фундаментальном механизме этиопатогенеза РС [60]. При РС оба вируса могут персистировать в ЦНС: нейротропный вирус HHV-6A в астроцитах, а EBV – в латентно инфицированных В-клетках. HHV-6A (но не HHV-6B) способен активировать EBV, не только индуцируя синтез протеинов литического цикла, но и усиливая экспрессию латентных протеинов LMP-1 и EBNA-2, участвующих в иммортализации В-лимфоцитов. Дополнительная связь между вирусами состоит в способности обоих инфицировать астроциты, усиливая в них экспрессию кодируемого HERV-K18 суперантигена, причем генотип HERV-K18.zenv известен как потенциальный фактор риска РС. Оба вируса вызывают Т-клеточный ответ, направленный против EBV, HHV-6A или HERV-K18, который включается в патогенез РС. Автор [60] намечает ряд подходов к получению доказательств правоты этой гипотезы.

Весомым доказательством могло бы стать частое обнаружение одновременной реактивации HHV-6 и EBV-инфекций в стадии обострения РС. Однако сообщений такого рода очень мало. Имеется публикация 2005 года, в которой авторы нашли ДНК EBV и HHV-6B в слюне (41 и 65%) и плазме (17 и 25%) пациентов с РС. У пациентов с высокой активностью болезни частота обнаружения EBV и HHV-6B

была значительно выше, чем у пациентов с низкой активностью болезни, причем присутствие обоих вирусов строго коррелировало в плазме, но не в слюне [61]. Но подтверждений этого факта далее не последовало. Напротив, изучая специфичность олигоклональных цепей (ОСВ) в ликворе пациентов с РС, Virtanen J. и соавторы [62] обнаружили, что из 37 образцов ЦСЖ 14 (38%) содержат ОСВ, реагирующие с EBV или HHV-6, но ни в одном случае с тем и другим ГВ одновременно. Можно предположить, что синхронная репликация этих вирусов с усилением вирус-специфических реакций происходят лишь в отдельные моменты текущего процесса, которые трудно уловить на практике. Действительно, в уже упомянутом исследовании Latham L. и соавторов [21] установлено, что число IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток среди МК, специфичных к EBV или HHV-6, значимо коррелирует с количеством новых очагов РС при тестировании за 2 недели до МРТ, тогда как при тестировании за 4 и 8 недель обнаруживаются лишь EBV-специфические Т-клетки. С другой стороны, одновременная идентификация ДНК EBV и HHV-6 может быть более доступна при первом эпизоде болезни или дебюте РС в детстве, когда этиопатогенетические механизмы проявляются особенно рельефно [59]. В самом деле, в нашем собственном исследовании обострение РС у 23 из 27 детей (85,2%) сопровождалось реактивацией одновременно двух и более ГВ, причем ДНК одновременно EBV и HHV-6 в крови и ЦСЖ выявлена у 17 детей (63%), из них у 7 (26%) в сочетании с другими ГВ (HSV-1,2 и CMV) [63].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неоднократно высказанная мысль об измененном иммунном ответе на ГВ как факторе патогенеза РС [2, 24, 59] находит дальнейшее развитие. Показано, что достоверная связь между РС и высоким титром анти-EBNA-1 IgG может иметь независимую генетическую основу или быть связанной с главным аллелем риска РС – HLA-DRB\*1501 [10, 12]. Установлена значительная ассоциация титра анти-EBV IgG с рядом генов в регионе HLA или вне его [11, 15, 16]. Обнаружено клиническое значение характеристик клеточного анти-EBV иммунного ответа при РС [19, 21, 20]. Функциональная недостаточность EBV-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток и сниженное их число к литическим антигенам вируса свидетельствуют о дефиците контроля реактивации EBV-инфекции при РС [22].

Изучение предрасположенности к заболеванию ИМ не выявило генетической общности с факторами риска РС [15, 25, 26, 27], но обнаружило влияние полиморфизма генов ряда цитокинов [15, 31]. Особенности иммунного ответа при ИМ, кроме мощной экспансии общего пула CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, являются изменение соотношения субпопуляций NK и  $\gamma\delta$  Т-клеток [34, 35, 36, 37, 38, 39] и поликлональная активация В-клеток с появлением ауто-АТ к MOG [43] и, возможно, их проникновением в ЦНС [40, 42].

Подтверждена взаимосвязь между HHV-6A/B инфекцией и РС, в частности, диагностическое значение анти-HHV-6 IgG и IgM [48, 49]. Обнаружены абберации клеточного иммунного ответа против HHV-6 у пациентов с РС по сравнению со здоровыми носителями вируса [50, 51, 52]. Показано влияние вариантов генов MHC2TA, CD46 и IRF-5 на течение HHV-6 инфекции при РС [2, 46, 55]. Идентифицировано изменение экспрессии 9 генов, ассоциированных с РС, в культуре астроцитов человека, инфицированных HHV-6 [56].

Неоднократно высказывалось мнение, что важным фактором этиопатогенеза РС служит сочетанная ГВ инфекция, чаще всего EBV и HHV-6 [2, 24], что находит подтверждение у детей с РС [63]. Предложен ряд гипотез, объясняющих взаимосвязь между этими вирусами и РС [40, 59, 60]. Особый интерес вызывает факт, что протективный в отношении РС аллель HLA-A\*02 ассоциирован с низким уровнем как анти-HHV-6, так и анти-EBNA-1 IgG [3, 54].

Подводя промежуточные итоги изучения роли EBV и HHV-6 инфекций в патогенезе РС, авторы недавних обзоров [57, 58] резюмируют, что связь этих ГВ с РС можно считать доказанной, но ее характер все еще остается неясным. Прогресс в этой области ожидается в расширении знаний о взаимодействии EBV, HHV-6 и HERVs, что требует междисциплинарного подхода. Это направление исследований в перспективе может иметь важное практическое применение в виде расширения специфической противовирусной терапии РС и введения ранней вакцинации против EBV (и других потенциально патогенных ГВ) для снижения риска заболевания РС.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Boiko A. N., Gusev E. I.* Достижения в изучении проблем рассеянного склероза (обзор). Доктор. Ру 2012, 5(73), 9–15. [*Boiko A. N., Gusev E. I.* Advances

- in Multiple Sclerosis Research (Review). Доктор. Ру 2012, 5(73), 9–15].
2. *Железникова Г. Ф., Скрипченко Н. В., Иванова Г. П., Суrowцева А. В., Скрипченко Е. Ю.* Герпесвирусы и рассеянный склероз. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 2016, 9, 133–143. [*Zheleznikova G. F., Skripchenko N. V., Ivanova G. P., Surovzeva A. V., Skripchenko E. Y.* Herpes viruses and multiple sclerosis. Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S. S. Korsakova 2016, 9, 133–143]. DOI: 10.17116/jnevro201611691133–143
3. *Sundqvist E., Sundström P., Lindén M., Hedström A., Aloisi F., Hillert J., Kockum I., Alfredsson L., Olsson T.* Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. Genes Immun. 2012, 13(1), 14–20. doi: 10.1038/gene.2011.42.
4. *Owens G., Bennett J.* Trigger, pathogen, or bystander: the complex nexus linking Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. Mult Scler. 2012, 18(9), 1204–1208. doi: 10.1177/1352458512448109
5. *Mechelli R., Manzari C., Policano C., Annese A., Picardi E., Umerton R., Fornasiero A., D'Erchia A., Buscarinu M., Agliardi C., Annibali V., Serafini B., Rosicarello B., Romano S., Angelini D., Ricigliano V., Buttari F., Battistini L., Centonze D., Guerini F., D'Alfonso S., Pesole G., Salvetti M., Ristori G.* Epstein-Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis. Neurology. 2015, 84(13), 1362–1368. doi: 10.1212/WNL.0000000000001420.
6. *Jha H., Mehta D., Lu J., El-Naccache D., Shukla S., Kovacsics C., Kolson D., Robertson E.* Gammaherpes virus infection of human neuronal cells. Mbio. 2015, 6(6), e01844–15. doi: 10.1128/mBio.01844–15
7. *Márquez A., Horwitz M.* The role of latently infected B cells in CNS Autoimmunity. Front Immunol. 2015, 6, 544. doi: 10.3389/fimmu.2015.00544
8. *Kang M., Kieff E.* Epstein-Barr virus latent genes. Exp Mol Med. 2015;47: e131. doi: 10.1038/emm.2014.84
9. *Albanese M., Tagawa T., Bouvet M., Maliqi L., Lutter D., Hoser J., Hastreiter M., Hayes M., Sugden B., Martin L., Moosmann A., Hammerschmidt W.* Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016, 113(42), E6467–E6475. DOI: 10.1073/pnas.1605884113
10. *Xiao D., Ye X., Zhang N., Ou M., Guo C., Zhang B., Liu Y., Wang M., Yang G., Jing C.* A meta-analysis of interaction between Epstein-Barr virus and HLA-DRB1\*1501 on risk of multiple sclerosis. Sci Rep. 2015, 5, 18083. doi: 10.1038/srep18083
11. *Hammer C., Begemann M., McLaren P., Bartha I., Michel A., Klose B., Schmitt C., Waterboer T., Pawlita M., Schulz T., Ehrenreich H., Fellay J.* Amino acid variation in HLA class II proteins is a major determinant of humoral response to common viruses. Am J Hum Genet. 2015, 97(5), 738–743. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.09.008
12. *Wergeland S., Myhr K., Løken-Amsrud K., Beiske A., Bjerve K., Hovdal H., Midgard R., Kvistad S., Holmøy T., Riise T., Torkildsen Ø.* Vitamin D, HLA-DRB1 and Epstein-Barr virus antibody levels in a prospec-

- tive cohort of multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*. 2016, 23(6), 1064–1070. doi: 10.1111/ene.12986
13. *Tschochner M., Leary S., Cooper D., Strautins K., Chopra A., Clark H., Choo L., Dunn D., James I., Carroll W., Kermode A., Nolan D.* Identifying patient-specific Epstein-Barr nuclear antigen-1 genetic variation and potential autoreactive targets relevant to multiple sclerosis pathogenesis. *PLoS One*. 2016, 11(2), e0147567. doi: 10.1371/journal.pone.0147567
  14. *Lindsey J., deGannes S., Pate K., Zhao X.* Antibodies specific for Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 cross-react with human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *Mol Immunol*. 2016, 69, 7–12. doi: 10.1016/j.molimm.2015.11.007
  15. *Houldcroft C., Kellam P.* Host genetics of Epstein-Barr virus infection, latency and disease. *Rev Med Virol*. 2015, 25(2), 71–84. doi: 10.1002/rmv.1816
  16. *Zhou Y., Zhu G., Charlesworth J., Simpson S., Rubicz R., Göring H., Patsopoulos N., Laverty C., Wu F., Henders A., Ellis J., van der Mei I., Montgomery G., Blangero J., Curran J., Johnson M., Martin N., Nyholt D., Taylor B.* Genetic loci for Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 are associated with risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016, 22(13), 1655–1664. doi: 10.1177/1352458515626598
  17. *Gieß R., Pfuhl C., Behrens J., Rasche L., Freitag E., Khalighy N., Otto C., Wuerfel J., Brandt A., Hofmann J., Eberspächer B., Bellmann-Strobl J., Paul F., Ruprecht K.* Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLoS One*. 2017, 12(4). e0175279. doi: 10.1371/journal.pone.0175279
  18. *Jilek S., Schluep M., Harari A., Canales M., Lysandropoulos A., Zekeridou A., Pantaleo G., Du Pasquier R.* HLA-B7-restricted EBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells are dysregulated in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2012, 188(9), 4671–4680. doi: 10.4049/jimmunol.1103100
  19. *van Nierop G., Mautner J., Mitterreiter J., Hintzen R., Verjans G.* Intrathecal CD8 T-cells of multiple sclerosis patients recognize lytic Epstein-Barr virus proteins. *Mult Scler*. 2016, 22(3), 279–291. doi: 10.1177/1352458515588581
  20. *Lossius A., Johansen J., Vartdal F., Robins H., Jūratė Šaltytė B., Holmøy T., Olweus J.* High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol*. 2014, 44(11), 3439–3452. doi: 10.1002/eji.201444662
  21. *Latham L., Lee M., Lincoln J., Ji N., Forsthuber T., Lindsey J.* Antivirus immune activity in multiple sclerosis correlates with MRI activity. *Acta Neurol Scand*. 2016, 133(1), 17–24. doi: 10.1111/ane.12417
  22. *Pender M., Csurhes P., Burrows J., Burrows S.* Defective T-cell control of Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Clin Transl Immunology*. 2017, 6(1), e126. doi: 10.1038/cti.2016.87
  23. *Гусев Е.И., Бойко А.Н., Ходова М.А., Смирнова Н.Ф., Сиверцева С.А., Смирнов А.В.* Роль инфекционных заболеваний в развитии рассеянного склероза в республике Северная Осетия–Алания. *Детские инфекции* 2014, 1, 19–25. [E. I. Gusev, A. N. Boyko, M. A. Khodova, N. F. Smirnova, S. A. Sivertseva, A. V. Smirnov. The Role of Infectious Diseases in the Development of Multiple Sclerosis in North Ossetia–Alania Republic. *Detskie infekzii* 2014, 1, 19–25]
  24. *Virtanen J., Jacobson S.* Viruses and multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012, 11(5), 528–544. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758194/>
  25. *Nielsen T., Rostgaard K., Askling J., Steffensen R., Oturai A., Jersild C., Koch-Henriksen N., Sørensen P., Hjalgrim H.* Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1\*15 in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009, 15(4), 431–436. doi: 10.1177/1352458508100037
  26. *Ramagopalan S., Meier U., Conacher M., Ebers G., Giovannoni G., Crawford D., Karen A., McAulay K.* Role of the HLA system in the association between multiple sclerosis and infectious mononucleosis. *Arch Neurol*. 2011, 68(4), 469–472. doi: 10.1001/archneurol.2011.48
  27. *Disanto G., Hall C., Lucas R., Ponsonby A., Berlanga-Taylor A., Giovannoni G., Ramagopalan S.* Assessing interactions between HLA-DRB1\*15 and infectious mononucleosis on the risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013, 19(10), 1355–1358. doi: 10.1177/1352458513477231
  28. *Ramakrishnan V., Akram Husain R., Ahmed S.* Genetic predisposition of IL-10 promoter polymorphisms with risk of multiple sclerosis: A meta-analysis. *J Neuroimmunol*. 2017, 306, 11–18. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.02.015
  29. *Huang J., Xie Z., Lu R., Xie Z.* Association of interleukin-1 gene polymorphisms with multiple sclerosis: a meta-analysis. *Inflamm Res*. 2013, 62(1), 97–106. doi: 10.1007/s00011-012-0556-1
  30. *Izad M., Vodjgani M., Niknam M., Amirzargar A., Shahbeigi S., Heidari A., Keramatipour M.* Cytokines genes polymorphisms and risk of multiple sclerosis. *Am J Med Sci*. 2010, 339(4), 327–331. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3181cef1a1
  31. *Akay E., Patel M., Conibear T., Chaggar T., Haque T.* Interleukin 28B gene polymorphisms and Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative diseases. *Intervirology*. 2014, 57(2), 112–115. doi: 10.1159/000357326
  32. *Malhotra S., Morcillo-Suárez C., Brassat D., Goertsches R., Lechner-Scott J., Urcelay E., Fernández O., Drulovic J., García-Merino A., Martinelli Boneschi F., Chan A., Vandenbroeck K., Navarro A., Bustamante M., Río J., Akkad D., Giacalone G., Sánchez A., Leyva L., Alvarez-Lafuente R., Zettl U., Oksenberg J., Montalban X., Comabella M.* IL28B polymorphisms are not associated with the response to interferon- $\beta$  in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2011, 239(1–2), 101–104. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.08.004
  33. *de Lapuente L., Alloza I., Goertsches R., Zettl U., Urcelay E., Arroyo R., Comabella M., Montalban X., Antigüedad A., Vandenbroeck K.* Analysis of the IL28RA locus as genetic risk factor for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2012, 245(1–2), 98–101. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.005
  34. *Chijioko O., Azzi T., Nadal D., Münz C.* Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *J Leukoc Biol*. 2013, 94(6), 1185–1190. doi: 10.1189/jlb.0313173



35. Azzi T., Lünemann A., Murer A., Ueda S., Béziat V., Malmberg K., Staubli G., Gysin C., Berger C., Münz C., Chijioko O., Nadal D. Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood*. 2014, 124(16), 2533–2543. doi: 10.1182/blood-2014-01-553024
36. Münz C. Epstein–Barr virus-specific immune control by innate lymphocytes. *Front Immunol*. 2017, 8, 1658. doi: 10.3389/fimmu.2017.01658
37. Djaoud Z., Guethlein L., Horowitz A., Azzi T., Nemat-Gorgani N., Olive D., Nadal D., Norman P., Münz C., Parham P. Two alternate strategies for innate immunity to Epstein–Barr virus: One using NK cells and the other NK cells and  $\gamma\delta$  T cells. *J Exp Med*. 2017, 214(6), 1827–1841. doi: 10.1084/jem.20161017
38. Jayasooriya S., de Silva T., Njie-jobe J., Sanyang C., Leese A., Bell A., McAulay K., Yanchun P., Long H., Dong T., Whittle H., Rickinson A., Rowland-Jones S., Hislop A., Flanagan K. Early virological and immunological events in asymptomatic Epstein–Barr virus infection in African children. *PLoS Pathog*. 2015, 11(3), e1004746. doi: 10.1371/journal.ppat.1004746
39. Abbott R., Pachnio A., Pedroza-Pacheco I., Leese A., Begum J., Long H., Croom-Carter D., Stacey A., Moss P., Hislop A., Borrow P., Rickinson A., Bell A. Asymptomatic primary infection with Epstein–Barr virus: observations on young adult cases. *J Virol*. 2017, 91(21), pii: e00382–17. doi: 10.1128/JVI.00382–17
40. Otto C., Hofmann J., Ruprecht K. Antibody producing B lineage cells invade the central nervous system predominantly at the time of and triggered by acute Epstein–Barr virus infection: A hypothesis on the origin of intrathecal immunoglobulin synthesis in multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 2016, 91, 109–113. doi: 10.1016/j.mehy.2016.04.025
41. Pfuhl C., Oechtering J., Rasche L., Gieß R., Behrens J., Wakonig K., Freitag E., Pache F., Otto C., Hofmann J., Eberspächer B., Bellmann-Strobl J., Paul F., Ruprecht K. Association of serum Epstein–Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2015, 285, 156–160. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.06.012
42. Ruprecht K., Wildemann B., Jarius S. Low intrathecal antibody production despite high seroprevalence of Epstein–Barr virus in multiple sclerosis: a review of the literature. *J Neurol*. 2018, 265(2), 239–252. doi: 10.1007/s00415-017-8656-z
43. Kakalacheva K., Regenass S., Wiesmayr S., Azzi T., Berger C., Dale R., Brilot F., Münz C., Rostasy K., Nadal D., Lünemann J. Infectious mononucleosis triggers generation of IgG auto-antibodies against native myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Viruses*. 2016, 8(2), pii: E51. doi: 10.3390/v8020051
44. Pantry S., Medveczky P. Latency, integration, and re-activation of human herpesvirus-6. *Viruses*. 2017, 9(7), pii: E194. doi: 10.3390/v9070194
45. Nordström I., Rudin A., Adlerberth I., Wold A., Saalman R., Hesselmar B., Aberg N., Liljeqvist J., Eriksson K. Infection of infants with human herpesvirus type 6 may be associated with reduced allergic sensitization and T-helper type 2 development. *Clin Exp Allergy*. 2010, 40(6), 882–890. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03491.x
46. Dagna L., Pritchett J., Lusso P. Immunomodulation and immunosuppression by human herpesvirus 6A and 6B. *Future Virol*. 2013, 8(3), 273–287. DOI: 10.2217/fvl.13.7
47. Alenda R., Alvarez-Lafuente R., Costa-Frossard L., Arroyo R., Mirete S., Alvarez-Cermeno J., Villar L. Identification of the major HHV-6 antigen recognized by cerebrospinal fluid IgG in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2014, 8, 1096–1101. doi: 10.1111/ene.12435
48. Pormohammad A., Azimi T., Falah F., Faghihloo E. Relationship of human herpes virus 6 and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol*. 2018, 233(4), 2850–2862. doi: 10.1002/jcp.26000
49. Ortega-Madueño I., Garcia-Montojo M., Dominguez-Mozo M., Garcia-Martinez A., Arias-Leal A., Casanova I., Arroyo R., Alvarez-Lafuente R. Anti-human herpesvirus 6A/B IgG correlates with relapses and progression in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014, 9(8), e104836. doi: 10.1371/journal.pone.0104836
50. Wang F., Chi J., Peng G., Zhou F., Wang J., Li L., Feng D., Xie F., Gu B., Qin J., Chen Y., Yao K. Development of virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> regulatory T cells induced by human herpesvirus 6 infection. *J Virol*. 2014, 88(2), 1011–1024. doi: 10.1128/JVI.02586–13
51. Tejada-Simon M., Zang Y., Hong J., Rivera V., Killian J., Zhang J. Detection of viral DNA and immune responses to the human herpesvirus 6 101-kilodalton virion protein in patients with multiple sclerosis and in controls. *J Virol*. 2002, 76(12), 6147–6154.
52. Yao K., Graham J., Akahata Y., Oh U., Jacobson S. Mechanism of neuroinflammation: enhanced cytotoxicity and IL-17 production via CD46 binding. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010, 5(3), 469–478. doi: 10.1007/s11481-010-9232-9
53. Железникова Г. Ф., Скрипченко Н. В., Алексева Л. А., Скрипченко Е. Ю. Цитокины в патогенезе рассеянного склероза. 1. Цитокины врожденного иммунитета. Цитокины и воспаление. 2016, 15(2), 121–132. [G. F. Zheleznikova, N. V. Skripchenko, L. A. Alekseeva, E. Y. Skripchenko *Cytokines in the pathogenesis of multiple sclerosis. Part I. Cytokines of innate immunity. Cytokines and Inflammation* 2016, 15(2), 121–132]
54. Engdahl E., Gustafsson R., Ramanujam R., Sundqvist E., Olsson T., Hillert J., Alfredsson L., Kockum I., Fogdell-Hahn A. HLA-A\*02, gender and tobacco smoking, but not multiple sclerosis, affects the IgG antibody response against human herpesvirus 6. *Hum Immunol*. 2014, 75(6), 524–530. doi: 10.1016/j.humimm.2014.03.001
55. Vandenbroeck K., Alloza I., Swaminathan B., Antüguedad A., Otaegui D., Olascoaga J., Barcina M., de las Heras V., Bartolomé M., Fernández-Arquero M., Arroyo R., Alvarez-Lafuente R., Cénit M., Urcelay E. Validation of IRF5 as multiple sclerosis risk gene: putative role in interferon beta therapy and human herpes virus-6 infection. *Genes Immun*. 2011, 12(1), 40–45. doi: 10.1038/gene.2010.46
56. Shao Q., Lin Z., Wu X., Tang J., Lu S., Feng D., Cheng C., Qing L., Yao K., Chen Y. Transcriptome sequencing of neurologic diseases associated genes in HHV-6A infected human astrocyte. *Oncotarget*. 2016, 7(30), 48070–48080. doi: 10.18632/oncotarget.10127

57. Tao C., Simpson S., Taylor B., van der Mei I. Association between human herpesvirus and human endogenous retrovirus and MS onset and progression. *J Neurol Sci*. 2017, 372, 239–249. doi: 10.1016/j.jns.2016.11.060.
58. Mentis A., Dardiotis E., Grigoriadis N., Petinaki E., Hadjigeorgiou G. Viruses and endogenous retroviruses in multiple sclerosis: From correlation to causation. *Acta Neurol Scand*. 2017, 136(6), 606–616. doi: 10.1111/ane.12775
59. Krone B., Grange J. Multiple sclerosis: are protective immune mechanisms compromised by a complex infectious background? *Autoimmune Dis*. 2011, 2011, 708–750. doi: 10.4061/2011/708750
60. Fierz W. Multiple sclerosis: an example of pathogenic viral interaction? *Virology*. 2017, 14(1), 42. doi: 10.1186/s12985-017-0719-3
61. Höllsberg P., Kusk M., Bech E., Hansen H., Jakobsen J., Haahr S. Presence of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6B DNA in multiple sclerosis patients: associations with disease activity. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2005, 112(6), 395–402. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2005.00516.x
62. Virtanen J., Wohler J., Fenton K., Reich D., Jacobson S. Oligoclonal bands in multiple sclerosis reactive against two herpesviruses and association with magnetic resonance imaging findings. *Mult Scler*. 2014, 20(1), 27–34. doi: 10.1177/1352458513490545
63. Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В., Иванова Г.П., Суворцева А.В., Монахова Н.Е. Цитокины и герпесвирусы при рассеянном склерозе у детей. *Инфекция и иммунитет* 2015, 5(4), 349–358. [Zheleznikova G. F., Skripchenko N. V., Ivanova G. P., Surovtseva A. V., Monakhova N. E. Cytokines and herpesviruses in children with multiple sclerosis. *Infektsiya i immunitet* 2015, 5(4), 349–358.] DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2015-4-349-358>

## IMMUNE RESPONSES TO HERPESVIRUSES AND MULTIPLE SCLEROSIS

© 2019 G. F. Zheleznikova<sup>1\*</sup>, N. V. Skripchenko<sup>1,2</sup>, L. A. Alekseeva<sup>1</sup>,  
E. Y. Skripchenko<sup>1,2,3</sup>

\*E-mail: [zheleznikova.galina@gmail.com](mailto:zheleznikova.galina@gmail.com)

Research Institute of Children Infections of the Federal Medico-Biological Agency of Russia,  
Saint-Petersburg, Russia

Received: 27.07.2018. Accepted: 25.08.2019

The review presents publications mainly for the last 5–7 years, devoted to the further study of the role of herpesviruses in the pathogenesis of multiple sclerosis. Information on the features of the immune response to the Epstein-Barr virus and human herpes virus type 6 with multiple sclerosis is discussed. Hypotheses concerning the involvement of these herpesviruses in immunopathological processes in multiple sclerosis are described.

**Key words:** multiple sclerosis, Epstein-Barr virus, human herpes virus Type 6, immune response, polymorphism of immune response genes

### Authors:

**Zheleznikova G. F.**, MD, PhD, Professor, Senior Research Associate of the Department of Clinical Laboratory Diagnostic of Federal State Budgetary Institution Scientific and Research Institute of Children's Infections of Federal Medical and Biological Agency of Russia, Saint Petersburg, Russia;

197022, Saint-Petersburg, ul. Prof. Popova 9, Research Institute of Children Infections of the Federal Medico-Biological Agency of Russia. Tel.: (812) 234-90-06 (office), 8 905 267 41 32 (mobile). E-mail: [zheleznikova.galina@gmail.com](mailto:zheleznikova.galina@gmail.com);

**Skripchenko N. V.**, Doctor of Medical Science, Professor, Vice-Director for Scientific Work, Federal State Budgetary Institution Scientific and Research Institute of Children's Infections of Federal Medical and Biological Agency of Russia, Saint Petersburg, Russia;

**Alekseyeva L. A.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate of the Department of Clinical Laboratory Diagnostic of Federal State Budgetary Institution Scientific and Research Institute of Children's Infections of Federal Medical and Biological Agency of Russia, Saint Petersburg, Russia;

**Skripchenko E. Yu.**, PhD, Senior Research Associate of the Department of Neuroinfections and Organic Pathology of Nervous System of Federal State Budgetary Institution Scientific and Research Institute of Children's Infections of Federal Medical and Biological Agency of Russia; Head of Children's Neurologic Department, Federal State Budgetary Institution "Institute of Human Brain named after N. P. Bekhtereva, Russian Academy of Sciences", Saint Petersburg, Russia.

## СИСТЕМНАЯ КРАСНАЯ ВОЛЧАНКА: АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ В БЕЛКОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ (NGTA1-Me-pro) С ДВУМЯ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗНЫМИ АКТИВНОСТЯМИ

© 2019 г. А. М. Тимофеева, Г. А. Невинский\*

\*E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения  
Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

Поступила: 13.03.2018. Принята: 25.08.2019

Ранее было показано, что моноклональные легкие цепи (МЛЦ), соответствующие фагемидной библиотеке рекомбинантных легких цепей иммуноглобулинов лимфоцитов периферической крови пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) специфически гидролизуют основной белок миелина (ОБМ). Препараты одной из легких цепей (NGTA1-Me-pro) демонстрировали два оптимальных значения pH, две оптимальные концентрации ионов металлов и два значения  $K_m$  для ОБМ. Два протеазных активных центра NGTA1-Me-pro были металл-зависимыми. В данной работе впервые проведен анализ гомологии белковой последовательности NGTA1-Me-pro с таковыми для нескольких классических  $Zn^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -зависимых, а также сериновых протеаз человека. Проведенный анализ позволил выявить белковые последовательности NGTA1-Me-pro, ответственные за связывание ОБМ, хелатирование ионов металлов и непосредственно катализ. Полученные данные обобщены с помощью гипотетических моделей структуры двух активных центров легкой цепи антител.

**Ключевые слова:** системная красная волчанка, моноклональные легкие цепи, протеолитическая активность, активные центры абзимов

**Принятые сокращения:** АТ, антитела; АК, аминокислота; АИЗ, аутоиммунное заболевание; ОБМ, основной белок миелина; МЛЦ, моноклональная легкая цепь; ММР, металлопротеаза; СКВ, системная красная волчанка; ЭДТА, этилендиаминтетраацетат; PMSF, фенилметилсульфонил фторид

DOI: 10.31857/S102872210007037-5

Адрес: 630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Невинский Георгий Александрович. Тел. / факс: 007(383)3333–677.

E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru

**Авторы:**

**Тимофеева А. М.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия;

**Невинский Г. А.**, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, зав. лабораторией ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Большое число иммуноглобулинов против химически стабильных аналогов переходных

состояний химических реакций, а также природных антител с каталитическими активностями (абзимов) хорошо описаны в литературе (для обзора см. [1–6]). IgG и/или IgA и IgM антитела, гидролизующие ДНК, РНК, АТФ, полисахариды, пептиды и белки были выделены из крови пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями (АИЗ): СКВ, тиреоидит Хашимото, полиартрит, рассеянный склероз, лимфопролиферативные заболевания, полиневриты, злокачественные опухоли, а также при трех вирусных заболеваниях — вирусном гепатите, клещевом энцефалите и иммунодефиците человека ([1–6] и ссылки в них). В то же время, АТ из крови здоровых доноров, а также рядом других заболева-

ний, протекающих без существенных нарушений иммунного статуса, не проявляли заметной каталитической активности [1–6]. Выявление достоверно тестируемых каталитических активностей абзимов возможно на самых ранних стадиях развития различных АИЗ, когда другие иммунологические, биохимические и медицинские показатели этих заболеваний еще статистически достоверно не отличаются от этих показателей для здоровых доноров. Показано, что относительный уровень каталитической активности абзимов может быть использован как для ранней диагностики различного рода АИЗ, так и оценки глубины протекания аутоиммунных процессов [1–6].

Системная красная волчанка (СКВ) является системным аутоиммунным заболеванием, характеризующимся дезорганизацией соединительных тканей, включая повреждения кожи и висцеральных капилляров [7]. К настоящему времени из крови пациентов с СКВ выделены и описаны поликлональные IgG и/или IgA, IgM, гидролизующие ДНК, РНК [8–11], основной белок миелина [12–15] и полисахариды [16–19].

Для получения моноклональных легких цепей (МЛЦ) с ДНКазной и ОБМ-гидролизующей активностями нами была использована библиотека кДНК каппа легких цепей антител периферической крови трех больных СКВ ( $10^6$  вариантов различных легких цепей), которую клонировали в вектор pSANTAB5His6 с помощью стандартных методов [20–23]. Препараты фаговых частиц были получены с использованием *E. coli* TG1 [20–23]. Фаговые частицы, содержащие МЛЦ с различным сродством к ДНК, были разделены хроматографией на ДНК-целлюлозе [24, 25], а к ОБМ – на ОБМ-сефарозе [26, 27]. Было показано, что как минимум 15 из 45 индивидуальных колоний (~ 33%), элюированных с ДНК-целлюлозы 0.5 М NaCl, способны эффективно гидролизовать ДНК [24, 25]. В случае фаговых частиц, элюированных с этого сорбента кислым буфером было выбрано 33 из 687 отдельных колоний. Девятнадцать из 33 клонов (58%) проявили ДНКазную активность [24]. Все 34 гомогенных препарата МЛЦ, выделенные из фагов соответствующих колоний, были активны в гидролизе ДНК, в то время как 30 контрольных препаратов МЛЦ ее не гидролизировали. Все 34 препарата МЛЦ демонстрировали очень индивидуальные зависимости от концентрации ионов металлов и оптимальные концентрации NaCl и KCl, а также различные оптимумы pH [24, 25].

Сродство МЛЦ к ДНК было примерно на 2–3 порядка выше, чем сродство к ДНКазе I.

Фаговые частицы, элюированные с ОБМ-сефарозы с помощью 0.5 М NaCl также были использованы для получения других индивидуальных колоний [26]. В целом, из 440 индивидуальных колоний случайным образом было выбрано 72 колонии. Из 72 колоний 25 (~35%) обладали ОБМ-гидролизующей активностью. Все 25 препаратов электрофоретически гомогенных МЛЦ, соответствующие этим колониям, также эффективно гидролизовали ОБМ. Было показано, что 13 из 23 препаратов МЛЦ являются металлопротеазами; их активность не подавляется PMSF, но сильно ингибируется ЭДТА [26]. Четыре МЛЦ оказались сериновыми протеазами; PMSF подавлял их активность, но не было заметного эффекта ЭДТА. Эффекты PMSF и ЭДТА в случае трех МЛЦ были сопоставимыми: ~40% и 40–60%, соответственно. Совершенно необычными оказались свойства трех других остальных МЛЦ; ЭДТА и PMSF не снижали активности этих препаратов. Эти три МЛЦ оказались тиоловыми протеазами. Все 23 препарата МЛЦ эффективно гидролизировали ОБМ при разных pH оптимумах реакционной среды [26].

Более подробно был проанализирован один препарат МЛЦ с номером 24 [27]. NGTA1-Me-pro (МЛЦ-24) легкая цепь была типичной металлопротеазой; ее активность эффективно ингибировалась только ЭДТА [27]. МЛЦ-24 имела два разных очень хорошо выраженных pH оптимума при pH 6.0 и 8.5. Кроме того, при pH = 6.0 МЛЦ-24 оптимальная концентрация CaCl<sub>2</sub> равна ~6 мМ, а при pH 8.5 – 0,7 мМ. Кажущиеся значения  $K_m$  для ОБМ и  $k_{cat}$  в присутствии CaCl<sub>2</sub> в оптимальной концентрации при pH 6.0 ( $20 \pm 2$  мкМ;  $0.22 \pm 0.02$  мин<sup>-1</sup>), а при pH 8.5 ( $40 \pm 3$  мкМ;  $0.07 \pm 0.005$  мин<sup>-1</sup>) были разными. Все полученные данные однозначно свидетельствовали о том, что NGTA1-Me-pro (МЛЦ-24) имеет два независимых металл-зависимых активных центра [27].

В работах [26, 27] впервые показано, что легкие цепи антител могут содержать от одного до двух (и даже трех) активных центров и катализировать реакции гидролиза ОБМ как протеазы зависимые и независимые от ионов металлов. Эти данные указывали на то, что они могут иметь активные центры в той или иной мере подобные классическим протеазам. Учитывая это, в данной работе впервые проведен анализ белковой последовательности одной из этих МЛЦ

(NGTA1-Me-pro), гомологии ее последовательности с таковыми для различных пептидаз с целью выявления последовательностей подобным таковым для канонических металлопротеаз.

## МЕТОДЫ

### Получение и анализ моноклональных легких цепей

В работе использована фаговая библиотека кДНК рекомбинантных легких цепей к-типа больших СКВ описанная ранее [21]. Амплификацию фага VCSM13 и фракционирование фаговых частиц на ОБМ-сефарозе и получение индивидуальных колоний проводили согласно [21]. Препаративную наработку фаговых частиц, соответствующих отдельным клоном, а также получение гомогенных препаратов моноклональных легких цепей проводили согласно [26, 27].

### ДНК и белковые последовательности NGTA1-Me-pro

Определение нуклеотидной последовательности, соответствующей NGTA1-Me-pro, проводили с использованием полимеразной цепной реакции с использованием праймеров M13 (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') и FdSeq1 (5'-GAATTTTCTGTATGAGG-3') согласно [21]. Определение нуклеотидных последовательностей VL-фрагментов ДНК проводили с использованием автоматического анализатора ДНК SEQTM 2000XL (Beckman) и специального набора «F»SEQDTCS. Нуклеотидные последовательности и соответствующие аминокислотные

(АК) последовательности МЛЦ анализировали с использованием базовых данных IgBLAST и V-base. Нуклеотидная последовательность рекомбинантной МЛЦ была представлена в Gen Bank (gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov): NGTA1.sqngn NGTA1-Me-pro KP096221. Гомологию полных последовательностей МЛЦ и канонических металлопротеаз человека анализировали с использованием lalign ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) и ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Анализ типа генов, соответствующих МЛЦ проводили с использованием сервера BLASTN2.2.27+ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi>). Сравнение последовательностей ДНК МЛЦ-24 с другими легкими цепями, приведенными в базе данных, показало совпадение с зародышевым VL геном легких цепей IGLV8-61\*01, IGLV8-61\*02, and IGLV8-61\*03 (90.0% идентичности).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Нуклеотидная и аминокислотная последовательности МЛЦ-24

Была определена нуклеотидная и соответствующей ей аминокислотная последовательность NGTA1-Me-pro (рис. 1). Эти последовательности соответствуют VL генам различных легких цепей (90% идентичности; см. выше).

Интересно, что только одни и те же белки (и ферменты) разных млекопитающих демонстрируют высокий уровень гомологии (70–95%). Сначала был проведен анализ общей гомоло-

## А ДНК последовательность NGTA1-Me-pro

```
ATGCGGCCGCACATCATCATCACCATCACGGGGCCGCAGAA CAAAAААСТСАТСТСАGAAGAGGATCATGGGGCCGCA
TAGACTGTTGAAAGTTGTTCAAAACC TCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAААСТТАТСГ
TTACGC TAAC TATGAGGGCTGTCTGT GGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTA CTGGTGACGAAАСТСАГТГТАСГ
GTACATGGGTTCCTATTGGGCTTGCTATC CCTGAAAА TGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGCCGGTTCTGAGGGTGGC
GGTAAGAAAААССГТАСГГТАССТАТТ CCGGGCTA TACT TATA TCAA CCCTCTC GACGGCАСТТАТ ССГС СТГГТ
ACGCAAAACCСГСТААТСТААТССТТСТТGGAGTCTCAGCCTCTТААТАСТТТСАТГТТТСАГААТААГТТССГ
AAAGCAGGGTGCATТААСТГТТТАТАСГГСАТГТТАСТСАAGGCACTGACCCCGTTAAAАСТТАТТАССАГТАСАС
ТCCTGTATCA TCAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTTCATТСТГГСТТТА
ATGAGGATCCCATТ ССГТТТГТ GAAA TTG GAGGCCAA TCGTCTGACCTGCCCTCAACCCTCTGTCAA TGCTGGCGG
CGGGCTCTGGGTGGGTGGTTTCTGGGTGGCGGC
```

## Б Белковая последовательность NGTA1-Me-pro

```
1- MRPННТITGPQNKNSSQKRIMGPHRLLKVVQNLIQKIHLLTSGKTTKLIVTLTMRA -58
59- VCGMLQALWVFLVTKLSVTVHGFLGLLSLKMRVVALRVAVLRVAVRKTIVRY -110
111- TYSGLYLYQPSRRHLSAWYAKPRSSFSGVSASYFHVSEVPKAGCINCLYGH - 161
162- VTQG TDPVKTYTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPIPFVKL -211
212 -EANRLTCPOPCOCWRRALGGWFLGGG -238
```

Рис. 1. ДНК (А) и белковая (Б) последовательности моноклональной легкой цепи NGTA1-Me-pro (МЛЦ-24).

гии между различными белками с одинаковыми ферментативными функциями. Оказалось, что уровень общей гомологии таких ферментов существенно ниже. Например, было рассчитано, что гомология (полное совпадение АК) между четырьмя сериновыми протеазами (трипсин, химо трипсин, трипсиноген и эластаза) варьирует от 34,4 до 41% идентичности АК (identity).

В литературе описаны человеческие  $Zn^{2+}$ - [28] и  $Ca^{2+}$ -зависимые протеазы [29]. В отличие от классических металлопротеаз, МЛЦ-24 не является ни  $Zn^{2+}$ -, ни  $Ca^{2+}$ -зависимым ферментом, поскольку активируется ионами различных металлов. Ее максимальная активность наблюдается в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  (100%), а ионы других металлов активируют МЛЦ-24 не намного хуже (%):  $Mg^{2+}$  (65),  $Ni^{2+}$  (50),  $Co^{2+}$  (46),  $Zn^{2+}$  (45),  $Mn^{2+}$  (41),  $Cu^{2+}$  (36), то есть только в 1,5–2,8 раз [27]. Было не понятно с  $Zn^{2+}$ - или  $Ca^{2+}$ -зависимыми протеазами МЛЦ-24 имеет большее структурное сходство. Учитывая это, мы провели сравнение МЛЦ-24 с описанными в литературе  $Zn^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -зависимыми протеазами.

Известны белковые последовательности тринадцати канонических человеческих металлопротеаз (ММР) [30]. Гомология ММР1 с другими двенадцатью ММР (ММР2, ММР3 ММР7-ММР12, ММР14, ММР24 и ММР25) варьирует в диапазоне 33,4–61,5% (identity). Кроме того, относительный уровень гомологии между несколькими парами ММР был ниже 32% идентичности: ММР2-ММР25 (31,3%), ММР9-ММР14 (31,4%), ММР9-ММР25 (30,6%) и ММР9-ММР24 (30,3%).

Число АК остатков девяти  $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз (Calpains или CAPNs с номерами 1–3, 5–10) варьирует от 640 до 821 [29]. Максимальные величины идентичности и подобия (сходство в структуре) наблюдаются для (%): CAPN1-CAPN2 (63.0 и 87.1), CAPN2- CAPN8 (62.0 и 85.8), а также CAPN1- CAPN8: (59.0 и 83.2). В то же время минимальная идентичность и подобие выявлены для (%): CAPN2- CAPN7 (25.2 и 52.7), CAPN3- CAPN7 (24.9 и 51.1), CAPN7- CAPN10 (26.1 и 52.1), CAPN7- CAPN8 (26.3 и 52.9), CAPN1-CAPN7 (26.7 и 53.0) и CAPN7- CAPN9 (26.7 и 51.6). В целом уровень идентичности для девяти ферментов изменяется от 24.9 до 63%, а подобия от 51,1 до 87,1% (средние значения идентичности  $37,9 \pm 11$  и подобия  $63,2 \pm 10,8\%$ ).

Таким образом, общий уровень гомологии между разными ферментами с одинаковыми функциями может быть относительно низким.

Однако, уровень гомологии между отдельными фрагментами этих ферментов, формирующими их активные центры, обычно существенно выше.

Поскольку МЛЦ-24, обладающая металл-зависимой ОБМ-гидролизующей активностью, является типичной легкой цепью, ее последовательность должна сочетать в себе элементы белковых последовательностей, специфичных для V-генов легкой цепи и каких либо известных металлопротеаз. Принимая во внимание низкий уровень общей гомологии между различными ферментами с одинаковыми ферментативными функциями, было трудно ожидать высокого уровня гомологии между МЛЦ-24 и каноническими металлопротеазами. Гомология между NGTA1-Me-pro, обладающей двумя металл-зависимыми активными центрами, и 13 классическими человеческими металлопротеазами варьировала от 23,3 (ММР1) до 36,7% (ММР7). В целом, эти значения гомологии между МЛЦ-24 и металлопротеазами сопоставимы с таковыми для разных пар самих ММР.

Идентичность между NGTA1-Me-pro и девятью классическими человеческими кальций-зависимыми протеазами варьировала от 21,1 (CAPN9) до 25,6% (CAPN8), а подобие от 44.4 (CAPN1) до 50.2% (CAPN5). Все значения идентичности и подобия были сопоставимыми; среднее значения равны соответственно  $23.4 \pm 1.4$  и  $47.7 \pm 2.0$ . В целом, эти значения гомологии между МЛЦ-24 и металлопротеазами, а также МЛЦ-24 и  $Ca^{2+}$ -зависимыми протеазами сопоставимы с таковыми для разных пар самих ММР и CAPN.

Однако, очевидно, что для сравнения белковых последовательностей активных центров МЛЦ и классических протеаз важен не столько уровень их общей гомологии, сколько непосредственно последовательностей, важных для формирования их активных центров.

#### *Анализ возможного расположения в МЛЦ-24 двух сайтов связывания ОБМ*

МЛЦ-24 содержит 238 АК остатков. Однако, каталитические центры МЛЦ-24 могут быть расположены только в ее переменном участке, то есть примерно от 1 до 131 АК. Число АК остатков различных ММР варьирует от 267 до 707, а  $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз от 640 до 821. Во всех ММР аминокислотные остатки, принимающие участие в катализе гидролиза белков, сформированы в виде относительно коротких кластеров, содер-

жащих 7–15 АК. В то же время в Ca<sup>2+</sup>-зависимых протеазах в первичной последовательности три важных для катализа АК (Cys (C), His (H) и Asn (N)), расположены на большом расстоянии друг от друга (от 177 до 229 АК) и сближаются только при формировании третичных структур этих ферментов. Учитывая длину варибельного участка МЛЦ-24 (131 АК) было понятно, что, скорее всего, формирование активных центров МЛЦ-24 может быть в большей степени сходным с таковым для различных ММР. Учитывая это, сначала был проведен анализ возможного подобия МЛЦ-24 с различными ММР.

Все известные человеческие ММР содержат три специфические последовательности, которые важны для связывания белковых субстратов (последовательность типа I), катализа гидролиза белков (последовательность типа II) и хелатирования ионов металлов (последовательность типа III) [28, 30–32]. На **рис. 2** показаны эти три последовательности (I–II), включая наиболее важные для распознавания ферментами субстрата центральные трипептиды, а также концевые АК остатки этих последовательностей (показаны жирным шрифтом). 15-мерные последовательности первого типа в случае различных ММР имеют очень разный уровень совпадения АК (identity), которая варьирует от 28.6 (ММР1–ММР3) до 92.3% (ММР1–ММР-11). Однако такой гомологии, вероятно, может быть достаточно, поскольку эти ММР распознают самые разные белки в основном за счет взаи-

модействия карбонильных групп С=О пептидных связей металлопротеаз с АК, гидролизуемых белков [28, 30–32]. По-видимому, для распознавания белковых субстратов металлопротеазами более важна пространственная структура этих глобулярных молекул и относительное расположение в сайтах ферментов различных АК, ответственных за узнавание субстратов.

Как было показано ранее, МЛЦ-24 имеет два металл-зависимых активных центра [27]. Сравнение белковой последовательности МЛЦ-24 с тринадцатью ММР было проведено с использованием программы LALIGN. Было проанализировано по пять возможных вариантов гомологии (пять выравниваний) для каждой 15-звенной последовательности тринадцати ММР с полной последовательностью МЛЦ-24. На **рис. 3** приведены некоторые примеры анализа гомологии отдельных последовательностей МЛЦ-24 с последовательностями металлопротеаз. Полное совпадение аминокислот этих последовательностей обозначено двоеточием (identity), а АК, имеющих близкие структурные свойства (подобия, similar) – точкой. В последовательности МЛЦ-24 найдено всего два фрагмента, имеющих гомологию с последовательностями тринадцати ММР, ответственными за связывание белкового субстрата. При этом эти последовательности восьми из тринадцати ММР были гомологичны одной из последовательностей МЛЦ-24: 15-KNSSQKRIMGPHRL-29 (**рис. 3А**). Уровень идентичности АК МЛЦ-24 с некоторыми

	I	II	III
MMP1	<b>Spfdgp</b> <u>GGNlahafQ</u>	- DEDERWT	- <b>HelgH</b> slgls <b>H</b>
MMP2	<b>Ypfdgk</b> <u>DGLlahaf A</u>	- DDDELWT	- <b>HefgH</b> amgle <b>H</b>
MMP3	<b>Eadimi</b> <u>SFA vrehgD</u>	- DDDEQWT	- <b>HeigH</b> slglf <b>H</b>
MMP7	<b>Ypfdgp</b> <u>GNTlahaf A</u>	- DEDERWT	- <b>HelgH</b> slgm <b>H</b>
MMP8	<b>Spfdgp</b> <u>NGI lahaf Q</u>	- DAEETWT	- <b>HefgH</b> slgla <b>H</b>
MMP9	<b>Ystcts</b> <u>EGR gdgrlW</u>	- DDDELWS	- <b>HefgH</b> algl <b>d H</b>
MMP10	<b>Ysfdgp</b> <u>GHSlahayP</u>	- DDDEKWT	- <b>HelgH</b> slglf <b>H</b>
MMP11	<b>Lpfdgp</b> <u>GGI lahafF</u>	- DYDETWT	- <b>HefgH</b> vlglq <b>H</b>
MMP12	<b>Hafd</b> <u>gkGGI lahafG</u>	- DEDEFWT	- <b>HeigH</b> slglg <b>H</b>
MMP13	<b>Ypfdgp</b> <u>SGL lahafP</u>	- DDDETWT	- <b>HefgH</b> slgld <b>H</b>
MMP14	<b>Dgeggf</b> <u>LAHayfpgP</u>	- DSAEPWT	- <b>HelgH</b> algle <b>H</b>
MMP24	<b>Dgeggf</b> <u>LAHayfpgP</u>	- DSDEPWT	- <b>HelgH</b> algle <b>H</b>
MMP25	<b>Ypfdgl</b> <u>GGT lahafF</u>	- DDEETWT	- <b>HefgH</b> alglg <b>H</b>

**Рис. 2.** Три специфических фрагмента белковых последовательностей тринадцати человеческих металлопротеаз, которые важны для связывания белковых субстратов (последовательность типа I), катализа реакции гидролиза белкового субстрата (последовательность типа II) и хелатирования ионов металлов (последовательность типа III).

## А Первый вариант гомологии последовательностей МЛЦ и MMP

МЛЦ	VHGF	(50.0% identity, 100.0% similar)
	...:	
MMP1	ANAF	(GGN; SPFDGPGGNLAHAFAQ)
МЛЦ	KLSVTVHGF	(33.3% identity, 77.8% similar)
	: . . . .:	
MMP2	KDGLLAHAF	(DGL, YPFDGKDGLLAHAFA)
МЛЦ	VLVTKLSVTVHG	(25.0% identity, 75.0% similar)
	. . . . .: :	
MMP3	IMIS-FAVREHG	(SFA, EADIMISFAVREHG)
МЛЦ	YTYSG	(50% identity, 83.3% similar)
	: . .:	
MMP7	YPFDG	(GNT, YPFDGPGNTLAHAFA)
МЛЦ	GPHRLL	(50.0% identity, 83.3% similar)
	:: .:	
MMP11	GPGGIL	(GGI, LPFDGPGGILAHAF)
МЛЦ	KLSVTVHGF	(38.9% identity, 55.6% similar)
	: . . . .:	
MMP12	KGGILAHAF	(GGI, HAFDGKGGILAHAF)
МЛЦ	HLSAWYAKP	(28.6% identity, 85.7% similar)
	: . . . :	
MMP14	H--AYFPGP	(LAH, DGEggFLAHAYFPGP)
МЛЦ	VHGFLLG	(28.6% identity, 85.7% similar)
	. . . . .:	
MMP24	ANAYFPGP	(LAH, DGEggFLAHAYFPGP)
МЛЦ	LSVTV HGF	(44.4 identity, 77.8% similar)
	: . . . .:	
MMP25	LGGTLAHAF	(GGT, YPFDGLGGTLAHAF)

## Б Второй вариант гомологии последовательностей МЛЦ и MMP

МЛЦ	GPHRLL	(50.0% identity, 83.3% similar)
	:: .:	
MMP8	GPNGIL	(NGI, SPFDGPGNGILAHAFQ)
МЛЦ	SSQKRIMGPHRL	(41.7% identity, 58.3% similar)
	. . . : : :	
MMP9	TSEGR--GDGRL	(EGR. YSTCTSEGRGDGRLW)
МЛЦ	TITGP	(66.7% identity, 66.7% similar)
	. . .:	
MMP10	SFDGP	(GHS, YSFDGPGHSLAHAYP)
МЛЦ	SVTVHGF	(50.0% identity, 66.7% similar)
	. . . .:	
MMP11	GILAHAF	(GG, LPFDGPGGILAHAF)
МЛЦ	GPHRLL	(66.7% identity, 66.7% similar)
	:: .:	
MMP13	GPSGLL	(SFA, E adimiSFAvrehgD)

Рис. 3. Данные по анализу гомологии фрагментов различных MMP, ответственных за узнавание белковых субстратов, с полной белковой последовательностью МЛЦ-24. В последовательности МЛЦ-24 обнаружено только два фрагмента, имеющих гомологию с белок-связывающими кластерами различных MMP. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) — точкой (А и Б). Локализация этих сайтов в последовательности МЛЦ-24 показана на рис. 3В.

## Гомология последовательностей сайтов связывания белков различными MMP с двумя фрагментами последовательности МЛЦ

1-MRPHITITGPQNKNSSQKRIMGPHRLLKVVQNLIQKIHLLTSGKT  
 TKLIVTLTMRAVCGMLQALWFVLVTKLSVTVHGFLLGLLSLKMRVVALR  
 VAVLRVAVRKTVRYTYSGLYLYOPSRRLHLSAWYAK-131



**А** Гомология первого МЛЦ каталитического сайта с таковыми для MMP

MLCH1	HLS---AW	(25.0% identity, 62.5% similar)
	:... .:	Специфическая последовательность сайта гидролиза
MMP11	HFDYDETW	(DYDETWT)
МЛЦ	HLS---AW	(25.0% identity, 62.5% similar)
	:... .:	
MMP11	HFDYDETW	(DEDEFWT)
МЛЦ	HLSA---W	(25.0% identity, 50.0% similar)
	:... :	
MMP12	HFDEDEFW	(DEDEFWT)
МЛЦ	HL-SA- W	(50.0% identity, 62.5% similar)
	:. :: :	
MMP14	HFDSAEPW	(DSAEPWT)
МЛЦ	HL-S- AW	(37.5% identity, 50.0% similar)
	:. : :	
MMP24	HFDSDEPW	(DSEEPWT)
МЛЦ	HLS---AW	(25.0% identity, 62.5% similar)
	:... .:	
MMP25	HFDDEETW	(DDEETWT)

**Б** Гомология второго МЛЦ каталитического сайта с таковыми для MMP

МЛЦ	QALWFVLVTK	(40.0% identity, 40.0% similar)
	: : ::	
MMP3	Q--W----TK	(DDDEQWT)
МЛЦ	QALW	(25.0% identity, 50.0% similar)
	. :	
MMP8	EETW	(DAEETWT)
МЛЦ	WFV	(33.3% identity, 66.7% similar)
	: .	
MMP11	WTI	(DYDETWT)
MLCH1	WFV	(66.7% identity, 66.7% similar)
	: :	
MMP14	WTV	(DSAEPWT)
МЛЦ	WFVL	(50.0% identity, 75.0% similar)
	: .:	
MMP24	W-TL	(DSEEPWT)
МЛЦ	QALW-F	(33.3% identity, 50.0% similar)
	. : :	
MMP25	EETWTF	(DDEETWT)

**В** Два гипотетических МЛЦ 7-звенных сайта катализа гидролиза ОБМ выделены крупным шрифтом

**1-MRPHIIITITGPQKNSSQKRIMGPHRLKVVQNLQIKHLLTSGKTTKLIVTLTMRAVCG-MLQALWF-VL-70**  
**71- VTKLSVTVHGFLGLLSLKMRRVVALRVAVLRVAVRKTVRTYSGLYLYQPSR-RHLSAWY-AK-131**

**Рис. 4.** Данные по анализу гомологии фрагментов различных MMP, ответственных за катализ реакции гидролиза белков, с полной белковой последовательностью МЛЦ-24. В последовательности МЛЦ-24 обнаружено только два фрагмента, имеющих гомологию с активными центрами различных MMP. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) — точкой (А и Б). Локализация этих сайтов в последовательности МЛЦ-24 показана на рис. 4В.



MMP варьировал от 25 до 50%, а подобию от 55.6 до 100%. В то же время последовательности пяти остальных MMP проявляли гомологию с другой последовательностью МЛЦ-24: 73-KLSVTVHGFLGLLS-87 (рис. 3Б). Уровень идентичности АК варьировал от 50 до 66,7%, а подобию от 58.3 до 83,3%. На рис. 3В показано расположение этих двух сайтов в последовательности МЛЦ.

Следует отметить, что в отличие от классических MMP, гидролизующих разные белки, МЛЦ-24 специфически связывает и гидролизует только ОБМ [27]. Тем не менее, уровень гомологии этих сайтов МЛЦ-24 сопоставим с таковыми для тринадцати разных металлопротеаз (рис. 3). Следует отметить, что сходство пространственных (третичных) структур двух ОБМ-связывающих последовательностей МЛЦ-24 с последовательностями типа I различных MMP может быть значительно выше, поскольку кроме полного совпадения остатков AA (identity), некоторые из неидентичных АК имеют сходные структурные свойства (similar, рис. 3).

#### *Анализ возможной локализации в МЛЦ-24 двух каталитических центров*

Был проведен поиск возможного расположения в последовательности МЛЦ-24 активных центров, осуществляющих гидролиз белков. Глутаминовая кислота (Glu) MMP8 (и других металлопротеаз) связывает и активирует молекулу H<sub>2</sub>O, которая атакует и гидролизует пептидную связь белка-субстрата [28, 30–32]. Некоторые белковые последовательности типа II, содержащие каталитический остаток Glu в тринадцати металлопротеазах, более гомологичны друг другу, чем последовательности типа I: 57% (MMP1-MMP8, MMP1-MMP14) и 100% (MMP1-MMP7). Поиск гомологии показал, что после первой последовательности типа I, МЛЦ-24 содержит последовательность 62-MLQALWF-68: совпадение АК с таковыми для разных MMP 25–50%, а их подобие – 50–62,5% (рис. 4А). Второй центр, гомологичный последовательностям MMP, расположен за вторым сайтом первого типа: 123-RHLSAWY-129: 25–66.7% идентичности и 40–75% подобию АК с таковыми для некоторых MMP (рис. 4Б). Локализация этих сайтов в последовательности МЛЦ показано на рис. 4Б.

Специфической особенностью последовательностей типа II всех MMP является то, что они содержат остаток Trp (W) через одну АК от остатка Glu (E). Интересно, что обе последо-

вательности МЛЦ-24 не содержат остатка Glu, который важен для катализа гидролиза белков всеми MMP. Последовательность второго типа МЛЦ-24 (RHLSAWY) также содержит Trp, но Glu заменен в этой последовательности на остаток Ser (S), который также может связывать и активировать молекулу воды в процессе гидролиза белков [33, 34].

Первый гипотетический активный центр второго типа МЛЦ-24 (MLQALWF) содержит остаток Trp только через две АК от гидрофильного остатка глутамина (Q), также способного активировать молекулу воды [34].

#### *Анализ возможного расположения в МЛЦ-24 центров, хелатирующих ионы металлов*

Рентгеноструктурный анализ Zn<sup>2+</sup>-пептидаз выявил общую структуру белковых последовательностей цинк-связывающих кластеров: NxxxNxxxxxH (рис. 2) [28, 31, 32]. В отличие от классических металлопротеаз, МЛЦ-24 не является Zn<sup>2+</sup>-зависимым ферментом, она активируется ионами Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> [27]. Поэтому было трудно ожидать, что AA-кластер МЛЦ-24, хелатирующий ионы металлов, может быть подобным таковым для классических Zn<sup>2+</sup>-зависимых металлопротеаз. Учитывая это, поиск возможной 11-звенной последовательности типа III, был основан на анализе возможной гомологии каких либо сайтов МЛЦ-24 и последовательностей тринадцати MMP, хелатирующих ионы металлов, а также возможности таких кластеров легкой цепи МЛЦ-24 связывать ионы металлов. Такие хелатирующие кластеры ионов металлов МЛЦ должны содержать три из нескольких известных гидрофильных AA (Ser, Tyr, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln, His и Lys), которые способны образовывать донорно-акцепторные связи с различными ионами металлов. В МЛЦ-24 было найдено только две последовательности гомологичные сайтам хелатирования ионов металлов тринадцати MMP. Первый Me<sup>2+</sup>-связывающий сайт МЛЦ-24, гомологичный сайтам связывания ионов цинка MMP имеет следующую структуру: 79-HGFLGLLSLK-89. Уровень идентичности АК с центрами связывания ионов металлов классических металлопротеаз варьирует от 44,4 до 55,6%, а сходства от 55,6 до 66,7 (рис. 5А). Он содержит только один остаток His и еще две АК, способных эффективно взаимодействовать с ионами металлов. Однако, не обязательно, что именно эти три АК остатка хелатируют ионы

металлов. Например, хелатирующий сайт ионов кальция, может включать карбонильные и/или аминокислотные группы пептидных связей остатков Gln, Ile и Arg [35]. Нельзя исключить, что какая-либо из центральных АК этого кластера способна образовывать связи с ионами металлов за счет карбонильной (C=O) или аминокислотной (O=C-NH-) группы.

Функцию второго 11-звенного сайта связывания ионов  $Me^{2+}$  гипотетически может выполнять последовательность 108-VRYTYSGLYLY-118, содержащая семь АК остатков, каждый из которых способен эффективно взаимодействовать с ионами металлов. Эта последовательность МЛЦ содержит 37,5–55,6% идентичных и 55,6–83,3% близких по структуре АК с таковыми для классических металлопротеаз (рис. 5Б). Локализация этих двух кластеров в белковой последовательности МЛЦ показано на рис. 5В.

Все данные поиска двух сайтов связывания ОБМ типа I, каталитических остатков

АА, способных активировать молекулу воды (последовательность типа II), а также кластеров хелатирования ионов  $Me^{2+}$  (последовательность III) были обобщены в виде гипотетической схемы возможного расположения этих структурных элементов в молекуле МЛЦ-24 (рис. 5В).

*Анализ подобия активных центров МЛЦ и  $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз*

В гидролизе белков кальций-зависимыми протеазами участвуют при АК остатка: Cys (C), His (H) и Asn (N). В девяти различных протеазах Cys может находиться в положениях от 97 (CAPN9) до 359 (CAPN6) с N-конца. His в зависимости от протеазы расположен от Cys на расстоянии от 133 до 205 АК, а Asn – 179–229 АК. Сближение этих АК при формировании активных центров происходит при образовании третичных структур протеаз. Сначала был проведен анализ гомологии 12-звенных фрагментов, содержащих Cys, в случае девяти CAPN-протеаз.

**Гомология между:**

первым каталитическим центром МЛЦ (АЦ1) и Cys-сайтом CAPN1

АЦ1-МЛЦ GML-QALWFVL 36.4% identity; 54.5% similar

: : . : . :

CAPN1 GALGDC-WL-L

первым каталитическим центром МЛЦ (АЦ1) и Cys-сайтом CAPN3

АЦ1-МЛЦ GML-QALWFVL 45.5% identity; 54.5% similar

: : . : . :

CAPN3 GELGDC-WF-L

первым каталитическим центром МЛЦ (АЦ1) и Cys-сайтом CAPN5

АЦ1-МЛЦ GMLQA--LWFV 45.5% identity; 54.5% similar

: : . : . :

CAPN5 G--QVGNCWFV

**Гомология между:**

вторым каталитическим центром МЛЦ (АЦ2) и Cys-сайтом CAPN5

АЦ2-МЛЦ HL-SAWY-A 22.2% identity; 66.7% similar

. . . : . :

CAPN5 QVGNCWFVA

вторым каталитическим центром МЛЦ (АЦ2) и Cys-сайтом CAPN7

АЦ2-МЛЦ LS-AWY-A 37.5% identity; 50.0% similar

: . : : . :

CAPN7 LGDCWLLA

вторым каталитическим центром МЛЦ (АЦ2) и Cys-сайтом CAPN8

АЦ2-МЛЦ LS-AWY-A 37.5% identity; 50.0% similar

: . : : . :

CAPN8 LGDCWLLA

**Рис. 6.** Данные по анализу гомологии первого и второго каталитических центров МЛЦ-24 с Cys-содержащими сайтами CAPN1, CAPN3 и CAPN5. Обнаружено только два фрагмента CAPN с полной белковой последовательностью МЛЦ-24. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) – точкой (А и Б).

Уровень совпадения этих последовательностей CAPN1 с девятью другими протеазами варьировал от 55,6–57,1 (CAPN5 и CAPN6) до 100% (CAPN2 и CAPN7); среднее значение  $81,9 \pm 17,5$ . Интересно, что полное подобие этой последовательностей CAPN1 с другими восьмью протеазами наблюдалось не во всех случаях и варьировало от 85,7 до 100%; среднее значение  $94,8 \pm 5,9$ .

Cys-содержащие сайты девяти CAPN демонстрировали гомологию только с двумя фрагментами последовательности МЛЦ (1–135 АК), которые совпадали с активными центрами легкой цепи, выявленными при анализе гомологии этой последовательности с кластерами тринадцати MMP, содержащими каталитический остаток Glu. Несколько примеров гомологии Cys-содержащих последовательностей  $Ca^{2+}$ -протеаз и важных для катализа двух сайтов МЛЦ приведены на **рис. 6**. В целом для 9 CAPN совпадение АК в случае первого активного центра МЛЦ (CGMLQALWFVLV) варьировало от 36,4 до 45,5% (среднее значение  $39,4 \pm 4,6$ ), а подобие от 54,5 до 63,6 (среднее значение  $55,5 \pm 3,0$ ). Совпадение АК для второго активного центра МЛЦ (PSRRHLSAWYAK) варьировало от 22,2 до 50,0% (среднее значение  $36,3 \pm 7,2$ ), а подобие от 50,0 до 75,5 (среднее значение  $57,1 \pm 9,7$ ).

Особенностью  $Ca^{2+}$ -протеаз является то, что после каталитического Cys находится остаток Trp (например, последовательность CAPN1 – GALGDCWLLAAI). Все MMP содержат остаток Trp через одну АК от остатка Glu (например, MMP1 – DEDERWT). Как  $Ca^{2+}$ -протеазы и MMP, так и первый каталитический центр МЛЦ содержит W остаток (MLQALWF), но через две АК от гидрофильного остатка глутамина (Q), также способного активировать молекулу воды. Последовательность второго типа МЛЦ-24 (RHLSAWY), важная для катализа, также содержит Trp, но Glu, соответствующий MMP, заменен в этой последовательности на остаток Ser (S).

Таким образом, при поиске двух возможных активных центров МЛЦ путем анализа гомологии белковой последовательности легкой цепи с активными центрами MMP и CAPN найдены две те же самые последовательности. Особенностью активных центров MMP и CAPN является то, что они содержат рядом с каталитическими Glu или Cys остаток Trp. Однако, обнаружение одних и тех же ответственных за катализ последовательностей МЛЦ при поиске гомологии ее

белковой последовательности с таковыми для MMP и CAPN, указывало на то, что каталитические центры  $Zn^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -протеаз также могут быть в существенной степени гомологичными. Учитывая это, был проведен анализ гомологии 12-членных последовательностей, окружающих Glu и Cys остатки тринадцати MMP и девяти CAPN, соответственно. Полное совпадение АК варьировало от 25 до 50% (среднее значение  $31,8 \pm 5,8$ ), а подобия от 33,3 до 53,8 (среднее значение  $45,5 \pm 5,2$ ). Эти значения гомологии для каталитических центров 13 MMP и 9 CAPN были сопоставимы для таковых в случае двух центров МЛЦ и CAPN (первый центр совпадение 36,4–45,5% и подобие 54,5–63,6%; второй центр совпадение – 25–50% и подобие 50–75%). Близкая ситуация была выявлена для МЛЦ и MMP: первый центр совпадение АК равно 25–50%, а подобие – 50–62,5%; второй центр совпадение – 25–66,7%, а подобие 40–75%). Таким образом, не смотря на то, что сайты MMP (Glu), CAPN (Cys) и МЛЦ (Gln и Ser), ответственные за катализ, содержат разные АК остатки, непосредственно участвующие в катализе, их белковые последовательности имеют близкий уровень совпадения и особенно подобия АК.

#### *Анализ подобия металл-связывающих центров МЛЦ и $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз*

Кластеры, хелатирующие различные ионы металлов, как и важные для катализа АК остатки могут в своем составе содержать некоторое число одинаковых АК. Известны последовательности  $Ca^{2+}$ -хелатирующих сайтов нескольких CAPN, число которых в зависимости от фермента может изменяться от двух до семи [29]. Достаточно подробно описаны два  $Ca^{2+}$ -связывающих сайта каталитической субъединицы CAPN1 и четыре сайта CAPN2 [29].

Сначала был проведен поиск гомологии последовательностей  $Ca^{2+}$ -связывающих сайтов CAPN1 и CAPN2. Результат этого анализа был несколько неожиданным; уровень гомологии  $Ca^{2+}$ -хелатирующих сайтов протеаз был относительно низким (совпадение АК остатков  $\leq 20$ –25%). На **рис. 7** приведены примеры анализа гомологии некоторых CAPN1 и CAPN2 последовательностей с повышенной гомологией. Уровень совпадения АК остатков этих последовательностей варьировал от 33 до 75%, а сходства от 58,3 до 83,3%.

Был проведен анализ гомологии последовательностей  $Ca^{2+}$ -связывающих сайтов CAPN1

Гомология между:  
 первым и вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром CAPN2  
 CAPN2-1s DSDGSGKLGLK-E 38.5% identity; 61.5% similar  
 : : :: . . . :  
 CAPN2-2s DVDRSGTMN-SYE  
 первым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром CAPN2 и третьим CAPN1  
 CAPN2-1 DSDGSGKLGLKE 75.0% identity; 83.3% similar  
 : ::::: :  
 CAPN1-3 DRDNGKGLLVE  
 Вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром CAPN2 и третьим CAPN1  
 CAPN2-2 DVDRSGTMNSYE 33.3% identity; 58.3% similar  
 : : .: . . :  
 CAPN1-3 DRDNGKGLLV  
 Третьим и четвертым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром CAPN1  
 CAPN1-3 DRDNGKGLLVE 33.3% identity; 66.7% similar  
 : : : . . . :  
 CAPN1-4 DLDKSGSMSAYE

Гомология между:  
 первым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP1  
 CAPN2-1 D-G-SGKLGL 50.0% identity; 60.0% similar  
 . : : : :  
 MMP1 ELGHS--LGL  
 первым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP10  
 CAPN2-1 GK-LGLK 57.0% identity; 85.7% similar  
 : . : : : .  
 MMP10 GHVLGLQ  
 первым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP24  
 CAPN2-1 GKGLGLKE 71.4% identity; 71.4% similar  
 : : : : :  
 MMP24 GALGL-E

Гомология между:  
 вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP13  
 CAPN2-2 DVDRS-GTMN 20.0% identity; 60.0% similar  
 . . : : : . .  
 MMP13 EFGHSLG-LD  
 вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP1  
 CAPN2-2 DVDRS-GTMNSY 25.0% identity; 66.7% similar  
 . . : : : . . : .  
 MMP1 ELGHSLG-L-SH  
 вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP24  
 CAPN2-2 G-TMNSYE 37.5% identity; 62.5% similar  
 : . . . :  
 MMP24 GHAMG-LE

**Рис. 7.** Данные по анализу гомологии  $\text{Ca}^{2+}$ -хелатирующих центров различных CAPN, двух  $\text{Ca}^{2+}$ -сайтов различных CAPN и  $\text{Zn}^{2+}$ -кластеров разных MMP. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) – точкой.

и CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -связывающих кластеров MMP. На рис. 7 показано несколько примеров анализа гомологии некоторых  $\text{Ca}^{2+}$ -сайтов CAPN1 и CAPN2 с  $\text{Zn}^{2+}$ -сайтами MMP. В целом уровень совпадения АК остатков этих последовательностей CAPN1 и CAPN2 с  $\text{Zn}^{2+}$ -кластерами

тринадцати MMP варьировал от 25 до 50%, а сходства от 33.3 до 53.8% (средние величины равны  $31,8 \pm 5,8$  и  $45,5 \pm 5,2\%$ , соответственно). Таким образом, уровень гомологии между  $\text{Ca}^{2+}$ -сайтами CAPN1 и CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -кластерами тринадцати MMP вполне сопоставим не смо-

**Гомология первого (79-HGFLGLLSLK-89) и второго (108-VRYTYSGLYLY-118) сайтов связывания ионов металлов МЛЦ с третьим Ca<sup>2+</sup>-связывающим кластером CAPN1**

**Первый Me-связывающий сайт МЛЦ**

**L G L V** (sequence 3 CAPN1: 75.0% identity; 100% similar)

: : : .

**Второй Me-связывающий сайт МЛЦ**

79-H **G F L L G L L S L K** MRVVALRVAVLRVAVRKT**VRYT Y S G L Y L** YQPSRRHLSAWYAK-131

. : : : .

: . : : :

**N G - K L G L V**

**R - DGNG K L G L**

(sequence 3 CAPN1: 50.0% identity; 75.0% similar)

(sequence 3 CAPN1: 50.0% identity; 75.0% similar)

**Гомология первого (79-HGFLGLLSLK-89) и второго (108-VRYTYSGLYLY-118) сайтов связывания ионов металлов МЛЦ с первым Ca<sup>2+</sup>-связывающим кластером CAPN2**

**Первый Me-связывающий сайт МЛЦ**

**G S - G K L G L K** (sequence 1 of CAPN2: 50.0% identity; 60.0% similar)

: : : : :

**Второй Me-связывающий сайт МЛЦ**

80-**G F L L G L L S L K** MRVVALRVAVLRVAVRKT**VRYTYS G L Y L** YQPSRRHLSAWYAK-131

: : : :

: : : :

**G- K L G L** (sequence 1 of CAPN2:

**S G K L G L** (sequence 1 of CAPN2)

66.7% identity; 66.7% similar)

**Рис. 8.** Данные по анализу гомологии первого и второго сайтов связывания ионов металлов МЛЦ с сайтами хелатирования ионов кальция CAPN1 и CAPN2. Фрагменты последовательности МЛЦ (79–131 АК), имеющие гомологию с сайтами CAPN1 и CAPN2, отмечены жирным шрифтом. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) – точкой.

тря на то, что они хелатируют ионы разных металлов.

Учитывая относительно низкий уровень гомологии между последовательностями Ca<sup>2+</sup>-связывающих сайтов CAPN, трудно было ожидать их хорошей гомологии с двумя сайтами связывания ионов различных металлов МЛЦ. Для поиска возможных сайтов связывания ионов металлов в последовательности МЛЦ (1–131 АК) сначала был проведен поиск фрагментов последовательности МЛЦ, которые имеют гомологию с четырьмя Ca<sup>2+</sup>-хелатирующими кластерами CAPN1. Последовательность 3 (DRDGNGKLGLE) CAPN1 была гомологичной только двум фрагментам МЛЦ (**рис. 8**). При этом с использованием пяти альтернативных выравниваний третьей последовательности CAPN1 и МЛЦ было выявлено два варианта гомологии с последовательностью первого (CGMLQALWFVLV) и один вариант гомологии с последовательностью второго Me-связывающего кластера (PSRRHLSAWYAK), выявленных при анализе гомологии Zn<sup>2+</sup>-хелатирующих центров MMP и МЛЦ (**рис. 8**). Совпаде-

ние АК указанных последовательностей CAPN1 и МЛЦ варьировало от 50 до 75%, а сходства от 75 до 100% (**рис. 8**). Других участков гомологии третьего сайта CAPN1 с общей последовательностью МЛЦ выявлено не было.

Далее был проведен анализ гомологии двух Ca<sup>2+</sup>-связывающих сайтов каталитической субъединицы CAPN2 с возможными последовательностями МЛЦ. И в этом случае было обнаружено только два фрагмента последовательности МЛЦ гомологичных первой Ca<sup>2+</sup>-хелатирующей последовательности CAPN2 (DSDGSGKLGLE), которые совпадали с выявленными с помощью последовательности CAPN1 (**рис. 8**). Совпадение АК последовательности CAPN2 и двух фрагментов МЛЦ варьировало от 50 до 66,7%, а сходства от 60 до 67% (**рис. 8**). Таким образом, поиск гомологии возможных Me<sup>2+</sup>-связывающих кластеров МЛЦ с Zn<sup>2+</sup>-хелатирующими последовательностями MMP и Ca<sup>2+</sup>-узнающими сайтами CAPN привел к выявлению двух одних и тех последовательностей легких цепей. Интересно, что уровень совпадения и сходства

**1-ый ОБМ-связывающий сайт**  
**1-MRPHITITGPRQNKSSQKRIMGPHRLLKVVQNLIQKINLLTSGKTTK-49**

**1-ый центр катализа**  
**50-LIVTLTMRAVCGMLQALWFVL-70**

**2-ой ОБМсвязывающий сайт**  
**71-VTKLSVTVHGFLLGLLSLKMRVVALRVA-98**  
**79-HGFLLGLLSLK-89**

**1-ый металл-связывающий сайт**  
**2-ой металл-связывающий сайт**  
**99-VLRVAVRKTVRYTYSGLYLYQP-120**

**2-ый центр катализа**  
**121-SRRHLSAWYAKPRSSFS-137**

**138-GVSASYFHVSEVPKAGCINCLYGHVQTGDPVKTYQYTPVSSKAMYDAYW**  
**NGKFRDCAFHSGFNEDPIPFVKLEANRLTCPQSCQCWRRALGGWFLGGG -238**

**Рис. 9.** Гипотетическая модель структуры (АК-последовательностей) и возможной локализации двух альтернативных наборов фрагментов последовательности NGTA1-Me-pro, которые могут быть ответственны за специфическое распознавание ОБМ (последовательность типа I), двух гипотетических центров катализа гидролиза ОБМ (последовательность II) и двух металл-хелатирующих кластеров (последовательность III).

АК металл-связывающих сайтов МЛЦ сопоставим с таковыми для  $\text{Ca}^{2+}$ -узнающих кластеров CAPN. В целом, уровень гомологии двух  $\text{Me}^{2+}$ -сайтов МЛЦ с кластерами связывающими ионы металлов CAPN и MMP сопоставим с таковыми для самих CAPN и самих MMP, а также CAPN и MMP.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Данные работ [26, 27] свидетельствуют о чрезвычайном разнообразии анти-ОБМ рекомбинантных каппа легких цепей в их родстве к ОБМ и других физико-химических свойствах. В этой статье впервые проведен анализ возможного расположения активных центров в NGTA1-Me-pro, описанной ранее [27]. Анализ ДНК последовательности клона NGTA1-Me-pro показал, что МЛЦ-24 относится к генам VL зародышевой линии.

NGTA1-Me-pro является необычной протеазой, с двумя альтернативными активными центрами металлопротеазы [27]. Известные значения  $k_{\text{cat}}$  для природных абзимов из крови аутоиммунных пациентов, катализирующих многие различные химические реакции, варьируют в ди-

апазоне  $1 \times 10^{-5}$ –40 мин<sup>-1</sup> ([3–6] и ссылки на них). NGTA1-Me-pro характеризовалась двумя относительно высокими значениями  $k_{\text{cat}}$  ( $0,07 \pm 0,005$  и  $0,22 \pm 0,02$  мин<sup>-1</sup>) [27].

По структуре и расположению АК остатков, ответственных за катализ МЛЦ больше похожа на тринадцать MMP. Эти человеческие  $\text{Zn}^{2+}$ -зависимые MMP хорошо описаны ранее [28, 30–32]. Они различаются по длине (267–707 АА остатков), тогда как NGTA1-Me-pro содержит 238 остатков АА (теоретическая мол. масса 26814,6 Да). Гомология между полными белковыми последовательностями тринадцати MMP сильно отличается, 30,3–61,5%. Кроме того, даже для фрагментов последовательностей MMP ответственных за связывание белков, уровень гомологии (идентичность АК) металлопротеаз варьирует от 28.6% (MMP1-MMP3) до 92.3% (MMP1-MMP11). В тоже время с учетом АК, имеющих близкие структурные свойства, сходство в АК этих последовательностей MMP варьирует от 57,1 до 92.3%, соответственно. Нами найдено только два сайта МЛЦ-24, которые имеют гомологию с белок-узнающими последовательностями MMP: 15-KNSSQKRIMGPHRLL-29 и 73-KLSVTVHGFLLGLLS-87; уровень иден-



тичности (25,0–66,7%) и сходства (55,6–100%) их АК с последовательностями MMP (рис. 3) сопоставим с таковым для тринадцати металлопротеаз. Совпадение (37,5%) и сходство (62,5%) АК остатков между этими двумя последовательностями МЛЦ-24 также близко к этому диапазону величин. Данные о сайтах связывания белков CAPN-ферментами в литературе отсутствуют.

Значение  $K_m$  для ОБМ при pH 6,0 (6,0 мМ CaCl<sub>2</sub>) равно  $20 \pm 2$  мкМ ( $k_{cat} = 0,22 \pm 0,02$  мин<sup>-1</sup>) и при pH 8,5 (0,7 мМ CaCl<sub>2</sub>)  $K_m = 40 \pm 3$  мкМ ( $k_{cat} = 0,07 \pm 0,005$  мин<sup>-1</sup>) [27]. Не смотря на то, что эти центры отличаются по сродству к ОБМ только в два раза, они характеризуются существенной разницей в сродстве к CaCl<sub>2</sub> и величинах  $k_{cat}$ .

Для сайтов, ответственных за хелатирование ионов металлов, степень совпадения АК у разных MMP варьирует от 54.5% (MMP2-MMP7) до 90.9% (MMP1-MMP10). Можно было предположить, что именно специфические последовательности MMP, ответственные за катализ, характеризуются более высоким уровнем гомологии. Однако и эти сайты у разных MMP могут существенно отличаться. Для некоторых MMP уровень их гомологии относительно низкий, только 57%. Относительно небольшое число MMP характеризуются степенью гомологии между этими сайтами от 86 до 100%, но в основном для большинства пар MMP он равен 71%

Не смотря на то, что протеазная активность МЛЦ-24 лучше всего активируется ионами Ca<sup>2+</sup>, другие ионы металлов также эффективные кофакторы металл-зависимого активного центра МЛЦ-24 [27]. NGTA1-Me-pro не является Zn<sup>2+</sup>-зависимой протеазой, это абзим с универсальным центром связывания ионов различных металлов. Мы обнаружили только две последовательности МЛЦ-24 с относительно высокой гомологией с сайтами MMP, связывающими ионы цинка: 79-HGFLLGLLSLK-89 и 108-VRYTYSGLYLY-118 (рис. 6). Уровень идентичности (37,5–55,6%) и сходства (55,6–83,3%) АК с таковыми для тринадцати MMP варьирует в широком диапазоне (рис. 5). Сродство одного из этих центров к ионам Ca<sup>2+</sup> (0,7 мМ) примерно в 8,6 раз выше, чем ко второму (6,0 мМ) [27]. Поскольку во второй последовательности 7 из 11 АК остатков способны взаимодействовать с ионами металлов, скорее всего именно этот кластер имеет более высокое сродство к ионам Ca<sup>2+</sup>. Неожиданным в случае первого гипотети-

ческого кластера связывания ионов металлов (79-HGFLLGLLSLK-89) было то, что он частично перекрывается со вторым ОБМ-узнающим сайтом МЛЦ (73-KLSVTVHGFLGLLS-87) (рис. 6). С одной стороны нельзя исключить, что при связывании ОБМ с одним из сайтов его узнавания, этот первый 79–89-кластер может связывать ионы металлов и активировать реакцию гидролиза белка. В то же время, при образовании комплекса ОБМ с 73–87-сайтом, могут функционировать ионы металлов связанные с хелатирующей последовательностью 108–118-кластера.

Было обнаружено только две последовательности МЛЦ-24, гомологичные последовательностям активных центров тринадцати MMP MLQALWF и RHLSAWY. Уровень гомологии этих последовательностей (25–66,7% идентичности) и тринадцати MMP (57–100% идентичности) не на много ниже (рис. 4).

Интересно, что при поиске гомологии Су-содержащих и Ca<sup>2+</sup>-хелатирующих сайтов различных CAPN с последовательностью МЛЦ обнаружены по два тех же самых кластеров, ответственных за катализ и связывание ионов металлов легкой цепью, что и при поиске этих последовательностей при анализе гомологии Glu-содержащих кластеров и Zn<sup>2+</sup>-узнающих сайтов тринадцати MMP с белковой последовательностью легкой цепи. Учитывая это, все данные по поиску трех типов центров, важных для связывания белков-субстратов, узнавания ионов металлов и катализа обобщены нами на рис. 9. С нашей точки зрения, именно эти гипотетические сайты МЛЦ с очень большой вероятностью выполняют функцию трех типов центров, известных для классических металлопротеаз.

Следует отметить, что МЛЦ-24 демонстрирует два разных pH-оптимума: 6.0 и 8.5 [27]. В случае второго гипотетического активного центра МЛЦ-24 остаток Ser может служить активатором молекулы воды. Как известно, рK Ser в активных центрах разных ферментов колеблется от 8 до 9 [31]. Следовательно, оптимальное значение pH = 8,5 в большей степени согласуется с рK остатка Ser второго активного центра МЛЦ-24 металлопротеазы. Для амидов кислот рK амино-групп обычно находятся между 5,5 и 7,5 [31]. Поэтому Q остаток первого центра лучше соответствует второму оптимальному значению pH 6,0 гипотетического активного центра МЛЦ-24.

Второй активный центр МЛЦ-24 (RHLSAWY) можно рассматривать как необычный гибридный пока не описанный металл-зависимый

центр сериновой протеазы. Учитывая это, был проведен анализ гомологии белковой последовательности МЛЦ-24 с таковыми для классических протеаз (трипсин, химотрипсин и эластаза). Три варианта анализа привели к следующим значениям (идентичность и сходство): трипсин, 24,1–27,0 и 52,3–56,3%; химотрипсин, 26,2–31,4 и 48,6–62,3%; эластаза 25,4–30,6 и 52,9–65,2%. Таким образом, общий уровень гомологии между полными белковыми последовательностями МЛЦ-24 и канонических протеаз также сопоставим с таковыми для самих сериновых протеаз (34,4–41,0%).

В случае сериновых протеаз катализ гидролиза белков осуществляется с помощью остатка Ser, входящего в состав триады: Ser-His-Glu. Однако, в отличие от тринадцати ММР, высокого уровня гомологии каких либо белковых фрагментов МЛЦ-24 с последовательностями трипсина, химотрипсина и эластазы, содержащими АК остатки этой триады, найдено не было. По-видимому, в отличие от сериновых протеаз, активация остатков Ser и Glu двух активных центров МЛЦ может осуществляться с помощью ионов металлов.

В данной работе нами впервые проведен анализ возможного расположения структурных элементов МЛЦ, обладающей двумя металлопротеазными центрами. На основании проведенного анализа предложена гипотетическая модель расположения в легкой цепи сайтов, ответственных за связывание белкового субстрата, хелатирование ионов металлов и непосредственно катализ (рис. 9).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Мы очень благодарны S. Paul и S. Plaquet (University of Texas Houston Medical School, USA) за предоставление нам библиотеки cDNA пациентов SLE. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-15-10103).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Catalytic antibodies. (E. Keinan eds) Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Germany, 2005, pp.1–586
2. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Natural catalytic antibodies – abzymes. In Catalytic antibodies (E. Keinan, Eds). VCH-Wiley press, Germany, 2004, pp. 503–567.
3. Nevinsky G. A. (2010) Natural catalytic antibodies in norm and in autoimmune diseases, in: Brenner KJ (ed.), Autoimmune Diseases: Symptoms, Diagnosis and Treatment. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp. 1–107.
4. Nevinsky G. A. Natural catalytic antibodies in norm and in HIV-infected patients. In Understanding HIV/AIDS Management and Care – Pandemic Approaches the 21<sup>st</sup> Century (F. H. Kasenga Eds), InTech, Rijeka, Croatia. 2011, pp. 151–192.
5. Nevinsky G. A. Autoimmune processes in multiple sclerosis: production of harmful catalytic antibodies associated with significant changes in the hematopoietic stem cell differentiation and proliferation. In Multiple sclerosis (A. Gonzales-Quevedo Eds), InTech, Rijeka, Croatia, 2016, pp 100–147.
6. Nevinsky G. A. Catalytic antibodies in norm and systemic lupus erythematosus. In Lupus (Khan W.A, ed.), InTech, Rijeka, Croatia, 2017, pp. 41–101.
7. Hhachn B. Ch. Systemic lupus erythematosus (Braunvald, E.E., Isselbaker, K.D., Petersdorf, R.G., Wilson, D.D., Martin, D.B., and Fauchi, A.S., eds), Medicine, Moscow: Internal diseases, 1996, pp. 1–407.
8. Shuster A. M., Gololobov G. V., Kvashuk O. A., Bogomolova A. E., Smirnov I. V., Gabibov A. G. DNA hydrolyzing autoantibodies. Science, 1992, 256, 665–667.
9. Andrievskaya O. A., Buneva V. N., Baranovskii A. G., Gal'vita A. V., Benzo E. S., Naumov V. A., Nevinsky G. A. Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus. Immunol. Lett., 2002, 81, 191–198.
10. Andrievskaya O. A., Buneva V. N., Naumov V. A., Nevinsky G. A. Catalytic heterogeneity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgM from sera of patients with lupus erythematosus. Med. Sci. Monit., 2000, 6, 460–470.
11. Бунева В. Н., Андриевская О. А., Романникова И. В., Гололобов Г. В., Ядав П. П., Ямковой В. И., Невинский Г. А. Взаимодействие каталитически активных антител с олигорибонуклеотидами. Молекуляр. биология, 1994, 28, 738–743.
12. Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Doronin B. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Affinity and catalytic heterogeneity and metal-dependence of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with systemic lupus erythematosus. J. Mol. Recognit., 2011, 24, 960–974.
13. Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A. IgGs Containing light chains of the lambda- and kappa- type and of all subclasses (IgG1-IgG4) from the sera of patients with systemic lupus erythematosus hydrolyze myelin basic protein. Int. Immunol., 2012, 24, 759–770.
14. Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Doronin B. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Affinity and catalytic heterogeneity and metal-dependence of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with systemic lupus erythematosus. J. Mol. Recognit., 2011, 24, 960–974.
15. Bezuglova A. M., Dmitrenok P. S., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Multiple sites of the cleavage of 17- and 19-mer encephalytogenic oligopeptides corresponding to human myelin basic protein (ОБМ) by specific anti-ОБМ antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. Peptides, 2012, 37, 69–78.
16. Savel'ev A. N., Eneyskaya E. V., Shabalin K. A., Filatov M. V., Shabalin K. A. Autoantibodies with amylolytic activity. Prot. Pept. Lett., 1999, 6, 179–184.

17. *Ivanen D. R., Kulminskaya A. A., Ershova N. A., Eney-skaya E. V., Shabalin K. A., Savel'ev A. N., Kanyshkova T. G., Buneva V. N., Nevinsky G. A., Neustroev K. N.* Human autoantibodies with amylolytic activity. *Biologia*, 2002, 11, 253–260.
18. *Savel'ev A. N., Kulminskaya A. A., Ivanen D. R., Nevinsky G. A., Neustroev K. N.* Human antibodies with amylolytic activity. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2004, 16, 17–31.
19. *Neustroev K. N., Ivanen D. R., Kulminskaya A. A., Brumer I. H., Saveliev A. N., Nevinsky G. A.* Amylolytic activity and catalytic properties of IgM and IgG antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Hum. Antibodies*, 2003, 12, 31–34.
20. *Tyutyulkova S., Gao Q. S., Thompson A., Rennard S., Paul S.* Efficient vasoactive intestinal polypeptide hydrolyzing autoantibody light chains selected by phage display. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1316, 217–223.
21. *Paul S., Tramontano A., Gololobov G., Zhou Y. X., Taguchi H., Karle S., Nishiyama Y., Planque S., George S.* Phosphonate ester probes for proteolytic antibodies. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 28314–28320.
22. *Clackson T., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Winter G.* Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 1991, 352, 624–628.
23. *McCafferty J., Fitzgerald K. J., Earnshaw J., Chiswell D. J., Link J., Smith R., Kenten J.* Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1994, 47, 157–173.
24. *Botvinskaya A. V., Kostrikina I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Systemic lupus erythematosus: molecular cloning of several recombinant DNase monoclonal kappa light chains with different catalytic properties. *J. Mol. Recognit.*, 2013, 26, 450–460.
25. *Kostrikina I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Systemic lupus erythematosus: Molecular cloning of fourteen recombinant DNase monoclonal kappa light chains with different catalytic properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, 1840, 1725–1737.
26. *Timofeeva A. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Systemic lupus erythematosus: molecular cloning and analysis of 22 individual recombinant monoclonal kappa light chains specifically hydrolyzing human myelin basic protein. *J. Mol. Recognit.*, 2015, 28, 614–627.
27. *Timofeeva A. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Systemic lupus erythematosus: molecular cloning and analysis of recombinant monoclonal kappa light chain NGTA1-Me-pro with two metalloprotease active centers. *Mol. Biosyst.*, 2016, 12, 3556–3566.
28. *Соловьева Н. И.* Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции. *Биоорган. Химия*, 1998, 24, 245–255.
29. Site: <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=calpain&fil=organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22&sort=score>
30. MMP последовательности: 1) <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9L7Q2>; 2) <https://www.uniprot.org/uniprot/Q65JJ2>; 3) <https://www.uniprot.org/uniprot/B7JJ20>
31. *Verma R. P., Hansch C.* Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007, 15, 2223–2268.
32. *Whittaker M., Floyd C. D., Brown P., Gearing A. J.* Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2735–2776.
33. *Polgár L.* The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, 62, 2161–72.
34. *Fersht A.* *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup> ed., W. H. Freeman, Co., New York, 1985.
35. *Hou H., Wang S., Zhu X., Li Q., Fan Y., Cheng D., Li B.* A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex. *Food Chem.*, 2018, 243, 389–395.

**SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: ANALYSIS OF POSSIBLE  
LOCALIZATION OF ACTIVE SITES IN A PROTEIN SEQUENCE  
OF MONOCLONAL LIGHT CHAIN (NGTA1-Me-pro)  
WITH METALLOPROTEASE ACTIVITIES**

© 2019 А. М. Тимофеева, Г. А. Невинский\*

\*E-mail: nevinisky@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch  
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

**Received:** 13.03.2018. **Accepted:** 25.08.2019

It was shown previously that monoclonal light chains (MLCh) corresponding to the phagemid library of recombinant light chains of immunoglobulin of peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) specifically hydrolyze only the myelin basic protein (MBP). The preparations of one of the light chains (NGTA1-Me-pro) demonstrated two optimal pH values, two optimal concentrations of metal ions and two  $K_m$  values for MBP. Two protease active centers of NGTA1-Me-pro were metal-dependent. In this paper, the homology of protein sequence NGTA1-Me-pro with those for several classical  $Zn^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -dependent as well as serine human proteases was analyzed for the first time. The analysis revealed possible protein sequences NGTA1-Me-pro responsible for the binding of MBP, chelation of metal ions and direct catalysis. The data obtained are generalized by means of hypothetical models of the structure of two active centers of the light chain of antibodies.

*Key words:* Systemic lupus erythematosus, monoclonal light chain, proteolytic activity, active centers of abzymes

**Authors:**

**Timofeeva A. M.**, PhD, Junior researcher, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

**Nevinisky G. A.**, ☒ doctor of chemistry, professor, chief researcher, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** nevinisky@niboch.nsc.ru

## АССОЦИАЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ НА ХИМИЧЕСКИЕ КАНЦЕРОГЕНЫ И СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОЛИМОРФИЗМОМ ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2019 г. Е. Г. Поленок<sup>1</sup>, В. И. Минина<sup>1</sup>, Л. А. Гордеева<sup>1</sup>, С. А. Мун<sup>1\*</sup>,  
А. В. Рыжкова<sup>1</sup>, А. А. Глушков<sup>2</sup>, А. И. Рогозин<sup>1</sup>, В. А. Луценко<sup>3</sup>,  
Н. Е. Вержбицкая<sup>3</sup>, И. А. Вафин<sup>4</sup>

\*E-mail: stellamun@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБНУ Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, Институт экологии человека, Кемерово, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Институт медицины и психологии, Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup>ГБУЗ КО Областной клинический онкологический диспансер, Кемерово, Россия;

<sup>4</sup>ГКУЗ КО Кемеровский областной центр крови, Кемерово, Россия

Поступила: 27.02.2019. Принята: 25.08.2019

Исследовали предполагаемые взаимосвязи антител, специфичных к низкомолекулярным ксе-но- и эндобиотикам, с генетическими полиморфизмами ферментов репарации ДНК у больных раком молочной железы и здоровых женщин в постменопаузе. Материалом для исследования послужили образцы геномной ДНК и сыворотки крови 559 женщин (344 больных раком молочной железы (РМЖ) и 215 условно здоровых). Исследование антител (IgA, IgG) к бензо[а]пирену (Вр), эстрадиолу (Еs) и прогестерону (Рg) выполняли с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа. Исследование генетических полиморфизмов ферментов репарации ДНК (*XPD/ERCC2* (*rs13181*), *ADPRT/PARP1* (*rs1136410*), *hOGG1* (*rs1052133*), *XRCC1* (*rs25489*)) выполняли с помощью аллель-специфической ПЦР. Не было обнаружено существенных различий в частотах вариантов изученных генов ферментов репарации ДНК между сравниваемыми группами. У здоровых женщин не выявили искомым ассоциаций между иммунологическими и генетическими параметрами. Установлено, что высокие уровни IgG АТ к Вр, Es и Рg у больных РМЖ ассоциированы с С аллелем гена *ADPRT/PARP1* ( $p=0,02$ ;  $p=0,003$ ;  $p=0,006$  соответственно). Не выявлены ассоциации исследуемых АТ с другими полиморфными вариантами генов репарации ДНК (*XPD* (*ERCC2*), *hOGG1*, *XRCC1*) у больных РМЖ. Таким образом, подтвердили предположение о том, что иммуноспецифические реакции на Вр, Es и Рg при РМЖ могут быть детерминированы генами ферментов репарации ДНК.

**Ключевые слова:** антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон, полиморфизмы генов ферментов репарации ДНК, рак молочной железы

DOI: 10.31857/S102872210007038-6

Адрес: 650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, 10, ФИЦ УУХ СО РАН ИЭЧ, Мун Стелла Андреевна.  
Тел. 8(3842) 57–50–79.

E-mail: stellamun@yandex.ru

Авторы:

Поленок Е. Г., к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

Минина В. И., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории цитогенетики Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

Гордеева Л. А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

Мун С. А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

Рыжкова А. В., ведущий инженер-технолог лаборатории цитогенетики Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

Глушков А. А., студент Института медицины и психологии, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

**Рогозин А. И.**, аспирант Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

**Луценко В. А.**, главный врач Областного клинического онкологического диспансера, Кемерово, Россия;

**Вержбицкая Н. Е.**, к.м.н., заведующая патолого-анатомическим отделением в Областном клиническом онкологическом диспансере, Кемерово, Россия;

**Вафин И. А.**, главный врач Кемеровского областного центра крови, Кемерово, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Образование ДНК-аддуктов под воздействием канцерогенов окружающей среды и эндогенных стероидов является триггером канцерогенеза молочной железы. ДНК-аддукты с полициклическими ароматическими углеводородами были обнаружены в нормальной и раковой ткани молочной железы [1, 2], в эпителиальных клетках, выделенных из грудного молока женщин [3], в клетках периферической крови [4, 5]. Эстрогеновые аддукты с ДНК были обнаружены в ткани молочной железы и в сыворотке крови у женщин с высоким риском развития рака молочной железы (РМЖ) и у больных РМЖ [6, 7].

Химические канцерогены и стероидные гормоны, конъюгированные с макромолекулами, могут вызывать синтез специфических антител (АТ). АТ против бензо[а]пирена (Вр), эстрадиола (Еs) и прогестерона (Рg) после иммунизации животных этими соединениями, конъюгированными с макромолекулярными носителями, модулировали их концентрацию в крови и в тканях-мишенях, а также их биологические эффекты [8–13].

Ранее предположили, что индивидуальные иммунологические реакции на химические канцерогены и стероидные гормоны могут быть связаны с полиморфизмом ферментов, контролирующих различные механизмы репарации ДНК, так как накопление аддуктов зависит от активности этих ферментов [14].

Считается, что большинство повреждений ДНК удаляется по пути эксцизионной репарации оснований и эксцизионной репарации нуклеотидов (Base excision repair – BER; Nucleotide excision repair – NER). Особую роль в указанных процессах играют гены: *hOGG1* (*rs1052133*), *ADPRT/PARP1* (*rs1136410*), *XRCC1* (*rs25489*), *XPД/ERCC2* (*rs13181*). В ряде исследований выявлялись ассоциации между полиморфными вариантами генов *hOGG1* (*rs1052133*), *ADPRT/PARP1* (*rs1136410*), *XRCC1* (*rs25489*), *XPД/ERCC2* (*rs13181*) и риском РМЖ [15–18]. Между тем ассоциации между иммунными реакциями

на химические канцерогены и стероидные гормоны и активностью ферментов репарации при канцерогенезе оставались не исследованными.

**Цель** настоящего исследования – выявить предполагаемые ассоциации АТ, специфичных к Вр, Еs и Рg с полиморфизмом генов *XPД/ERCC2* (*rs13181*), *ADPRT/PARP1* (*rs1136410*), *hOGG1* (*rs1052133*), *XRCC1* (*rs25489*) у больных РМЖ в постменопаузе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами было обследовано 559 женщин в постменопаузе. Из них – 344 с диагнозом инвазивная карцинома молочной железы, которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РМЖ в каждом случае был подтвержден гистологически. Средний возраст больных РМЖ составил  $63,6 \pm 8,6$  года. В группу сравнения были включены 215 женщин без патологии молочной железы, проживающих на территории Кемеровской области (средний возраст –  $57,9 \pm 6,4$  лет). Забор периферической крови проводился с информированного согласия участников исследования, в соответствии с этическими нормами Хельсинской декларации (2000 г.) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Образцы сыворотки крови обследуемых забирались в аликвоты и хранились при  $-70^\circ\text{C}$ .

Исследование АТ классов А и G к Вр, Еs и Рg проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа в собственной модификации [19]. В качестве антигена на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Вр, Еs и Рg с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Конъюгат Вр-BSA был получен согласно ранее описанной методике [19]. Конъюгат Еs-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, полученным окислением Еs солью Фреми. Конъюгат Рg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодиимидным способом. Связавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgA(G) человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США) в разведении 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМВ, США), на фотометре (Униплан, Россия) при длине волны 450 нм. Уровень АТ к гапте-

нам выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$\text{IgA(G)-X} = (\text{OD}_{\text{X-BSA}} - \text{OD}_{\text{BSA}}) / \text{OD}_{\text{BSA}}$$

где X=Вр, Es, Pg;  $\text{OD}_{\text{X-BSA}}$  – связывание АТ с конъюгатом гаптен-BSA,  $\text{OD}_{\text{BSA}}$  – фоновое связывание АТ с BSA. Величина уровня IgA(G)-X показывала во сколько раз связывание с канцерогеном превышает связывание с белком-носителем.

Типирование полиморфных вариантов генов *XRCC1* (rs25489), *hOGG1* (rs1052133), *ADPRT/PARP1* (rs1136410), *XPD/ERCC2* (rs13181) проводили методом аллель-специфической ПЦР с использованием коммерческих наборов (НПФ «Литех», г. Москва). Характеристика локусов и праймеров, использованных для анализа, приведена в табл. 1. ПЦР проводили на амплификаторах «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли при помощи электрофореза в горизонтальном 3% агарозном геле. После чего гель окрашивали раствором бромистого этидия и анализировали в проходящем ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Gel Doc (Bio-Rad, США).

Распределение частот генотипов у женщин исследуемых групп соответствовало ожидаемым, согласно равновесию Харди-Вайнберга ( $p > 0,05$ ).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0, (StatSoft Inc., USA), онлайн калькуляторов [http://gen-exp.ru/calculator\\_or.php](http://gen-exp.ru/calculator_or.php), <https://www.snpstats.net/start.htm>. Соответствие частот генотипов изучаемых генов равновесию Харди-Вайнберга (HWE) оценивали с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона. Нулевую гипотезу отвергали при  $p < 0,05$ . Ненормальный характер распределения количественных показателей определяли с помощью критерия

Шапиро-Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса (Yates) на непрерывность вариации. За критический уровень значимости принималось значение  $p < 0,05$ . Силу ассоциации АТ и генотипов у здоровых женщин и больных РМЖ оценивали с помощью величины отношения шансов (odds ratio, OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости. В качестве базовой модели исследовали аддитивную модель наследования признака.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Ассоциации полиморфизма генов эксцизионной репарации ДНК *XPD/ERCC2*, *ADPRT/PARP1*, *hOGG1* и *XRCC1* с раком молочной железы

Распределение частот генотипов и аллелей в изученных группах женщин соответствовали данным, полученным ранее у европеоидов (международный проект 1000 Genomes).

Не было выявлено различий между сравниваемыми группами больных и здоровых по частоте встречаемости (%) изученных вариантов генов *XPD/ERCC2*, *ADPRT/PARP1*, *hOGG1* и *XRCC1* (табл. 2).

В ряде работ найдены ассоциации между изученными вариантами генов и риском РМЖ [15–18]. Все белки, кодируемые этими генами, участвуют в восстановлении повреждений ДНК, индуцированных действием химических канцерогенов и половых стероидов, а изученные полиморфные варианты непосредственно связаны с изменением активности кодируемых ими ферментов или эффективности их взаимодействий с другими белками, что приводит к уменьшению репаративной способности клетки [20–23]. Поэтому дальнейшие исследования

**Таблица 1.** Характеристика локусов и праймеров, использованных для анализа методом аллель-специфической ПЦР

Ген	Полиморфный локус/ Ref SNP	Аллели	Праймеры (5'→3')
<i>XPD/ERCC2</i>	2251 T>G rs13181	T, G	F: 5'-tcaaacatcctgtccctact-3' R: 5'-ctgccgattaaaggctgtgga-3'
<i>hOGG1</i>	977 C>G rs1052133	C, G	F: 5'-ggaaggtgcttggggaat-3' R: 5'-actgtcactagtctcaccag-3'
<i>ADPRT/PARP1</i>	2285 T>C rs1136410	T, C	F: 5'-ctgctgcctatacagtcacttt-3' R: 5'-gtggccatcacattctgcagat-3'
<i>XRCC1</i>	839 G>A rs25489	G, A	F: 5'-tggggcctggattgctgggtctg-3' R: 5'-cagcaccactaccacaccctgaagg-3'

**Таблица 2.** Распределение полиморфных вариантов генов ферментов репарации ДНК (*XPD/ERCC2*, *ADPRT/PARP1*, *hOGG1*, *XRCC1*) в исследуемых группах женщин

Гены	Генотипы/ аллели	Больные РМЖ N=344	Здоровые женщины N=215	$\chi^2$ (p-value)
<i>XPD/ERCC2</i> 2251 T>G Lys751Gln (rs13181)	TT	219 (63,6)	115(53,4)	5,75 (0,06)
	TG	99 (28,7)	83 (38,6)	
	GG	26 (7,7)	17 (7,9)	
	T/G	537(78,1)/151(21,9)	313(72,8)/117(27,2)	3,74 (0,05)
<i>ADPRT/ PARP1</i> 2285 T>C Val726Gln (rs1136410)	TT	252 (73,2)	142 (66,0)	4,11 (0,13)
	TC	79 (22,9)	67 (31,1)	
	CC	13 (3,9)	6 (2,8)	
	T/C	583(84,7)/105(15,3)	351(81,6)/79(18,4)	1,64 (0,19)
<i>hOGG1</i> 977 C>G Ser326Cys (rs1052133)	CC	205 (59,5)	142 (66,0)	2,17 (0,34)
	CG	124 (36,1)	64 (29,8)	
	GG	15 (4,4)	9 (4,2)	
	C/G	534(77,6)/154(22,4)	348(80,9)/82(19,1)	1,55 (0,21)
<i>XRCC1</i> 839 G>A Arg280His (rs25489)	GG	305 (88,6)	186(86,5)	2,0 (0,37)
	GA	36 (10,4)	23 (10,7)	
	AA	3 (1,0)	6 (2,8)	
	G/A	646(93,9)/42(6,1)	395(91,9)/35(8,1)	1,41 (0,24)

\*Yates chi-square

взаимодействия всей генной сети могут помочь выявить предполагаемые ассоциации.

*Ассоциации антител против бензо[а]пирена, эстрадиола и прогестерона с полиморфизмом генов ферментов репарации ДНК (XPD/ERCC2, ADPRT/PARP1, hOGG1 и XRCC1) у здоровых женщин и больных раком молочной железы*

Не было выявлено каких-либо ассоциаций между изученными АТ и полиморфными вариантами генов ферментов репарации ДНК *XPD/ERCC2*, *ADPRT/PARP1*, *hOGG1* и *XRCC1* у здоровых женщин (данные не приведены).

У больных РМЖ выявлена взаимосвязь уровнем IgG-Вр, IgG-Ес, IgG-Рг с генетическим полиморфизмом *ADPRT/PARP1* (rs1136410). Данные представлены в табл. 3.

Распределение высоких и низких уровней IgG-Вр, IgG-Ес и IgG-Рг (меньше или больше медианы, Ме) статистически значимо зависело от генотипа *ADPRT/PARP1*: соответственно  $p=0,009$ ;  $p=0,005$ ;  $p=0,02$ .

У больных РМЖ носителей С аллеля гена *ADPRT/PARP1* чаще встречались высокие уровни IgG-Вр (18,0% против 12,0%,  $p=0,02$ ), IgG-Ес

(19,0% против 11,0%,  $p=0,003$ ) и IgG-Рг (15,0% против 11,0%,  $p=0,006$ ).

Ген *ADPRT* (adenosine diphosphate ribosyl transferase) кодирует ассоциированный с хроматином фермент поли-АДФ-рибозил-полимеразу (*PARP1*), которая модифицирует различные ядерные белки и участвует в репарации ДНК и ремоделировании хроматина за счет поли-АДФ-рибозилирования гистонов. В присутствии поврежденной ДНК *PARP1* превращает остатки НАД в поли-АДФ-рибозу и вызывает сшивку белков хроматина через поли-АДФ-рибозильные мостики. Подавление активности *PARP-1* специфичными ингибиторами (например, олапариб, велипариб, инипариб и др.) ведет к накоплению повреждений ДНК и апоптозу клеток, что активно используется при лечении опухолей. Несинонимичный полиморфизм 2285 Т >С (rs1136410), приводящий к аминокислотной замене Val762Ala, ассоциирован с уменьшением его способности связывания с *XRCC1* и другим протеинами, со сниженной функциональной активностью фермента [24]. Очевидно, нарушение репарации ДНК в этом случае может приводить к избыточному накоплению аддуктов ДНК с ме-



**Таблица 3.** Количество случаев (n) и частота встречаемости (%) высоких (>Me) и низких (≤Me) уровней IgG антител против бензо[а]пирена, эстрадиола и прогестерона (IgG-Bp, IgG-Es, IgG-Pg) у больных раком молочной железы в зависимости от полиморфных вариантов гена *ADPRT/PARP1* (*rs1136410*)

Ген	Генотипы/ аллели	Антитела		$\chi^2$ (p), OR (95%CI)	
		IgG-Bp≤6,5 n (%)	IgG-Bp>6,5 n (%)		
<i>ADPRT/ PARP1</i> 2285 T>C Val726Gln ( <i>rs1136410</i> )	ТТ	135(76,7)	117 (69,6)	9,4 (0,009)	
	ТС	40 (22,7)	40 (23,8)		
	СС	1 (0,6)	11 (6,5)		
	Т/С	310 (88,0)/42 (12,0)	274 (82,0)/62 (18,0)		
					5,2 (0,02) 1,6 (1,1–2,4)
			IgG-Es≤6,0 n (%)	IgG-Es>6,0 n (%)	10,5 (0,005)
	ТТ	135 (78,5)	117 (68,0)		
	ТС	36 (20,6)	44 (25,6)		
	СС	1 (0,6)	11 (6,4)		
	Т/С	306 (89,0)/38 (11,0)	278 (81,0)/66 (19,0)		8,9 (0,003) 1,8 (1,2–2,8)
			IgG-Pg≤3,8 n (%)	IgG-Pg>3,8 n (%)	8,2 (0,02)
	ТТ	136 (78,6)	116 (67,8)		
ТС	35 (20,2)	45 (26,3)			
СС	2 (1,2)	10 (5,8)			
Т/С	307 (89,0)/39 (11,0)	277 (81,0)/65 (15,0)		7,3 (0,006) 1,8 (1,2–2,7)	

таболитами Вр и стероидных гормонов и повышению вероятности образования специфических АТ к соответствующим гаптенам.

Ассоциации исследуемых АТ с другими полиморфными вариантами генов репарации ДНК (*XPD/ERCC2*, *hOGG1*, *XRCC1*) у больных РМЖ не выявлены, не исключено, что это связано с недостаточным количеством наблюдений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что высокие уровни IgG АТ к Вр, Es и Pg у больных РМЖ ассоциированы с С аллелем гена *ADPRT/PARP1* (*rs1136410*). Таким образом, получено первое подтверждение предположения о том, что специфические иммунные реакции на химические канцерогены и стероидные гормоны могут быть детерминированы генами ферментов репарации ДНК у больных РМЖ.

Представляется перспективным продолжение исследований искомых взаимосвязей на более представительных выборках здоровых женщин и больных РМЖ.

Работа выполнена в рамках проекта VI.59.1.1. Программы фундаментальных научных исследований СО РАН (гос.задание № 0352-2018-0018).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Rundle A., Tang D., Hibshoosh H., Estabrook A., Schnabel F., Cao W., Grumet S., Perera F.P. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis* 2000, 21(7), 1281–1289. doi: 10.1093/carcin/21.5.281
2. Santella R. M., Gammon M. D., Zhang Y. J., Motykie-wicz G., Young T. L., Hayes S. C., Terry M. B., Schoenberg J. B., Brinton L. A., Bose S., Teitelbaum S. L., Hibshoosh H. Immunohistochemical analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in breast tumor tissue. *Cancer Lett.* 2000, 154(2), 143–149. doi:10.1016/S0304-3835(00)00367-0
3. Ambrosone C. B., Abrams S. M., Gorlewska-Roberts K., Kadlubar F. F. Hair dye use, meat intake, and tobacco exposure and presence of carcinogen-DNA adducts in exfoliated breast ductal epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, 464(2), 169–175. doi: 10.1016/j.abb.2007.05.018
4. Gammon M. D., Sagiv S. K., Eng S. M., Shantakuma rS., Gaudet M. M., Teitelbaum S. L., Britto nJ. A., Terry M. B., Wang L. W., Wang Q., Stellman S. D., Beyea J., Hatch M., Kabat G. C., Wolff M. S., Levin B., Neugut A. I., Santella R. M. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and breast cancer: a pooled analysis. *Arch. Environ. Health.* 2004, 59(12), 640–649. doi: 10.1080/00039890409602948

5. Sagiv S. K., Gaudet M. M., Eng S. M., Abrahamson P. E., Shantakumar S., Teitelbaum S. L., Bell P., Thomas J. A., Neugut A. I., Santella R. M., Gammon M. D. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and survival among women with breast cancer. *Environ. Res.* 2009, 109(3), 287–291. doi: 10.1016/j.envres.2008.11.005
6. Rogan E. G., Badawi A. F., Devanesan P. D., Meza J. L., Edney J. A., West W. W., Higginbotham S. M., Cavalieri E. L. Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer. *Carcinogenesis* 2003, 24(4), 697–702. doi: 10.1093/carcin/bgg004
7. Pruthi S., Yang L., Sandhu N. P., Ingle J. N., Beseler C. L., Suman V. J., Cavalieri E. L., Rogan E. G. Evaluation of serum estrogen-DNA adducts as potential biomarkers for breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2012, 132(1–2), 73–79. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.02.002
8. Grova N., Prodhomme E. J., Schellenberger M. T., Farinelle S., Muller C. P. Modulation of carcinogen bioavailability by immunisation with benzo[a]pyrene – conjugate vaccines. *Vaccine* 2009, 27(31), 4142–4151. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.052
9. Černohorská H., Klimešová S., Lepša L., Jinoch P., Milcová A., Schmuczerová J., Topinka J., Lábaj J. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mut. Res.* 2012, 742(1–2), 2–10. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.016
10. Sundaram K., Tsong Y. Y., Hood W., Brinson A. Effect of immunization with estrone-protein conjugate in rhesus monkeys. *Endocrinology* 1973, 93(4), 843–847. doi: 10.1210/endo-93-4-843
11. Schwartz U., Dyrenfurth I., Khalaf S., Vande Wiele R. L., Ferin M. A comparison of the effects of active immunization of female rhesus monkeys to estradiol-17 or progesterone-20-protein conjugates. *J. Steroid Biochem.* 1975, 6(3–4), 541–545. doi: 10.1016/0022-4731(75)90185-5
12. Hillier S. G., Groom G. V., Boyns A. R., Cameron E. H. Effects of active immunisation against steroids upon circulating hormone concentrations. *J. Steroid Biochem.* 1975, 6(3–4), 529–535. doi: 10.1016/0022-4731(75)90183-1
13. Caldwell B. V., Tillson S. A., Esber H., Thorneycroft I. H. Survival of tumors after immunization against oestrogens. *Nature* 1971, 231(5298), 118–119. doi: 10.1038/231118a0
14. Глушков А. Н. Клиническая иммунохимия канцерогенеза: новые задачи и перспективы. *Российский иммунологический журнал* 2013, 7(16), 1, 27–34. [Glushkov A. N. The immunochemistry on carcinogenesis: the new tasks and perspectives. *Rus. J. Immunol.* 2013, 7(16), 1, 27–34]
15. Alanazi M., Pathan A. A. K., Arifeen Z., Shaik J. P., Alabdulkarim H. A., Semlali A., Bazzi M. D., Parine N. R. Association between PARP-1 V762A polymorphism and breast cancersusceptibility in Saudi population. *PLoS One* 2014, 9(3), e92360. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3877358>
16. Smolarz B., Bryś M., Forma E., Zadrożny M., Bienkiewicz J., Romanowicz H. *Pathol. Oncol. Res.* 2017. doi: 10.1007/s12253-017-0370-8
17. Moghaddam A. S., Nazarzadeh M., Bidel Z., Karamatinia A., Darvish H., Jarrahi A. M. hOGG1 gene polymorphism and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis study. *Breast J.* 2018, 24(1), 70–73. doi: 10.1111/tbj.12842
18. Loizidou M. A., Michael T., Neuhausen S. L., Newbold R. F., Marcou Y., Kakouri E., Daniel M., Papadopoulos P., Malas S., Kyriacou K., Hadjisavvas A. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008, 112(3), 575–579. doi: 10.1007/s10549-007-9881-4
19. Глушков А. Н., Поленок Е. Г., Аносова Т. П., Савченко Я. А., Баканова М. Л., Минина В. И., Мун С. А., Ларин С. А., Костяно М. В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия. *Российский иммунологический журнал* 2011, 5(14), 1, 39–44. [Glushkov A. N., Polenok E. G., Anosova T. P., Savchenko Ya. A., Bakanova M. L., Minina V. I., Mun S. A., Larin S. A., Kost'anko M. V. Serum antibodies to benzo[a]pyrene and chromosomal aberrations in lymphocytes peripheral blood at the workers of coal processing enterprise. *Rus. J. Immunol.* 2011, 5(14), 1, 39–44].
20. Benhamou S., Sarasin A. ERCC2/XPD polymorphisms and lung cancer. *Am. J. Epidemiol.* 2005, 161, 1–14. <http://paperity.org/p/58048097/ercc2-xpd-gene-polymorphisms-and-lung-cancer-a-huge-review>
21. Wang X. G., Wang Z. Q., Tong W. M., Shen Y. PARP1 Val762Ala polymorphism reduces enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 354, 122–126. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.162
22. Simonelli V., Camerini S., Mazzei F., Van Loon B., Alione A., Errico M. D., Barone F., Minoprio A., Ricceri F., Guarrera S., Russo A., Dalhus B., Crescenzi M., Hubscher U., Bjoras M., Matullo G., Dogliotti E. Genotype-phenotype analysis of S326C OGG1 polymorphism: a risk factor for oxidative pathologies. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, 63, 401–409. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.031
23. Thompson L. H., West M. G. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat. Res.* 2000, 459, 1–18. doi: 10.1016/S0921-8777(99)00058-0
24. Lockett K. L., Hall M. C., Xu J., Zheng S. L., Berwick M., Chuang S. C., Clark P. E., Cramer S. D., Lohman K., Hu J. J. The ADPRT V762A genetic variant contributes to prostate cancer susceptibility and deficient enzyme function. *Cancer Res.* 2004, 64(17):6344–6348. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0338

**ASSOCIATIONS OF THE SPECIFIC IMMUNE REACTIONS  
ON THE CHEMICAL CARCINOGENS AND STEROID HORMONES  
WITH THE GENE POLYMORPHISMS OF DNA-REPAIR ENZYMES  
IN BREAST CANCER PATIENTS**

© 2019 E. G. Polenok<sup>1</sup>, V. I. Minina<sup>1</sup>, L. A. Gordeeva<sup>1</sup>, S. A. Mun<sup>1\*</sup>,  
A. V. Ryzhkova<sup>1</sup>, A. A. Glushkov<sup>2</sup>, A. I. Rogozin<sup>1</sup>, V. A. Lutsenko<sup>3</sup>,  
N. E. Verzhbitskaya<sup>3</sup>, I. A. Vafin<sup>4</sup>

\*E-mail: stllamun@yandex.ru

<sup>1</sup>Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Institute of Human Ecology,  
Kemerovo, Russia;

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup>Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russia;

<sup>4</sup>Regional Center of Blood, Kemerovo, Russia

**Received:** 27.02.2019. **Accepted:** 25.08.2019

The supposed interrelations of antibodies specific to low-weight xeno- and endobiotics with DNA-repair genes polymorphisms were studied in postmenopausal healthy women (HW) and breast cancer patients (BCP). Enzyme-linked immunoassay was used for IgA and IgG to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone detection in 215 HW and 344 BCP. Gene polymorphisms of *XPD/ERCC2 (rs13181)*, *ADPRT/PARP1 (rs1136410)*, *HOGG1 (rs1052133)*, *XRCC1 (rs25489)* were analyzed by allele-specific PCR. No associations of studied gene polymorphisms with breast cancer were revealed, as well as interrelations between immunological and genetic parameters in HW. It was detected that levels of IgG specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone were associated with the C allele of *ADPRT/PARP1* ( $p=0.02$ ;  $p=0.003$ ;  $p=0.006$  accordingly). Therefore, it was confirmed that genes of DNA-repair enzymes could determine formation of antibodies specific to the chemical carcinogens and endogenous steroids.

*Key words:* antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, progesterone, gene polymorphisms, DNA-repair enzymes, breast cancer

**Authors:**

**Polenok E. G.**, PhD (Candidate of Pharmacy), Leading Researcher of Immunochemistry Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

**Minina V. I.**, MD, Leading Researcher of Cytogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

**Gordeeva L. A.**, PhD (Candidate of Biology), Leading Researcher of Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

**Mun S. A.**, ✉ PhD (Candidate of Medicine), Senior Researcher Fellow of Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia. **E-mail:** stllamun@yandex.ru;

**Ryzhkova A. V.**, Leading Engineer-technologist of Cytogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

**Glushkov A. A.**, Student of the Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

**Rogozin A. I.**, Postgraduate of Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

**Lutsenko V. A.**, Main Physician of Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russia;

**Verzhbitskaya N. E.**, PhD (Candidate of Medicine), Chief of Path-anatomy Department, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russia;

**Vafin I. A.**, Main Physician of Regional Center of Blood, Kemerovo, Russia.

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИНТЕРФЕРОНОВОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ ПОЧКИ В ДИНАМИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© 2019 г. Л. М. Куртасова<sup>1\*</sup>, Р. А. Зуков<sup>1</sup>, А. А. Савченко<sup>2</sup>,  
Н. А. Шакина<sup>3</sup>

\*E-mail: kurtasova.lm@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия;

<sup>3</sup>КГАУЗ Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД, Красноярск, Россия

Поступила: 19.07.2019. Принята: 25.08.2019

Целью исследования явилось изучение показателей сывороточного  $\alpha$ - (IFN- $\alpha$ ) и  $\gamma$ -интерферона (IFN- $\gamma$ ), уровней спонтанной и стимулированной продукции интерферонов мононуклеарами периферической крови у больных местно-распространенным почечно-клеточным раком в период до операции и через 14 дней после хирургического лечения. Обследованы больные местно-распространенным почечно-клеточным раком (T<sub>3</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub>) до хирургического лечения и через 14 дней после радикальной нефрэктомии. Концентрацию IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Уровень спонтанной и стимулированной (конканавалин А) продукции IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  определяли в супернатантах мононуклеаров периферической крови, культивированных в течение 72 часов, методом ИФА. Установлено, что у больных местно-распространенным ПКР как до операции, так и после хирургического лечения наблюдается повышение содержания IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в сыворотке крови, а также увеличена спонтанная продукция IFN- $\gamma$  мононуклеарами периферической крови. В динамике, через 14 дней после операции отмечается снижение спонтанной продукции IFN- $\alpha$  в сочетании с повышенной способностью мононуклеаров периферической крови к индуцированной выработке IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . Выявленный дисбаланс в IFN-продуцирующей системе у больных ПКР в послеоперационном периоде необходимо учитывать при разработке иммунореабилитационных программ у данной категории больных.

**Ключевые слова:** рак, почка, интерферон, мононуклеары, периферическая кровь

DOI: 10.31857/S102872210007039-7

Адрес: 660022 г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1. Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, Куртасова Людмила Михайловна. Тел.: 8(391)222-46-26, факс: 8(391)221-16-38.

E-mail: kurtasova.lm@mail.ru

**Авторы:**

**Куртасова Л. М.**, д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия;

**Зуков Р. А.**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой онкологии и лучевой терапии с курсом ПО, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия;

**Савченко А. А.**, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии, ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия;

**Шакина Н. А.**, к.м.н., врач лабораторной диагностики отделения иммунологических и гематологических исследований, КГАУЗ Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД, Красноярск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время установлено, что защита организма от злокачественных опухолей выполняется иммунной системой, которая осу-

ществляет иммунологический надзор за возникновением злокачественно трансформированных клеток и иммунный ответ на образовавшуюся опухоль. В противоопухолевом иммунитете основную роль играют клеточные механизмы, связанные с действием специфических цитотоксических лимфоцитов, Т-эффекторов и клеток системы мононуклеарных фагоцитов, а его результативность зависит от взаимодействия этих клеток между собой. В этом взаимодействии решающую роль играют молекулы адгезии, клеточные рецепторы и цитокины [1, 2, 3].

Интерфероны (IFN) являются цитокинами с широким спектром действия. Противоопухолевое действие IFN опосредуется несколькими механизмами: антипролиферативным эффектом, регуляцией клеточной дифференцировки, ингибированием онкогенов и ангиогенеза, а также иммуномодулирующей активностью [4, 5].

В связи с вышеизложенным, целью данного исследования явилось изучение показателей сыровоточного  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферона, уровней спонтанной и стимулированной продукции IFN мононуклеарами периферической крови у больных местно-распространенным почечно-клеточным раком в период до операции и через 14 дней после хирургического лечения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено открытое клиническое проспективное исследование на базе урологического отделения Красноярского краевого клинического онкологического диспансера. Обследованы больные местно-распространенным почечно-клеточным раком ( $T_3N_0M_0$ ) до хирургического лечения ( $n=52$ ) и через 14 дней после радикальной нефрэктомии ( $n=45$ ) в возрасте 40–55 лет. Диагноз почечно-клеточного рака у всех наблюдаемых больных верифицирован гистологически. Контрольную группу составили 30 здоровых доноров крови.

Концентрацию IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) на тест-системах ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, Россия). В супернатантах мононуклеаров периферической крови, культивированных в течение 72 часов, оценивали уровень спонтанной и стимулированной продукции IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  методом ИФА с помощью тест-систем ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, Россия). Для стимуляции клеток использовали конканавалин А (Con A) 15 мкг/мл («Sigma», США).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ SPSS10,0 и Statistica 6.0. Определяли среднее арифметическое значение (M), ошибку средней арифметической (m). Проверку гипотезы о статической значимости выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни, а также использовали непараметрический критерий Вилкоксона для анализа выборок с попарно связанными вариантами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что количество IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в сыворотке крови как в период до, так и в период через 14 дней после хирургического лечения в группе больных местно-распространенным почечно-клеточным раком значительно превышает соответствующие значения в контрольной группе ( $13,44 \pm 0,42$  – до операции, в контроле –  $5,16 \pm 0,24$ ,  $p < 0,05$ ;  $14,18 \pm 0,37$  – после операции; в контроле  $5,16 \pm 0,24$ ,  $p < 0,05$ ;  $96,34 \pm 4,02$ ; – до операции; в контроле –  $10,58 \pm 0,21$ ,  $p < 0,001$ ;  $103,07 \pm 0,35$  – после операции; в контроле  $10,58 \pm 0,21$ ,  $p < 0,001$ , соответственно). Исследование способности мононуклеаров периферической крови к выработке IFN- $\gamma$  в группе больных ПКР выявило в период до оперативного вмешательства увеличение в 5,75 ( $p < 0,001$ ) раза спонтанной продукции IFN- $\gamma$  относительно контрольных параметров. При этом показатели ConA-индуцированной продукции IFN- $\gamma$  в данный период наблюдения у больных ПКР не имели статистически значимых различий с величинами контроля (рис. 1).

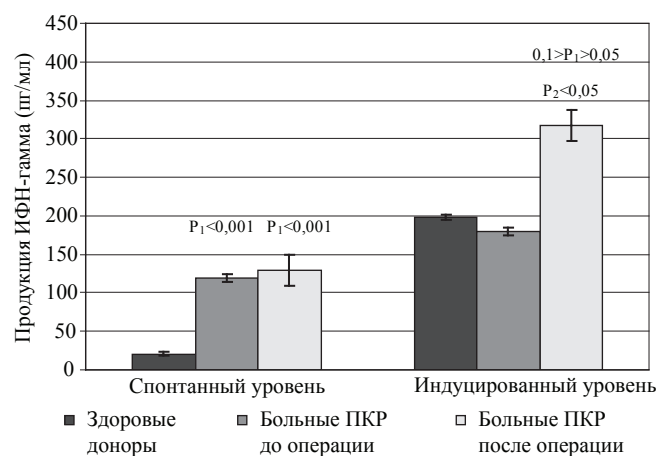
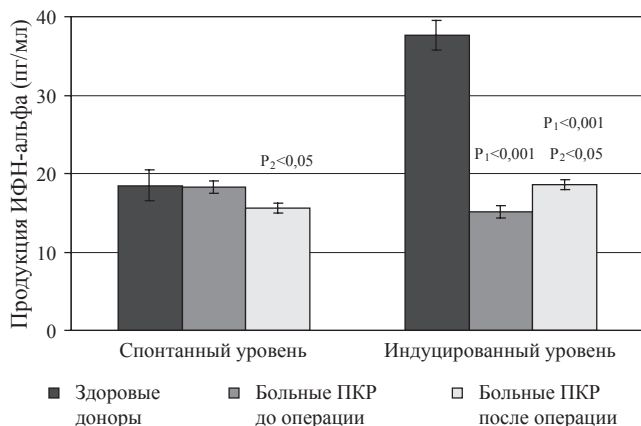


Рис. 1. Уровень синтеза IFN- $\gamma$  мононуклеарами периферической крови у больных ПКР.

Примечание:  $p_1$  статистически значимые различия с показателями здоровых доноров;  $p_2$  статистически значимые различия с показателями пациентов до хирургического лечения.



**Рис. 2.** Уровень синтеза IFN- $\alpha$  мононуклеарами периферической крови у больных ПКР.

**Примечание:**  $p_1$  статистически значимые различия с показателями здоровых доноров;  $p_2$  статистически значимые различия с показателями пациентов до хирургического лечения.

Результаты проведенного анализа установили, что спонтанная продукция IFN- $\alpha$  мононуклеарами периферической крови в группе больных ПКР в период до операции соответствует показателям контрольной группы (рис. 1). В то время, как уровень ConA-индуцированной выработки IFN- $\alpha$  мононуклеарами периферической крови составляет лишь 41,2% от контрольных величин (рис. 2).

Следовательно, можно констатировать, что у больных местно-распространенным почечно-клеточным раком в период до хирургического лечения наблюдается дисбаланс IFN-продуцирующей системы.

Изучение способности мононуклеаров периферической крови к продукции IFN- $\alpha$  в группе больных ПКР через 14 дней после оперативного вмешательства выявило статистически значимое снижение уровня спонтанной выработки данного цитокина и увеличение митоген-стимулированной по сравнению с исходными показателями (до лечения) (рис. 2). Следует отметить, что уровень ConA-индуцированной продукции IFN- $\alpha$  мононуклеарами периферической крови у больных ПКР в период после операции остается статистически значимо сниженным относительно контрольных величин (рис. 2).

При исследовании способности мононуклеаров периферической крови к продукции IFN- $\gamma$  в группе больных ПКР в период через 14 дней после хирургического лечения было обнаружено превышение в 6,23 раза ( $p < 0,001$ ) уровня спонтанной выработки данного цитокина по сравнению с контрольной группой. Кроме

того, оказалось, что мононуклеары периферической крови у больных ПКР в данный период наблюдения более активно продуцируют IFN- $\gamma$  при индукции ConA, чем клетки в период до хирургического лечения. Также наблюдается выраженная тенденция к увеличению уровня митоген-стимулированной продукции IFN- $\gamma$  мононуклеарами периферической крови относительно соответствующих показателей группы контроля (рис. 1).

Стимуляция продукции IFN- $\gamma$ , выявленная у больных ПКР, вероятно, отражает развитие Th1 типа иммунного ответа и способствует активации цитотоксических механизмов, направленных на элиминацию опухолевых клеток.

Таким образом, у больных ПКР в период через 14 дней после оперативного вмешательства отмечается положительная динамика изменений параметров интерфероновой системы, однако, полного восстановления IFN-продуцирующей системы не происходит. Так, сохраняется повышенный уровень спонтанной продукции IFN- $\gamma$  мононуклеарами периферической крови на фоне пониженной способности клеток к выработке IFN- $\alpha$ . Несмотря на увеличение уровня митоген-индуцированной продукции IFN- $\alpha$  относительно исходных показателей (до лечения) концентрация данного цитокина не достигает контрольного уровня. Между тем известно, что нарушение реализации действия интерферонов приводит к невозможности проявления их многочисленных эффектов и нарушению межклеточных взаимодействий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного исследования было установлено, что у больных местно-распространенным ПКР как до операции, так и после хирургического лечения наблюдается повышение содержания IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в сыворотке крови, а также увеличена спонтанная продукция IFN- $\gamma$  мононуклеарами периферической крови. В динамике через 14 дней после операции отмечается снижение спонтанной продукции IFN- $\alpha$  в сочетании с повышенной способностью мононуклеаров периферической крови к индуцированной выработке IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . Выявленный дисбаланс в IFN-продуцирующей системе у больных ПКР в послеоперационном периоде, вероятно, необходимо учитывать при разработке иммунореабилитационных программ у данной категории больных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Шубина И. Ж., Сергеев А. В., Мамедова Л. Т., Соколов Н. Ю., Кисельский М. В. Современные представления о противоопухолевом иммунитете. Российский биотерапевтический журнал 2015, 14(3), 19–28. [Shubina I. Z., Sergeev A. V., Mamedova L. T., Sokolov N. Y., Kiselevsky M. V. Current understanding of antitumor immunity. Russian Journal of Biotherapy. 2015, 14(3), 19–28.]
2. Свитич О. А., Филина А. Б., Давыдова Н. В., Ганковская Л. В., Зверев В. В. Роль факторов врожденного иммунитета в процессе опухолеобразования. Медицинская иммунология 2018, 20(2), 151–162. [Svitich O. A., Filina A. B., Davydova N. V., Gankovskaya L. V., Zverev V. V. The role of innate immunity factors in tumorigenesis process. Medical Immunology (Russia). 2018, 20(2), 151–162.]
3. Топтыгина А. П. Коингибирующие молекулы в норме и при патологии. Контрольные точки (checkpoint) иммунорегуляции. Часть 2. Участие коингибирующих молекул в развитии инфекционной и онкологической патологии. Моноклональные антитела – блокаторы контрольных точек. Российский иммунологический журнал 2018, 12(1), 3–16. [Toptygina A. P. Co-inhibiting molecules in health and disease. Checkpoints of the immunoregulation. Part 2. Participation of co-inhibiting molecules in the development of infectious and oncological pathology. Monoclonal antibodies – checkpoint blockers. Russian Journal of Immunology 2018, 12(1), 3–16.]
4. Наровлянский А. Н., Ершов Ф. И., Гинцбург А. П. Интерфероны: перспективные направления исследований. Иммунология 2013, 3, 168–172. [Narovlyansky A. N., Ershov F. I., Gunzburg A. P. Interferons: promising areas of research. Immunology 2013, 3, 168–172.]
5. Верлан Н. В. Использование интерферонов: иммунологические и клинические аспекты. Цитокины и воспаление 2016, 15(1), 12–21. [Verlan N. V. Use of interferons: immunological and clinical aspects. Cytokines and inflammation 2016, 15 (1), 12–21.]

## CHANGES IN THE INTERFERONAL STATUS INDICATORS IN PATIENTS OF THE LOCAL-DISTRIBUTED KIDNEY CANCER IN THE DYNAMICS OF THE DISEASE

© 2019 L. M. Kurtasova<sup>1\*</sup>, R. A. Zukov<sup>1</sup>, A. A. Savchenko<sup>2</sup>, N. A. Shakina<sup>3</sup>

\*E-mail: kurtasova.lm@mail.ru

<sup>1</sup>Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>2</sup>Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>3</sup>Krasnoyarsk Regional Center of AIDS prevention, Krasnoyarsk, Russia

Received: 19.07.2019. Accepted: 25.08.2019

The aim of the research was to study the indicators of serum  $\alpha$ - (IFN- $\alpha$ ) and  $\gamma$ -interferon (IFN- $\gamma$ ), the levels of spontaneous and stimulated production of interferons by peripheral blood mononuclear cells in patients with locally advanced renal cell carcinoma (RCC) before and 14 days after the operation. Patients with RCC (T<sub>3</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub>) were examined before surgical treatment and 14 days after radical nephrectomy. The concentration of IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in serum was determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The level of spontaneous and stimulated (concanavalin A) production of IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  was determined in the supernatants of peripheral blood mononuclear cells cultured for 72 hours by ELISA. It was found that in patients with locally advanced RCC, both before surgery and after surgical treatment, an increase in serum levels of IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  was observed, and the spontaneous production of IFN- $\gamma$  by peripheral blood mononuclear cells was also increased. 14 days after surgery there was a decrease in the spontaneous production of IFN- $\alpha$  in combination with an increased ability of peripheral blood mononuclear cells to induce the production of IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . The identified imbalance in the IFN-producing system in patients with RCC in the postoperative period must be considered when developing immunorehabilitation programs in this category of patients.

*Key words:* cancer, kidney, interferon, mononuclear cells, peripheral blood

**Authors:**

**Kurtasova L. M.**, ✉ PhD, MD, professor, professor of the department of clinical Immunology, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia. **E-mail:** kurtasova.lm@mail.ru;

**Zukov R. A.**, PhD, MD, professor, head of the department of oncology and radiation therapy with PE course, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia;

**Savchenko A. A.**, PhD, MD, professor, head of the laboratory of cell molecular physiology and pathology, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

**Shakina N. A.**, PhD, doctor of laboratory diagnostics of the department of immunological and hematological research, Krasnoyarsk Regional Center of AIDS prevention, Krasnoyarsk, Russia.



## НАРУШЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОК С ЭНДОМЕТРИОЗОМ И БЕСПЛОДИЕМ

© 2019 г. Ю. С. Анциферова\*, А. И. Малышкина, Л. Х. Абдуллаева

\*E-mail: niimid.immune@mail.ru

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства имени В. Н. Городкова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново, Россия

Поступила: 19.09.2018. Принята: 25.08.2019

Предполагают, что развитие эндометриоза связано с аутоиммунными нарушениями, однако характер функционирования В-лимфоцитов при данном гинекологическом заболевании остается все еще практически не изученным. Целью работы было установить особенности дифференцировки периферических и перитонеальных В-лимфоцитов у пациенток с эндометриозом и бесплодием. Было проведено обследование 59 женщин, поступивших в гинекологическую клинику на оперативное лечение по поводу бесплодия. У 35 женщин был диагностирован эндометриоз I–II стадии, у 24 женщин – III–IV стадии. Контрольную группу составили женщины, поступившие на хирургическую стерилизацию (n=31). Материалом для исследования служили периферическая кровь и перитонеальная жидкость. Фенотип периферических и перитонеальных В-лимфоцитов оценивали методом трехцветной проточной цитофлюориметрии. Было выявлено, что при эндометриозе на системном и локальном уровне повышено содержание плазматических клеток, непереключенных CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> наивных В-лимфоцитов и снижен уровень переключенных CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> В-клеток памяти. В перитонеальной жидкости женщин с эндометриозом было снижено также содержание непереключенных CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> В-клеток памяти. У здоровых женщин популяцию перитонеальных В-лимфоцитов отличало от периферических В-лимфоцитов более высокое содержание непереключенных В-клеток памяти и более низкий уровень наивных В-лимфоцитов. У женщин с эндометриозом на локальном уровне содержание непереключенных наивных В-лимфоцитов и переключенных В-клеток памяти было ниже, а уровень CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> и CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> В-клеток памяти – выше, чем в крови. Вероятно, отмечаемое при эндометриозе усиление продукции аутоантител может быть связано с повышением уровня периферических и перитонеальных наивных В-лимфоцитов и снижением содержания в перитонеальной жидкости непереключенных В-клеток памяти, участвующих в регуляции продукции аутоантител.

**Ключевые слова:** эндометриоз, наивные В-лимфоциты, В-клетки памяти, кровь, перитонеальная жидкость

DOI: 10.31857/S102872210007040-9

Адрес: 153045, г. Иваново, ул. Победы, д. 20, ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства имени В. Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория клинической иммунологии, Анциферова Юлия Станиславовна.

Тел. (4932) 33-62-63; факс: (4932) 33-62-56.

E-mail: niimid.immune@mail.ru

**Авторы:**

**Анциферова Ю. С.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства имени В. Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново, Россия;

**Малышкина А. И.**, д.м.н., профессор, директор, ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства имени В. Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново, Россия;

**Абдуллаева Л. Х.**, м.н.с. отдела акушерства и гинекологии, ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства имени В. Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново, Россия

### ВВЕДЕНИЕ

Эндометриоз, характеризующийся ростом эктопически перемещенного эндометрия в перитонеальной полости, диагностируется у 6–10% всех женщин репродуктивного возраста и относится к самым распространенным гинекологическим заболеваниям [1]. Наиболее частым клиническим проявлением эндометриоза является бесплодие, плохо поддающееся лечению. Доказано, что им-

мунные нарушения играют важную роль в патогенезе этого заболевания [2, 3]. Рядом исследователей было показано, что при эндометриозе усилена продукция аутоантител различной специфичности, таких как анти-эндометриальные, антифосфолипидные, антикардиолипиновые, антиспермальные антитела и др. [4]. На основании этих результатов еще в конце прошлого века была выдвинута гипотеза об аутоиммунной природе эндометриоза [5]. Однако до сих пор эта гипотеза базируется только на данных о наличии аутоантител в крови и перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом. Изучения механизмов функционирования В-лимфоцитов при эндометриозе практически не проводилось.

В литературе имеются лишь отдельные работы, в которых сообщается как об увеличении содержания В-клеток в периферической крови и в перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом [6], так и о снижении уровня периферических В-клеток и CD20<sup>+</sup> лимфоцитов, коэкспрессирующих HLA-DR и CD44 молекулы при эндометриозе [7]. Немногочисленные работы посвящены изучению особенностей регуляции активности В-лимфоцитов у женщин с эндометриозом. Так, было показано, что при эндометриозе усилена продукция в перитонеальной полости Vlimp-1, или В-лимфоцитарного индуктора программы созревания, который регулирует дифференцировку плазматических клеток [8]. В эндометриоидных очагах был выявлен высокий уровень такого цитокина, активирующего В-клетки, как VlyS (В-лимфоцитарный стимулятор) [9]. Этот цитокин вырабатывается макрофагами и играет важную роль в нормальном развитии В-лимфоцитов и их дифференцировки в плазматические клетки, а усиленная его продукция отмечается при аутоиммунных заболеваниях. При изучении полиморфизма гена VlyS было установлено, что развитие глубокого инфильтративного эндометриоза ассоциировано с гетерозиготностью гена VlyS [10]. Однако в другом исследовании был проведен анализ того же полиморфизма в специфической группе infertильных женщин с эндометриозом, но различий выявлено не было [11]. Таким образом, проведенные исследования не позволяют сделать однозначного вывода о функциональном состоянии В-лимфоцитов при эндометриозе.

Известно, что развитие гуморальных иммунных реакций непосредственно связано с особенностями дифференцировки В-лимфоцитов и накоплением пулов антитело-продуцирую-

щих плазматических клеток и В-клеток памяти, способных более быстро и эффективно, чем наивные В-клетки, реагировать на стимул [12]. Установлено, что клетки памяти отличаются от наивных В-лимфоцитов отсутствием экспрессии АТФ-связывающего кассетного транспортера (ABCВ1), однако в последнее время при разделении В-лимфоцитов на наивные клетки и клетки памяти широко используют в качестве маркеров CD27 и IgD молекулы. Выделяют 4 основные субпопуляции В-лимфоцитов: наивные В-клетки (CD27-IgD<sup>+</sup>), непереключенные В-клетки памяти (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), переключенные В-клетки памяти (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) и популяция CD27-IgD<sup>-</sup> В-клеток памяти [13]. Функциональные особенности этих популяций до конца не выяснены. Если CD27-IgD<sup>+</sup> и CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> пулы рассматривают как классические наивные В-лимфоциты и клетки памяти, формирующиеся последовательно в процессе развития В-лимфоцитов и изотипического переключения мембранной экспрессии молекул иммуноглобулинов [13], то особенности формирования и роль непереключенных CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> и CD27-негативных В-клеток памяти нуждается в уточнении. Предполагают, что CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> В-лимфоциты представляют собой циркулирующие В-клетки маргинальной зоны, участвующие в первой линии антимикробной защиты благодаря быстрой продукции низкоаффинных, но высокоavidных IgM антител [13]. Дабл-негативную популяцию CD27-IgD<sup>-</sup> клеток также относят к В-клеткам памяти, поскольку эти лимфоциты морфологически сходны с В-клетками памяти и не экспрессируют ABCВ1 молекулы [12]. Установлено, что эти клетки присутствуют уже при рождении и составляют до 5% всех циркулирующих В-лимфоцитов у здоровых индивидов [14], причем их количество существенно повышается при СКВ и ВИЧ-инфекции [15, 16]. Оценка содержания наивных В-лимфоцитов и В-клеток памяти у пациенток с эндометриозом до настоящего времени не проводилась, хотя выявление особенностей дифференцировки В-лимфоцитов, безусловно, позволит углубить наши представления о механизмах, определяющих развитие аутоиммунных нарушений при эндометриозе и связанном с ним бесплодием.

**Целью** нашего исследования было установить особенности дифференцировки периферических и перитонеальных В-лимфоцитов у пациенток с эндометриозом и бесплодием для уточнения иммунных механизмов развития данного гинекологического заболевания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Пациенты*

Было проведено обследование 59 женщин, поступивших на оперативное лечение по поводу бесплодия в гинекологическую клинику ФГБУ «Ив НИИ МиД им. В.Н. Городкова» Минздрава России (основная группа). У 35 женщин при проведении лапароскопии был диагностирован эндометриоз I–II стадии, у 24 женщин – III–IV стадии по классификации ASF. Все пациентки основной группы предъявляли жалобы на бесплодие, при этом 37 женщин не имели в анамнезе беременностей, поэтому у них было диагностировано первичное бесплодие, а у 22 пациенток, имевших в анамнезе беременности и роды, бесплодие было вторичным. В контрольную группу вошли женщины, поступившие на хирургическую стерилизацию (n=31).

Материалом для исследования служила гепаринизированная периферическая венозная кровь из локтевой вены, взятая до оперативного вмешательства, и перитонеальная жидкость, полученная во время проведения лапароскопии. У всех пациенток было получено информированное согласие на участие в исследовании, согласие на забор периферической крови и перитонеальной жидкости. Проведение исследования было одобрено локальными этическими комитетами ФГБУ «Ив НИИ МиД им.В.Н.Городкова» Минздрава России.

### *Выделение моноклеарных клеток крови и перитонеальной жидкости*

Обогащенную популяцию моноклеарных клеток (МНК) крови и перитонеальной жидкости получали стандартным методом скоростного центрифугирования в плотности фиколл-верографина ( $d=1,078$ ). Клетки из интерфазы фиколл-верографин ( $d=1,078$ ) – среда RPMI 1640 собирали, дважды отмывали фосфатно-солевым буфером и использовали для проведения проточной цитометрии в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл.

### *Проведение проточной цитометрии*

Мы оценивали общее содержание периферических и перитонеальных CD19<sup>+</sup> лимфоцитов в лимфоцитарном гейте, а также определяли уровень CD27<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>, CD20-CD38<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> лимфоцитов в популяции CD19<sup>+</sup> клеток с помощью моноклональных антител (мАТ) методом трехцветной проточной цитометрии на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson, USA). В работе были исполь-

зованы следующие мАТ: анти-CD19, конъюгированные с PerCP-Cy5.5 (eBioscience, USA), анти-CD27 и CD38, конъюгированные с PE (Beckman Coulter, USA) и анти-IgD, конъюгированные с FITC (Beckman Coulter, USA). Для построения лимфоцитарного гейта клетки метили анти-CD45 (FITC) антителами (Beckman Coulter, USA). Анализ данных проводили с использованием программы FACSDiva.

### *Статистический анализ*

Статистический анализ данных осуществлялся по общепринятым методам вариационной статистики после проверки рядов на нормальность распределения с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Лиллифорса. Так как распределение данных в полученных выборках подчинялось закону нормального распределения, достоверность различий между показателями оценивали по t-критерию Стьюдента. Данные представлены в виде среднего арифметического и ошибки среднего арифметического. Различия расценивались как достоверные при уровне значимости  $p < 0,05$ . Статистический анализ осуществляли с помощью программы «Statistica 6.0».

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами не было выявлено изменений общего количества периферических и перитонеальных В-лимфоцитов у пациенток с эндометриозом по сравнению со здоровыми фертильными женщинами (табл. 1). При этом как на системном, так и на локальном уровне содержание плазматических CD19<sup>+</sup>CD20-CD38<sup>+</sup> клеток и наивных CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> лимфоцитов было выше, а количество CD27<sup>+</sup> В-клеток памяти – ниже, чем в контрольной группе (табл. 1).

Более детальная оценка субпопуляционного состава В-клеток памяти и наивных В-лимфоцитов показала, что уменьшение пула клеток памяти как в крови, так и в перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом происходила преимущественно за счет переключенных IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> клеток, а увеличение наивных В-лимфоцитов отмечалось в популяции IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> клеток (табл. 2). Только в перитонеальной жидкости нами было отмечено снижение пула непереключенных IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> клеток памяти при эндометриозе по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Доказано, что иммунные реакции, развивающиеся в перитонеальной полости при непосредственном контакте клеток иммунной системы

**Таблица 1.** Особенности содержания плазматических клеток, наивных В-лимфоцитов и В-клеток памяти в периферической крови и перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом и бесплодием

Показатель, %	Периферическая кровь		Перитонеальная жидкость	
	Контроль (n=31)	Эндометриоз (n=61)	Контроль (n=13)	Эндометриоз (n=59)
CD19 <sup>+</sup>	5,00±0,32	4,62±0,16 p1=0,282	2,19±0,19 p2=0,000	2,29±0,13 p1=0,676* p2=0,000**
CD19 <sup>+</sup> CD20 <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup>	2,03±0,38	5,19±0,75 p1=0,000	3,03±0,53 p2=0,139	6,99±0,63 p1=0,000 p2=0,07
CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	33,09±1,32	25,75±0,83 p1=0,000	41,25±2,45 p2=0,010	27,37±0,99 p1=0,000 p2=0,225
CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup>	66,98±1,34	74,19±0,84 p1=0,000	58,82±2,46 p2=0,008	72,67±1,01 p1=0,000 p2=0,250

\*p1 дано по сравнению с контрольной группой, \*\*p2 дано по сравнению с периферической кровью

**Таблица 2.** Характеристика содержания переключенных и непереключенных CD27<sup>+</sup> и CD27<sup>-</sup> В-лимфоцитов в периферической крови и перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом и бесплодием

Показатель, %	Периферическая кровь		Перитонеальная жидкость	
	Контроль (n=31)	Эндометриоз (n=61)	Контроль (n=13)	Эндометриоз (n=59)
CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup>	22,81±1,23	18,54±1,02 p1=0,010	18,95±2,64 p2=0,204	12,10±1,23 p1=0,031* p2=0,000**
CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	10,45±0,67	9,16±0,65 p1=0,172	22,98±2,55 p2=0,000	14,13±1,20 p1=0,006 p2=0,000
CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup>	24,59±1,48	22,75±1,09 p1=0,322	29,68±3,22 p2=0,170	29,34±2,28 p1=0,932 p2=0,013
CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup>	42,21±1,58	50,06±1,54 p1=0,001	28,60±4,24 p2=0,009	43,91±2,17 p1=0,005 p2=0,025

\*p1 дано по сравнению с контрольной группой, \*\*p2 дано по сравнению с периферической кровью

с эктопическим эндометрием, играют особую роль в патогенезе эндометриоза. Для определения особенностей формирования локального иммунного ответа при эндометриозе мы провели сравнительную оценку направленности дифференцировки В-лимфоцитов крови и перитонеальной жидкости у здоровых женщин и пациенток с эндометриозом. Было установлено, что у здоровых фертильных женщин общее содержание В-лимфоцитов в перитонеальной жидкости практически в 2 раза ниже, чем в кро-

ви (табл. 1), при этом в популяции самих перитонеальных В-лимфоцитов уровень В-клеток памяти повышен, а наивных В-лимфоцитов – снижен по сравнению с показателями крови (табл. 1). Обращал на себя внимание тот факт, что повышение пула клеток памяти в перитонеальной жидкости происходило за счет непереключенных IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> В-лимфоцитов, уровень которых более чем в 2 раза превышал таковой в крови (табл. 2). У пациенток с эндометриозом в перитонеальной жидкости общее количество

В-лимфоцитов (табл. 1), содержание переключенных  $IgD^-CD27^+$  В-клеток памяти и наивных  $CD19^+IgD^+CD27^-$  клеток было ниже, а уровень  $IgD^+CD27^+$  и  $IgD^-CD27^-$  В-лимфоцитов – выше, чем в крови (табл. 2). Хотелось бы отметить, что повышение уровня непереключенных В-клеток памяти в перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом было выражено в меньшей степени, чем у здоровых женщин.

Таким образом, у женщин с эндометриозом и бесплодием на системном и локальном уровне повышено содержание плазматических клеток,  $IgD^+CD27^-$  наивных В-лимфоцитов и снижен уровень  $IgD^-CD27^+$  В-клеток памяти. Только в перитонеальной жидкости женщин с эндометриозом снижается также содержание непереключенных  $IgD^+CD27^+$  В-клеток памяти. Популяция перитонеальных В-лимфоцитов здоровых женщин характеризуется повышенным содержанием непереключенных В-клеток памяти и сниженным уровнем наивных В-лимфоцитов по сравнению с показателями крови, а у женщин с эндометриозом отмечается снижение содержания непереключенных наивных В-лимфоцитов и переключенных В-клеток памяти при повышенном уровне негативных  $CD27^-IgD^-$  В-лимфоцитов и  $IgD^+CD27^+$  В-клеток памяти на локальном уровне по сравнению системным.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о сдвиге дифференцировки В-лимфоцитов крови и перитонеальной жидкости в сторону увеличения количества плазматических клеток, наивных В-лимфоцитов и снижения уровня В-клеток памяти. Ранее было показано, что подобные изменения сопровождают многие аутоиммунные заболевания, такие как системный склероз, ревматоидный артрит и системная красная волчанка, для которых также характерно высокое содержание наивных В-лимфоцитов и сниженный уровень В-клеток памяти [17, 18]. При этом в популяции классических «непереключенных»  $IgD^+CD27^-$  наивных В-лимфоцитов, уровень которых по нашим данным резко повышается при эндометриозе, достаточно часто встречаются аутореактивные В-клетки, несущие В-клеточный рецептор, способный реагировать с антигенами собственного организма [19]. Установлено, что количество этих клеток значительно повышено при ревматоидном артрите и коррелирует с активностью патологического процесса [19]. Таким образом, по-

лученные нами результаты в целом согласуются с выдвинутой ранее гипотезой об аутоиммунной природе эндометриоза, поскольку выявленное нами нарушение дифференцировки В-лимфоцитов при эндометриозе, сопровождающееся накоплением наивных В-клеток, при повышенном содержании плазматических клеток является характерной чертой патологических состояний с аутоиммунным компонентом. С другой стороны, нарушения дифференцировки В-лимфоцитов могут быть связаны и с механизмами развития бесплодия у пациенток с эндометриозом. Это предположение подтверждается данными, полученными Sung N. с соавторами (2016), которые в своем исследовании показали, что у женщин с бесплодием повышено относительное содержание наивных В-клеток и снижено количество В-клеток памяти [20].

Заслуживает особого внимания выявленный нами факт снижения уровня  $IgD^+CD27^+$  В-клеток памяти в перитонеальной жидкости женщин с эндометриозом. По-видимому, эта популяция В-лимфоцитов играет особую роль в развитии локального гуморального иммунного ответа как в норме, так и при эндометриозе. По нашим данным, популяционный состав периферических и перитонеальных В-лимфоцитов существенно различается. У здоровых женщин содержание в перитонеальной жидкости наивных В-лимфоцитов значительно снижено, а В-клеток памяти – повышено по сравнению с показателями периферической крови, что позволяет говорить о более высоком эффекторном потенциале перитонеальных В-лимфоцитов, которые способны быстро развивать эффективный ответ на антигенный стимул. По-видимому, данные особенности способствуют формированию высокого уровня противoinфекционной защиты в перитонеальной полости. Следует особо отметить, что повышение локального уровня В-клеток памяти у здоровых женщин отмечается преимущественно за счет непереключенных  $IgD^+CD27^+$  В-лимфоцитов. Ранее было показано, что эта субпопуляция клеток памяти представляет собой циркулирующие В-клетки маргинальной зоны селезенки и их развитие не связано с взаимодействием с Т-клетками герминативных центров [21].  $IgD^+CD27^+$  В-лимфоциты относят сейчас к клеткам первой линии защиты или ILBs (innate-like B cells), которые лишены функциональных характеристик В-клеток памяти [21]. Считают, что этот пул В-лимфоцитов является одним из основных продуцентов естествен-

ных IgM антител и обеспечивает быструю противоинфекционную защиту [21]. В то же время, есть данные о том, что пул непереключенных В-клеток памяти содержит значительное количество IL-10-продуцирующих регуляторных В-лимфоцитов или В10 клеток, обладающих супрессорной активностью [22]. Рядом исследователей доказана важная роль IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> В-лимфоцитов в развитии аутоиммунных заболеваний. Так, есть данные о том, что у пациентов с ревматоидным артритом уровень CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> лимфоцитов в крови существенно снижен, причем их способность к выработке IgM антител нарушается, и эта популяция В-лимфоцитов приобретает провоспалительные свойства. При этом уровень IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> В-лимфоцитов негативно коррелирует с активностью патологического процесса и его клинической манифестацией, а после эффективной терапии и наступления ремиссии уровень этих клеток у больных ревматоидным артритом восстанавливается [23]. Снижение периферического пула CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> лимфоцитов было также выявлено у пациентов с системной красной волчанкой [13, 23], причем выраженность снижения уровня этих клеток коррелировала с повышением сывороточного содержания анти-ядерных аутоантител [23]. Можно предположить, что популяция непереключенных В-клеток памяти играет важную роль в развитии гуморальных иммунных реакций в перитонеальной полости, обеспечивая быструю противоинфекционную защиту и предотвращая избыточную активацию В-лимфоцитов за счет регуляторных В10-лимфоцитов. Нами было установлено снижение уровня перитонеальных IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> В-лимфоцитов у пациентов с эндометриозом и отмечены менее выраженные, чем у здоровых женщин, изменения в содержании этих клеток на локальном уровне по сравнению с системным. Вероятно, снижение активности этих клеток в перитонеальной жидкости при эндометриозе может быть вести к усилению аутореактивных локальных иммунных реакций, которые, по мнению ряда авторов, участвуют как в механизмах развития эндометриодных очагов, так и в нарушении фертильности у пациенток с эндометриозом [24].

Только при эндометриозе мы выявили достоверно более высокое содержание CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> клеток на локальном уровне по сравнению с системным. В настоящее время этот пул В-лимфоцитов также относят к В-клеткам памяти, несмотря на отсутствие мембранной экс-

прессии CD27 молекул [12]. Считают, что эти CD27-негативные В-клетки памяти находятся на более ранней стадии развития в отношении созревания аффинности их В-клеточного рецептора и характеризуются более низкой экспрессией CD40 молекул, чем IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> лимфоциты, что делает их менее эффективными при развитии Т-зависимого ответа [12]. Существует гипотеза, что пул CD27-негативных В-клеток памяти содержит аутореактивные В-лимфоциты, а сниженная экспрессия ими активационных молекул необходима для ограничения их аутореактивности [12]. Подтверждением этой гипотезы служат данные о повышенном содержании этой популяции при СКВ [15].

Таким образом, отмеченное многими авторами повышение продукции аутоантител при эндометриозе и связанном с ним бесплодии может быть связано с особенностями дифференцировки В-лимфоцитов крови и перитонеальной жидкости, проявляющимися в накоплении пула наивных IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> В-лимфоцитов и уменьшении пула IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> В-клеток памяти. Особую роль в развитии локальных иммунных реакций при эндометриозе, по-видимому, играют популяции непереключенных IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> и дабл-негативных IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> В-клеток памяти, нарушение активности которых может быть одной из причин усиления аутоиммунных реакций и продукции аутоантител.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Burney O., Giudice L. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility* 2012, 98, 511–519.
2. Barrier B. F. Immunology of Endometriosis. *Clinical obstetrics and gynecology* 2010, 53(2), 397–402.
3. Анциферова Ю. С., Сотникова Н. Ю., Улкова-Галова З., Малышкина А. И., Красильникова А. К., Романова С. В. Синтез и продукция RAGE моноцитами при эндометриозе: связь с состоянием репродуктивной функции пациенток. *Российский иммунологический журнал* 2014, 1, 41–47. [Antsiferova Y. S., Sotnikova N. Yu., Ulcova-Gallova Z., Malysheva A. I., Krasilnikova A. K., Romanova S. V. Synthesis and production of RAGE by monocytes during endometriosis: connection with the reproductive function of patients. *Russian Immunological Journal* 2014, 1, 41–47.]
4. Ulcová-Gallová Z., Bouse V., Svábek L., Turek J., Rokytá Z. Endometriosis in reproductive immunology. *Am J Reprod Immunol* 2002, 47(5), 269–2674.
5. Gleicher N., el-Roeiy A., Confino E., Friberg J. Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet. Gynecol* 1987, 70, 115–122.
6. Odukoya O. A., Bansal A., Wilson P., Lim K., Weetman A. P., Cooke I. D. Soluble CD23 protein in the

- peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 1996, 9, 2018–2021.
7. *Gagné D., Rivard M., Pagé M., Shazand K., Hugo P., Gosselin D.* Blood leukocytesubsets are modulated in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2003, 80(1), 43–53.
  8. *Yeol S. G., Won Y. S., Kim Y. I., Lee J. W., Choi Y. J., Park D. C.* Decreased Bcl-6 and increased Blimp-1 in the peritoneal cavity of patients with endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2015, 42 (2), 156–160.
  9. *Hever A., Roth R. B., Hevezi P., Marin M. E., Acosta J. A., Acosta H., Rojas J., Herrera R., Grigoriadis D., White E., Conlon P. J., Maki R. A., Zlotnik A.* Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2007, 104(30), 12451–12456.
  10. *de Graaff A. A., Dunselman G. A., Delvoux B., van Kaam K. J., Smits L. J., Romano A.* B lymphocyte stimulator –817C>T promoter polymorphism and the predisposition for the development of deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2010, 94(3), 1108–1110.
  11. *Christofolini D. M., Cavalheiro C. M., Teles J. S., Lerner T. G., Brandes A., Bianco B., Barbosa C. P.* Promoter –817C>T variant of B lymphocyte stimulator gene (BLyS) and susceptibility to endometriosis-related infertility and idiopathic infertility in Brazilian population. *Scand J Immunol* 2011, 74 (6), 628–631.
  12. *Wu Y. C., Kipling D., Dunn-Walters D. K.* The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol* 2011, 2, 81.
  13. *Torigoe M., Iwata S., Nakayamada S., Sakata K., Zhang M., Hajime M., Miyazaki Y., Narisawa M., Ishii K., Shibata H., Tanaka Y.* Metabolic Reprogramming Commits Differentiation of Human CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B Cells to Plasmablasts or CD272IgD2 Cells. *The Journal of Immunology* 2017, 199, 425–434.
  14. *Sanz I., Wei C., Lee F. E., Anolik J.* Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin. Immunol* 2007, 20, 67–82.
  15. *Wei C., Anolik J., Cappione A., Zheng B., Pugh-Bernard A., Brooks J., Lee E. H., Milner E. C., Sanz I.* A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol* 2007, 178, 6624–6633.
  16. *Moir S., Ho J., Malaspina A., Wang W., Dipoto A. C., O'shea M. A., Roby G., Kottlil S., Arthos J., Proschan M. A., Chun T. W., Fauci A. S.* Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J ExpMed* 2008. 205, 1797–180.
  17. *Simon D., Balogh P., Bognár A., Kellermayer Z., Engelmann P., Németh P., Farkas N., Minier T., Lóránd V., Czirják L., Berki T.* Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2016, Suppl 100(5), 30–36.
  18. *Супоницкая Е. В., Алексанкин А. П., Александрова Е. Н., Авдеева А. С., Панафидина Т. А., Верижникова Ж. Г., Насонов Е. Л.* Определение субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуорометрии у здоровых лиц и больных ревматическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика* 2015, 6, 30–33. [*Suponitskaia E. V., Aleksankin A. P., Aleksandrova E. N., Avdeeva A. S., Panafidina T. A., Verjnikova J. G., Nasonov E. L.* The identification of subpopulations of B-lymphocytes of peripheral blood using technique of flow cytofluorometry in healthy individuals and patients with rheumatoid diseases. *Klin Lab Diagn* 2015, 6, 30–33.]
  19. *Duty J. A., Szodoray P., Zheng N. Y., Koelsch K. A., Zhang Q., Swiatkowski M., Mathias M., Garman L., Helms C., Nakken B., Smith K., Farris A. D., Wilson P. C.* Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J Exp Med* 2009, 206(1):139–151.
  20. *Sung N., Byeon H. J., Garcia M. D. S., Skariah A., Wu L., Dambaeva S., Beaman K., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J.* Deficiency in memory B cell compartment in a patient with infertility and recurrent pregnancy losses. *J Reprod Immunol* 2016, 118, 70–75.
  21. *Weller S., Braun M. C., Tan B. K., Rosenwald A., Corder C., Conley M. E., Plebani A., Kumararatne D. S., Bonnet D., Tournilhac O., Tchernia G., Steiniger B., Staudt L. M., Casanova J. L., Reynaud C. A., Weill J. C.* Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004, 104(12), 3647–3654.
  22. *Malkiel S., Jeganathan V., Wolfson S., Manjarrez Orduño N., Marasco E., Aranow C., Mackay M., Gregersen P. K., Diamond B.* Checkpoints for autoreactive B cells in the peripheral blood of lupus patients assessed by flow cytometry. *Arthritis Rheumatol* 2016, 68(9): 2210–2220.
  23. *Hu F., Zhang W., Shi L., Liu X., Jia Y., Xu L., Zhu H., Li Y., Xu D., Lu L., Qiu X., Liu W., Qiao J., Wang Y., Li Z.* Impaired CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B Cells With Altered Gene Signature in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2018, 23(9), 626.
  24. *Malkiel S., Jeganathan V., Wolfson S., Manjarrez Orduño N., Marasco E., Aranow C., Mackay M., Gregersen P. K., Diamond B.* Checkpoints for autoreactive B cells in the peripheral blood of lupus patients assessed by flow cytometry. *Arthritis Rheumatol* 2016, 68(9), 2210–2220.
  25. *Eisenberg V. H., Zolti M., Soriano D.* Is there an association between autoimmunity and endometriosis? *Autoimmun Rev* 2012, 11(11), 806–814.

## IMPAIRMENT OF THE DIFFERENTIATION OF PERIPHERAL BLOOD AND PERITONEAL FLUID B-LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS AND INFERTILITY

© 2019 Yu. S. Antsiferova\*, A. I. Malyshkina, L. H. Abdullaeva

\*E-mail: niimid.immune@mail.ru

Federal state budget establishment «Ivanovo's Research Institute of Maternity and Childhood name V. N. Gorodkov» of Healthy Ministry of Russian Federation, Ivanovo, Russia

Received: 19.09.2018. Accepted: 25.08.2019

It was supposed that endometriosis development is associated with autoimmune disorders, but the character of B-lymphocytes functioning during this gynecological disease practically is not studied. The aim of our work was to elucidate the character of the peripheral and peritoneal B-cells differentiation in patients with endometriosis and infertility. 59 women, who underwent surgical treatment of infertility in gynecological clinic, were carried out into investigation. I–II stages of endometriosis were diagnosed in 35 women and III–IV stages – in 24 women. 31 women, who underwent surgical sterilization, formed a control group. Peripheral blood and peritoneal fluid were used as the material for investigation. Peripheral and peritoneal B-lymphocytes phenotype was estimated by multicolor flow cytometry. It was found that during endometriosis at the systemic and local level the content of plasma cells, unswitched CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naïve B-lymphocytes was increased and the level of switched CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> memory B-cells was diminished. In peritoneal fluid of women with endometriosis the amount of unswitched CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> memory B-cells was also decreased. In healthy women the population of peritoneal B-lymphocytes differed from peripheral B-lymphocytes by higher content of unswitched CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> memory B-cells and lower level of naïve B-lymphocytes. In women with endometriosis at the local level the amount of unswitched CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naïve B-lymphocytes and switched CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> memory B-cells was lower and levels of CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> and CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> memory B-cells were higher than that in the blood. Likely, the noted elevation of autoantibodies production during endometriosis may be due to increased levels of peripheral and peritoneal naïve B-lymphocytes and diminished amount of peritoneal unswitched memory B-cells, participated in the regulation of the autoantibodies production.

*Key words:* endometriosis, naïve B-lymphocytes, memory B-cells, blood, peritoneal fluid

### Authors:

**Antsiferova Yu. S.**, BD, leading scientific worker of the Laboratory of clinical immunology, Federal State Budget Establishment «Ivanovo's Research Institute of Maternity and Childhood name V. N. Gorodkov» of Healthy Ministry of Russian Federation, Ivanovo, Russia;

**Malyshkina A. I.**, MD, professor, director, Federal State Budget Establishment «Ivanovo's Research Institute of Maternity and Childhood name V. N. Gorodkov» of Healthy Ministry of Russian Federation, Ivanovo, Russia;

**Abdullaeva L. H.**, junior scientific worker of the Department of obstetrics and gynecology, Federal State Budget Establishment «Ivanovo's Research Institute of Maternity and Childhood name V. N. Gorodkov» of Healthy Ministry of Russian Federation, Ivanovo, Russia.



## ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ОТ ИСХОДА РАСПРОСТРАНЕННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА

© 2019 г. В. Д. Беленюк<sup>1</sup>, А. А. Савченко<sup>1,2\*</sup>, А. Г. Борисов<sup>1</sup>, И. В. Кудрявцев<sup>3</sup>

\*E-mail: aasavchenko@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 25.09.2018. Принята: 25.08.2019

С целью исследования фенотипического состава Т-лимфоцитов периферической крови у людей в динамике послеоперационного лечения в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита (РГП) обследовано 38 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП. Забор крови производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7, 14 и 21 сутки послеоперационного периода. Исследование фенотипа Т-лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии. Установлено, что фенотип Т-лимфоцитов крови у больных РГП в до- и послеоперационном периоде значительно различается в зависимости от исхода заболевания. При благоприятном исходе РГП в дооперационном периоде выявляется повышенное количество общих Т-лимфоцитов, в том числе, с экспрессией CD62L, а также CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, прежде всего за счет Treg (включая активированные клетки). Следовательно, повышение количества в крови Treg у больных РГП на пике заболевания является прогностическим признаком благоприятного исхода. Treg регулируют интенсивность воспалительного процесса, что приводит к улучшению клинического состояния больных РГП и, соответственно, повышает вероятность благоприятного исхода заболевания. Фенотип Т-лимфоцитов крови значительно меняется в динамике послеоперационного лечения. Независимо от исхода заболевания у больных значительно снижается содержание Т-клеток, экспрессирующих CD28 и CD62L, а также уровень Т-хелперов и Treg. Только при благоприятном исходе заболевания к концу наблюдаемого периода (21 сутки лечения) в крови повышается количество цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-клеток с экспрессией CD57. Данные изменения фенотипического состава Т-лимфоцитов определяются применением антибиотиков и миграцией клеток в зону воспаления.

**Ключевые слова:** перитонит, Т-лимфоциты, Т-регуляторные клетки, послеоперационный период, исход заболевания

DOI: 10.31857/S102872210007041-0

**Адрес:** 660022, Красноярск, ул. П. Железняк, 3Г, лаборатория клеточно-молекулярной физиологии и патологии, НИИ медицинских проблем Севера, Савченко Андрей Анатольевич. Тел.: +7 905 971-3715. E-mail: aasavchenko@yandex.ru

**Авторы:**

**Беленюк В. Д.**, м.н.с. лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия;

**Савченко А. А.**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красно-

ярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия; кафедра медицинской биологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия;

**Борисов А. Г.**, к.м.н., в.н.с. лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия;

**Кудрявцев И. В.**, к.б.н., с.н.с. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на постоянное совершенствование методов хирургического лечения, а также увеличения количества препаратов, призванных в кратчайшие сроки купировать воспалительный процесс и активно бороться с инфекцией, неблагоприятный исход гнойно-септических заболеваний до сих пор остается на высоком уровне. По мнению большинства специалистов, одним из наиболее проблемных заболеваний абдоминальной хирургии является распространенный гнойный перитонит (РГП), летальность при котором может варьироваться в пределах от 10 до 30%, а при генерализации воспаления и развитии полиорганной недостаточности достигать 80–90% [1, 2, 3].

Установлено, что тяжесть течения РГП, а также характер и особенности развития различных сопутствующих осложнений, как правило, определяются не только генезом основного патологического процесса и адекватностью проводимого лечения, но и во многом зависят от изменений, происходящих в системе иммунитета [4, 5]. Значительное количество исследований, посвященных иммунопатогенезу РГП, направлено на характеристику различных клеточных и гуморальных показателей врожденного иммунитета [6, 7]. Доказано, что функциональная активность клеток врожденного иммунитета во многом определяет тяжесть и характер течения РГП. В тоже время, ни в коем случае нельзя пренебрегать важностью изменений, которым подвергаются клетки адаптивного иммунитета и, в частности, Т-лимфоциты, которые осуществляют не только многочисленные эффекторные, но еще и регуляторные функции [8, 9]. Так, в исследовании Wang W. et al. (2018) показано, что такой поверхностный антиген Т-лимфоцитов как TIM-3 (от англ. «T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3» или CD366) является важным негативным регулятором воспаления при перитонитах и может рассматриваться в качестве потенциальной мишени для лечения заболеваний с неконтролируемой активацией воспаления [10]. Другой группой исследователей доказано, что Th17-лимфоциты стимулируют развитие эффективного противобактериального иммунного ответа при перитонитах [11]. Следовательно, детальное изучение изменений состояния Т-клеточного звена приобретенного иммунитета при РГП является весьма перспективной.

**Целью исследования** явилась оценка фенотипического состава Т-лимфоцитов перифериче-

ской крови у людей в динамике послеоперационного лечения в зависимости от исхода РГП.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра Краевой клинической больницы № 1 обследовано 38 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 25–65 лет (средний возраст пациентов составил 49,6 лет). Из исследования были исключены пациенты, у которых причиной РГП являлись: острый деструктивный панкреатит (панкреонекроз), тотальный мезентериальный тромбоз, онкологические заболевания, туберкулез. Объем оперативного вмешательства и количество санаций определялись лечащим врачом в зависимости от состояния больного. Забор крови производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7, 14 и 21 сутки послеоперационного периода. В качестве контроля обследовано 40 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа Т-лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с моноклональными антителами (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: CD62L-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7 и CD57-FITC/CD28-PE/CD3-ECD/CD62L-PC5/CD45-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [12]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [13]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, USA) центра коллективного пользования КНЦ СО РАН. В каждой пробе анализировали не менее 50000 лимфоцитов.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2008 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Выборку описывали 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 (Mann-Whitney U test). Достоверность различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Обнаружено снижение количества общих лимфоцитов у больных РГП в дооперационном периоде независимо от исхода заболевания (табл. 1). В послеоперационном периоде, начиная с 7 суток лечения, уровень лимфоцитов у пациентов с РГП повысился до контрольного диапазона. На 14-е сутки послеоперационного периода у больных с неблагоприятным исходом РГП (группа 2) наблюдается относительное понижение количества лимфоцитов по сравнению с пациентами с благоприятным исходом

заболевания (группа 1). Только у больных с благоприятным исходом заболевания в дооперационном периоде выявляется повышение уровня  $CD3^+$ -лимфоцитов относительно контрольных значений. Начиная с 7-х суток послеоперационного лечения, у лиц данной группы наблюдается снижение уровня Т-клеток до контрольных значений. Только на 21-е сутки лечения у больных РГП относительно контрольного уровня обнаружено понижение содержания  $CD3^+CD28^+$ -клеток. У больных с благоприятным исходом РГП на 14-е и 21-е сутки послеоперационного лечения наблюдается повышение количества  $CD3^+CD57^+$ -лимфоцитов относительно контрольных значений и показателей, выявляемых у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания. В дооперационном периоде относительно контрольного диапазона при благоприятном исходе РГП наблюдается повышение количества  $CD3^+CD62L^+$ -клеток, тогда как при неблагоприятном — понижение. На 21-е сутки послеоперационного периода содержание данной фракции лимфоцитов между группами больных выравнивается, но оказывается ниже, чем у лиц контрольной группы.

**Таблица 1.** Содержание Т-лимфоцитов у больных РГП в динамике послеоперационного периода (Me, ( $C_{25}$ – $C_{75}$ ))

Показатель	Группа	Контроль	До операции	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Лимфоциты, $10^9/л$	1	1,70 (0,30–2,28)	0,93*** (0,77–1,31)	1,22 (0,83–1,49)	1,51 (1,17–2,06)	1,47 (0,98–2,28)
	2		0,69*** (0,41–1,28)	0,90 (0,74–1,85)	1,05# (0,65–1,13)	2,08 (1,33–2,83)
$CD3^+$ , %	1	72,7 (68,1–76,7)	76,1* (71,7–82,0)	72,6 (67,2–81,5)	80,0 (70,0–82,6)	76,9 (69,9–89,9)
	2		73,1 (67,0–88,3)	70,7 (63,8–78,9)	78,4 (64,3–83,2)	75,9 (61,0–81,6)
$CD3^+CD28^+$ , %	1	65,0 (56,1–71,4)	68,7 (62,4–75,9)	56,2 (48,4–72,0)	54,3 (49,3–69,1)	36,1** (32,1–38,2)
	2		66,9 (59,9–72,7)	64,6 (50,2–71,4)	60,1 (56,1–69,6)	50,1* (31,0–59,3)
$CD3^+CD57^+$ , %	1	8,5 (4,8–12,3)	8,5 (4,5–16,1)	11,3 (8,2–18,8)	20,1** (11,3–22,6)	27,5** (20,8–29,2)
	2		10,6 (9,5–13,0)	7,8 (4,6–17,2)	7,4# (4,6–10,2)	13,5# (13,0–15,5)
$CD3^+CD62L^+$ , %	1	42,2 (36,7–51,0)	51,2* (47,2–55,0)	48,9 (34,2–54,6)	46,7 (41,0–52,5)	32,5* (27,2–36,0)
	2		38,0*# (34,1–48,1)	35,5 (31,6–48,4)	40,0 (19,1–40,2)	27,0** (23,3–33,4)

**Примечание:** 1 – больные с благоприятным исходом РГП; 2 – больные с неблагоприятным исходом РГП; \* – сравнение с контролем (\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ ); # – сравнение между группами 1 и 2 (# –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,01$ ).

**Таблица 2.** Содержание CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов у больных РГП в динамике послеоперационного периода (Ме, (C<sub>25</sub>-C<sub>75</sub>))

Показатель	Группа	Контроль	До операции	7 сутки	14 сутки	21 сутки
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	1	26,5 (21,7–30,7)	21,2 (14,8–28,3)	22,1 (19,7–31,4)	37,1 (22,9–40,2)	40,9* (32,6–42,0)
	2		23,5 (15,2–27,1)	19,1 (14,7–27,7)	19,5 (16,8–31,3)	33,8 (31,5–36,2)
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> , %	1	24,9 (20,2–29,6)	21,2 (14,8–28,3)	22,0 (19,6–31,3)	37,1* (22,6–40,2)	40,7* (32,5–41,8)
	2		23,5 (15,2–27,0)	19,0 (14,6–27,1)	19,2 (16,6–30,9)	33,5 (31,2–35,8)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	1	44,0 (37,7–48,5)	54,0*** (45,6–60,5)	45,1 (37,6–51,6)	46,7 (39,8–50,5)	31,4* (28,5–37,4)
	2		46,4 (42,5–52,3)	42,5 (32,9–50,1)	38,0 (19,1–51,2)	26,3* (25,6–37,4)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	1	29,4 (24,6–35,9)	53,2*** (39,7–83,8)	52,9*** (36,0–78,1)	38,1* (30,8–77,7)	21,2* (18,6–27,8)
	2		32,1 (29,8–46,5)	39,5 (20,5–52,9)	31,1 (28,6–59,9)	26,4 (19,8–68,0)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>Low</sup> CD25 <sup>High</sup> , %	1	5,1 (4,0–6,6)	11,2*** (7,3–15,5)	9,3** (4,8–15,7)	6,3 (4,9–17,0)	3,1* (2,8–4,0)
	2		4,4# (3,0–10,4)	6,2 (2,4–14,7)	6,3 (5,4–26,9)	2,5* (0,3–4,4)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>Low</sup> CD25 <sup>High</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	1	3,8 (2,9–4,9)	7,3*** (5,7–10,4)	6,4*** (4,0–8,6)	5,7* (4,0–11,5)	2,6 (2,3–3,3)
	2		3,4## (2,1–5,5)	3,5 (1,2–6,6)	4,8 (4,2–8,1)	2,2* (0,01–2,8)

**Примечание:** 1 – больные с благоприятным исходом РГП; 2 – больные с неблагоприятным исходом РГП; \* – сравнение с контролем (\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001); # – сравнение между группами 1 и 2 (# – p<0,05, ## – p<0,01).

Процентное количество CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток у больных РГП в дооперационном и на протяжении первых двух недель послеоперационного периода соответствуют контрольному диапазону (табл. 2). На 21-е сутки лечения только при благоприятном исходе наблюдается повышение количества клеток с данным фенотипом относительно контрольного диапазона. Содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-лимфоцитов в крови у обследованных пациентов в целом соответствует количеству CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток. Только при благоприятном исходе заболевания на 14-е и 21-е сутки лечения наблюдается повышение уровня CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-клеток относительно контрольного диапазона.

У больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде выявляется повышение уровня CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов относительно контрольных значений (см. табл. 2). На 21-сутки послеоперационного лечения у всех

обследованных пациентов независимо от исхода заболевания наблюдается понижение содержания лимфоцитов с данным фенотипом относительно контрольного диапазона. Только при благоприятном исходе инфекционно-воспалительного заболевания в дооперационном и в первые две недели послеоперационного периода относительно контрольных значений выявляется повышение уровня CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>-лимфоцитов. Содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD127<sup>Low</sup>CD25<sup>High</sup>-клеток у больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде повышается относительно контрольных значений, при неблагоприятном исходе – понижается. На 7-е сутки послеоперационного лечения количество данных клеток при благоприятном исходе остается на повышенном уровне, на 14-е сутки – соответствуют контрольному диапазону, на 21-е сутки наблюдается понижение их количества относительно контрольного уровня. В первые две

недели послеоперационного периода при неблагоприятном исходе РГП наблюдается соответствие уровня регуляторных Т-клеток с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$  контрольному диапазону, но на 21-е сутки лечения выявляется значительное понижение. Количество  $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}CD62L^+$ -клеток в крови у больных РГП с благоприятным исходом заболевания в дооперационном периоде значительно превышает контрольный диапазон, содержание остается повышенным в первые две недели послеоперационного периода и понижается до контрольного уровня к 21-м суткам лечения. При неблагоприятном исходе заболевания уже в дооперационном периоде выявляется понижение количества  $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}CD62L^+$ -клеток, их содержание восстанавливается до контрольного диапазона в первые две недели послеоперационного лечения, но на 21-е сутки лечения значительно снижается.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Фенотипический состав Т-лимфоцитов у больных РГП в динамике послеоперационного периода значительно меняется, в том числе и в зависимости от исхода заболевания. Так, в дооперационном периоде при благоприятном исходе РГП выявляется повышенное количество Т-лимфоцитов, которое в течение всего наблюдаемого послеоперационного периода снижается до уровня контрольных значений. Тогда как у пациентов с неблагоприятным исходом РГП содержание Т-лимфоцитов в крови на всем протяжении обследования не изменяется и соответствует контрольному диапазону.

В качестве дополнительных молекул, представленных на поверхности Т-лимфоцитов и характеризующих их функциональную активность, были исследованы CD28, CD57 и CD62L. Так, CD28 является гомодимером, принимает участие в формировании «второго» или ко-стимуляционного сигнала для Т-лимфоцитов [14, 15]. Доказано, что стимуляция Т-клеток через Т-клеточный рецептор при отсутствии ко-стимулирующего сигнала от CD28 вызывает развитие толерантности или индукцию апоптоза [16, 17]. Обнаружено, что независимо от исхода РГП у обследованных больных к концу наблюдаемого периода снижается количество Т-лимфоцитов с экспрессией CD28. CD57 (NHK1) — углеводный эпитоп, экспрессированный на ряде клеток иммунной системы. Доказано, что экспрессия CD57 на поверхности зрелых эффекторных цитотоксических Т-лим-

фоцитов характеризует наличие в их цитоплазме гранул, содержащих перфорин и гранзимы [18, 19, 20]. При благоприятном исходе РГП в крови наблюдалось увеличение уровня Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD57, начиная с 14-х суток послеоперационного лечения. У больных с неблагоприятным исходом РГП в до- и послеоперационном периоде не выявляется изменений в количестве Т-клеток с экспрессией CD57. CD62L является мембранным гликопротеидом семейства L-селектинов, который экспрессируется на различных клетках иммунной системы и обеспечивает межклеточные взаимодействия и направленную миграцию Т-лимфоцитов в периферические лимфоидные органы [21, 22]. У больных с благоприятным исходом заболевания в дооперационном периоде установлено превышение количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD62L, на 21,3% по сравнению с контрольными значениями и понижение их содержания к концу третьей недели послеоперационного периода в 1,3 раза. В то же время, при неблагоприятном исходе РГП обнаружен низкий уровень  $CD62L^+$ -Т-клеток в дооперационном периоде и на 21-е сутки послеоперационного лечения.

Выявленные изменения в содержании цитотоксических Т-клеток и  $CD4^+$  Т-лимфоцитов у больных в зависимости от исхода РГП. Так, только у пациентов с благоприятным исходом РГП к концу наблюдаемого периода послеоперационного лечения повышается количество цитотоксических Т-лимфоцитов (на 21 сутки) и активированных цитотоксических Т-клеток (с 14 суток). У больных с неблагоприятным исходом РГП количество цитотоксических Т-лимфоцитов в крови (включая активированные) и в до-, и в послеоперационном периоде соответствует контрольным значениям.

В дооперационном периоде при благоприятном исходе заболевания выявляется повышение количества  $CD4^+$ -Т-лимфоцитов, однако к 21-м суткам послеоперационного лечения наблюдается снижение уровня Т-хелперов у лиц данной группы. При неблагоприятном исходе РГП наблюдается только понижение содержания Т-хелперов к концу наблюдаемого периода. В то же время, повышенное в дооперационном периоде количество активированных  $CD4^+$ -Т-лимфоцитов (экспрессирующих CD62L) при благоприятном исходе РГП остается увеличенным в течение 14 дней послеоперационного лечения, тогда как при неблагоприятном исходе заболевания изменений в уровне активирован-

ных Т-хелперов в течение всего наблюдаемого периода не обнаружено.

Важную роль в развитии иммуновоспалительных процессов играют Т-регуляторные клетки (Treg). Интенсивность воспалительных процессов во многом зависит от количества и функциональной активности Treg [23, 24, 25]. При исследовании Treg и активированных Treg (с экспрессией CD62L, CD62L<sup>+</sup>-Treg) обнаружено, что при благоприятном исходе РГП выявляется увеличение количества Treg и CD62L<sup>+</sup>-Treg в дооперационном периоде, сохранение повышенного уровня в начале послеоперационного лечения и понижение содержания на 21-е сутки наблюдаемого периода. При неблагоприятном исходе заболевания обнаружено снижение содержания Treg и CD62L<sup>+</sup>-Treg в дооперационном периоде и на 21-е сутки послеоперационного лечения.

В целом, можно заключить, что динамика фенотипического состава Т-лимфоцитов в крови у больных РГП в до- и послеоперационном периоде имеет выраженные особенности в зависимости от исхода заболевания. При благоприятном исходе РГП наблюдается более выраженные изменения фенотипа Т-клеток в дооперационном периоде (повышение количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Treg, включая клетки экспрессирующие CD62L), тогда как при неблагоприятном исходе РГП в указанный период выявляется снижение содержания CD62L<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, Treg и CD62L<sup>+</sup>-Treg. Можно предположить, что именно недостаточность (функциональная и количественная) Treg и приводит к неконтролируемой активности воспалительных процессов при РГП и, соответственно, повышает вероятность неблагоприятного исхода заболевания. В конце послеоперационного лечения наблюдается снижение количества некоторых субпопуляций Т-лимфоцитов (например, Т-хелперов). Такая особенность динамики фенотипического состава Т-лимфоцитов уже слабее зависит от исхода заболевания и, по-видимому, в большей степени определяется применением антибиотиков и миграцией Т-клеток в зону воспаления. В частности, повышение содержания у больных с благоприятным исходом РГП Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD57, также может быть связано применением антибиотиков в динамике послеоперационного периода.

Фенотип Т-лимфоцитов крови у больных РГП в до- и послеоперационном периоде значительно различается в зависимости от исхода заболевания. При благоприятном исходе РГП в дооперационном периоде выявляется повы-

шенное количество общих Т-лимфоцитов, в том числе, с экспрессией CD62L, а также CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, прежде всего за счет Treg (включая активированные клетки). Следовательно, повышение количества в крови Treg у больных РГП на пике заболевания является прогностическим признаком благоприятного исхода. Treg регулируют интенсивность воспалительного процесса, что приводит к улучшению клинического состояния больных РГП и, соответственно, повышает вероятность благоприятного исхода заболевания. Фенотип Т-лимфоцитов крови значительно меняется в динамике послеоперационного лечения. Независимо от исхода заболевания у больных значительно снижается содержание Т-клеток, экспрессирующих CD28 и CD62L, а также уровень Т-хелперов и Treg. Только при благоприятном исходе заболевания к концу наблюдаемого периода (21 сутки лечения) в крови повышается количество цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-клеток с экспрессией CD57. Данные изменения фенотипического состава Т-лимфоцитов определяются применением антибиотиков и миграцией клеток в зону воспаления. Установленные особенности фенотипа Т-лимфоцитов в крови у больных РГП в дооперационном периоде и в динамике послеоперационного лечения определяют необходимость разработки методов иммуноактивной терапии для успешного лечения заболевания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Савченко А. А., Здзитовецкий Д. Э., Борисов А. Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск, Наука, 2013, 9–34. [Savchenko A. A., Zdzitoveckij D. Je., Borisov A. G. Immune The immune and metabolic disorders by the widespread purulent peritonitis. Novosibirsk, Nauka, 2013, 9–34].
2. Ding W., Wang K., Liu B., Fan X., Wang S., Cao J., Wu X., Li J. Open Abdomen Improves Survival in Patients With Peritonitis Secondary to Acute Superior Mesenteric Artery Occlusion. J. Clin. Gastroenterol. 2017, 51(9), e77-e82.
3. Obi Y., Streja E., Mehrotra R., Rivara M. B., Rhee C. M., Soohoo M., Gillen D. L., Lau W. L., Kovesdy C. P., Kallantar-Zadeh K. Impact of Obesity on Modality Longevity, Residual Kidney Function, Peritonitis, and Survival Among Incident Peritoneal Dialysis Patients. Am. J. Kidney Dis. 2018, 71(6), 802–813.
4. Mai M., Stengel S., Al-Herwi E., Peter J., Schmidt C., Rubio I., Stallmach A., Bruns T. Genetic variants of TRAF6 modulate peritoneal immunity and the risk of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: A combined prospective-retrospective study. Sci. Rep. 2017, 7(1), 4914.

5. Mousa N., Besheer T., Abdel-Razik A., Hamed M., Deiah A. G., Sheta T., Eldars W. Can combined blood neutrophil to lymphocyte ratio and C-reactive protein be used for diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis? Br. J. Biomed. Sci. 2018, 75(2), 71–75.
6. Савченко А.А., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода. Инфекция и иммунитет 2017, 7(1), 51–60. [Savchenko A. A., Gvozdev I. I., Borisov A. G., Cherdancev D. V., Pervova O. V., Kudryavtsev I. V., Moshev A. V. Phagocytic activity and blood neutrophils respiratory burst state features amongst widespread purulent peritonitis patients in the postoperative period dynamics. Russian Journal of Infection and Immunity 2017, 7(1), 51–60.]
7. Cullaro G., Kim G., Pereira M. R., Brown R. S. Jr., Verna E. C. Ascites Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Identifies Spontaneous Bacterial Peritonitis and Predicts Mortality in Hospitalized Patients with Cirrhosis. Dig. Dis. Sci. 2017, 62(12), 3487–3494.
8. Lee J. Y., Kim S. M., Park S. J., Lee S. O., Choi S. H., Kim Y. S., Woo J. H., Kim S. H. A rapid and non-invasive 2-step algorithm for diagnosing tuberculous peritonitis using a T cell-based assay on peripheral blood and peritoneal fluid mononuclear cells together with peritoneal fluid adenosine deaminase. J. Infect. 2015, 70(4), 356–366.
9. Nemzek J. A., Fry C., Moore B. B. Adoptive transfer of fibrocytes enhances splenic T-cell numbers and survival in septic peritonitis. Shock 2013, 40(2), 106–114.
10. Wang W., Shi Q., Dou S., Li G., Shi X., Jiang X., Wang Z., Yu D., Chen G., Wang R., Xiao H., Hou C., Feng J., Shen B., Ma Y., Han G. Negative regulation of Nod-like receptor protein 3 inflammasome activation by T cell Ig mucin-3 protects against peritonitis. Immunology 2018, 153(1), 71–83.
11. Yu W., Yao D., Yu S., Wang X., Li X., Wang M., Liu S., Feng Z., Chen X., Li W., Wang L., Liu W., Ma J., Yu L., Tong C., Song B., Cui Y. Protective humoral and CD4(+) T cellular immune responses of *Staphylococcus aureus* vaccine MntC in a murine peritonitis model. Sci. Rep. 2018, 8(1), 3580.
12. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа. Медицинская иммунология 2015, 17(1), 19–26. [Kudryavtsev I. V., Subbotovskaya A. I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. Medical Immunology 2015, 17(1), 19–26.]
13. Sutherland D. R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. Cytometry B Clin Cytom. 2018, 94(1), 1–15.
14. Geng L., Liu J., Huang J., Lin B., Yu S., Shen T., Wang Z., Yang Z., Zhou L., Zheng S. A high frequency of CD8(+) CD28(-) T-suppressor cells contributes to maintaining stable graft function and reducing immunosuppressant dosage after liver transplantation. Int. J. Med. Sci. 2018, 15(9), 892–899.
15. Langenhorst D., Haack S., Göb S., Uri A., Lühder F., Vanhove B., Hünig T., Beyersdorf N. CD28 costimulation of T helper 1 cells enhances cytokine release *in vivo*. Front Immunol. 2018, 9, 1060.
16. Marangoni F., Zhang R., Mani V., Thelen M., Ali Akbar N. J., Warner R. D., Aijö T., Zappulli V., Martinez G. J., Turka L. A., Mempel T. R. Tumor tolerance-promoting function of regulatory T cells is optimized by CD28, but strictly dependent on calcineurin. J. Immunol. 2018, 200(10), 3647–3661.
17. Porciello N., Kunkl M., Tuosto L. CD28 between tolerance and autoimmunity: the side effects of animal models. F1000Res. 2018, 7, pii: F1000.
18. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки. Тихоокеанский медицинский журнал 2015, 2, 30–35. [Kudryavtsev I. V., Borisov A. G., Volkov A. E., Savchenko A. A., Serebryakova M. K., Polevshchikov A. V. Analysis of CD56 and CD57 expression levels by cytotoxic T-lymphocytes of different differentiation levels. Pacific Medical Journal 2015, 2, 30–35.]
19. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробицец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. Медицинская иммунология 2015, 17(6), 525–538. [Kudryavtsev I. V., Borisov A. G., Crabinet I. I., Savchenko A. A., Serebryakova M. K. Determination of the main subpopulations of cytotoxic T-lymphocytes by multi-color flow cytometry. Medical Immunology 2015, 17(6), 525–538.]
20. Hu G., Wang S. Prognostic role of tumor-infiltrating CD57-positive lymphocytes in solid tumors: a meta-analysis. Oncotarget 2017, 9(8), 8111–8119.
21. Sopper S., Mustjoki S., White D., Hughes T., Valent P., Burchert A., Gjertsen B. T., Gastl G., Baldauf M., Trajanoski Z., Giles F., Hochhaus A., Ernst T., Schenk T., Janssen J. J., Ossenkoppele G. J., Porkka K., Wolf D. Reduced CD62L expression on T cells and increased soluble CD62L levels predict molecular response to tyrosine kinase inhibitor therapy in early chronic-phase chronic myelogenous leukemia. J. Clin. Oncol. 2017, 35(2), 175–184.
22. Spadaro M., Caldano M., Marnetto F., Lugaresi A., Bertolotto A. Natalizumab treatment reduces L-selectin (CD62L) in CD4+ T cells. J. Neuroinflammation 2015, 12, 146.
23. Савченко А.А., Каспаров Э.В., Арутюнян С.С., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Взаимосвязь содержания Th- и T-регуляторных клеток в крови и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных хроническим эндометритом и аднекситом. Медицинская иммунология 2018, 20(1), 61–72. [Savchenko A. A., Kasparov E. V., Arutyunyan S. S., Borisov A. G., Kudryavtsev I. V., Gvozdev I. I., Moshev A. V. Relationship between the Th and T regulatory cells in blood, and chemiluminescent activity of neutrophils in patients with chronic endometritis and adnexitis. Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2018, 20(1), 61–72.]

24. Schmid T., Falter L., Weber S., Müller N., Molitor K., Zeller D., Weber-Steffens D., Hehlhans T., Wajant H., Mostböck S., Männel D. N. Chronic inflammation increases the sensitivity of mouse Treg for TNFR2 co-stimulation. *Front Immunol.* 2017, 8, 1471.
25. Sun G., Hou Y., Gong W., Liu S., Li J., Yuan Y., Zhang D., Chen Q., Yan X. Adoptive induced antigen-specific Treg cells reverse inflammation in collagen-induced arthritis mouse model. *Inflammation* 2018, 41(2), 485–495.

## DEPENDENCE OF THE BLOOD T-LYMPHOCYTES PHENOTYPE FROM THE OUTCOME OF THE WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS

© 2019 V. D. Belenjuk<sup>1</sup>, A. A. Savchenko<sup>1,2\*</sup>, A. G. Borisov<sup>1</sup>, I. V. Kudryavtsev<sup>3</sup>

\*E-mail: aasavchenko@yandex.ru

<sup>1</sup>Laboratory of the Cellular Molecular Physiology and Pathology, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>2</sup>Department of Medical Biology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>3</sup>Department of immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russia

Received: 27.02.2019. Accepted: 25.08.2019

The purpose of the research was to study the phenotypic composition of peripheral blood T-lymphocytes in humans in the dynamics of postoperative treatment depending on the outcome of the widespread purulent peritonitis (WPP). 38 patients with acute surgical diseases and abdominal cavity injuries complicated by WPP were examined. Blood sampling was performed before the operation (preoperative period) and also on the 7th, 14th and 21st day of the postoperative period. The study of the phenotype of blood T-lymphocytes was carried out by flow cytometry. It was established that the phenotype of blood T-lymphocytes in patients with WPP in the pre- and post-operative period differs significantly in depending on the outcome of the disease. With a favorable outcome of WPP in the pre-operative period, an increased number of common T-lymphocytes, including expression of CD62L, and CD4<sup>+</sup>-T cells, primarily due to Treg (including activated cells) are detected. Consequently, an increase in the amount of Treg in patients with WPP at the peak of the disease is a prognostic sign of a favorable outcome. Treg regulate the intensity of the inflammatory process that leads to an improvement in the clinical state of patients with WPP and accordingly increases the likelihood of a favorable outcome of the disease. The phenotype of blood T-lymphocytes significantly changes in the dynamics of post-operative treatment. Regardless of the outcome of the disease, the content of T-cells expressing CD28 and CD62L, as well as the T-helper and Treg level, is significantly reduced in patients. Only with a favorable outcome of the disease at the end of the observed period (21 days of treatment) in the blood increases the amount of cytotoxic T-lymphocytes and T-cells with CD57 expression. These changes in the phenotypic composition of T-lymphocytes are determined by the use of antibiotics and the migration of cells into the inflammation zone.

*Key words:* peritonitis, T-regulatory cells, postoperative period, outcome of the disease

### Authors:

**Belenjuk V. D.**, junior researcher, Laboratory of the Cellular Molecular Physiology and Pathology of the Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

**Savchenko A. A.**, ✉ doctor of medicine, professor, head of the laboratory of the Cellular Molecular Physiology and Pathology of the Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia; Department of Medical Biology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia;

660022, Krasnoyarsk, P. Dzelezniaka str, 3Г. Scientific Research Institute of medical problems of the North. Phone/fax: +7 905971-3715; E-mail: aasavchenko@yandex.ru;

**Borisov A. G.**, PhD, leading researcher, laboratory of the Cellular Molecular Physiology and Pathology of the Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

**Kudryavtsev I. V.**, PhD (Biology), senior research associate, department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; St. Petersburg, Russia.



## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫМИ ИНФЕКЦИОННО-СЕПТИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ

© 2019 г. И. В. Образцов<sup>1,2\*</sup>, А. Ю. Рябов<sup>3</sup>, Н. С. Цуранова<sup>4</sup>,  
Е. В. Балыкова<sup>4</sup>, А. И. Парамонов<sup>4</sup>

\*E-mail: igor\_obraztsov@bk.ru

<sup>1</sup>ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Компания «Онкогенотест», Москва, Россия;

<sup>3</sup>Университет Людвига-Максимилиана, Мюнхен, Германия;

<sup>4</sup>ФГБУ ГНЦК им. А. Н. Рыжих МЗ РФ, Москва, Россия

Поступила: 04.07.2019. Принята: 25.08.2019

Дисфункция нейтрофилов ассоциирована с разнообразными инфекционными процессами, в частности, с сепсисом и другими послеоперационными осложнениями бактериальной природы. Количественная оценка функциональной активности нейтрофилов является перспективным направлением ранней диагностики инфекционно-септических осложнений в клинической практике. Целью работы стало исследование взаимосвязи функциональных показателей нейтрофилов (экспрессия CD64 и окислительный метаболизм) и стандартных клинико-лабораторных маркеров воспаления у пациентов, перенёвших операции на толстой кишке. Обследовано 49 пациентов оперированных по поводу колоректального рака III – IV стадии; оценивали уровень лактата, С-реактивного белка, баллы шкалы sepsis-related organ failure assessment (SOFA) и выполняли бактериологическое исследование. Экспрессию CD64 определяли методом проточной цитометрии; окислительный метаболизм исследовали с помощью хемилюминесцентного (ХЛ) анализа с двустадийной активацией с последующей автоматической деконволюцией сигнала. Показано, что развитие осложнений сопровождается повышением экспрессии CD64, а также увеличением светосуммы люминол-зависимой внутриклеточной ХЛ и снижением интенсивности люцигенин-зависимой внутриклеточной ХЛ. Прогрессия полиорганной недостаточности, вызванная септическим процессом, также ассоциирована с увеличением уровня экспрессии CD64 нейтрофилами, причём выявлена сильная значимая корреляция между уровнем лактата и экспрессией CD64. Прогностический индекс люминол-зависимой ХЛ достоверно увеличивается лишь при критической органной дисфункции; в то время как CD64 характеризует в большей мере нарастание полиорганной недостаточности.

**Ключевые слова:** сепсис, воспалительные послеоперационные осложнения, нейтрофилы, CD64, хемилюминесценция, люминол, люцигенин, биомаркеры

DOI: 10.31857/S102872210007042-1

Адрес: Москва, Шмитовский пр., 29, ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ, Образцов Игорь Владимирович. Тел. +7 (499) 199-39-01. E-mail: igor\_obraztsov@bk.ru

Авторы:

**Образцов И. В.**, к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ, Москва, Россия; Компания «Онкогенотест», Москва, Россия;

**Рябов А. Ю.**, научный сотрудник, Университет Людвига-Максимилиана, Мюнхен, Германия;

**Цуранова Н. С.**, врач анестезиолог-реаниматолог, ФГБУ ГНЦК им. А. Н. Рыжих МЗ РФ, Москва, Россия;

**Балыкова Е. В.**, врач анестезиолог-реаниматолог, ФГБУ ГНЦК им. А. Н. Рыжих МЗ РФ, Москва, Россия;

**Парамонов А. И.**, врач анестезиолог-реаниматолог, ФГБУ ГНЦК им. А. Н. Рыжих МЗ РФ, Москва, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно современному определению, сепсис представляет собой жизнеугрожающую органную недостаточность, вызванную дисрегуляцией иммунного ответа на инфекцию [1]. Тенденция к генерализации инфекции у больных, перенесших оперативные вмешательства на кишке, реализуется за счёт комплексного влияния на иммунную систему транслоцирующейся микрофлоры и продуктов распада. Массовое появление молекулярных паттернов, ассоциированных с патогенами или тканевым повреж-

дением (PAMP, pathogen associated molecular pattern и DAMP, danger associated molecular pattern) приводит к запуску провоспалительного ответа, сопровождающегося интенсивной секрецией активирующих факторов: цитокинов, хемокинов, обеспечивающих миграцию клеток в очаг повреждения. Формирование провоспалительного цитокинового окружения вместе с молекулами, ассоциированными с тканевым повреждением, и антигенами микроорганизмов приводит к активации систем врождённой защиты, основным клеточным эффектором которой является нейтрофил [2].

Нейтрофилы представляют собой наиболее часто встречающуюся популяцию лейкоцитов взрослого человека. В среднем в циркуляции содержится  $3,2 \times 10^8$  нейтрофилов на 1 кг веса, время пребывания нейтрофила в кровотоке в норме составляет около 6 часов. Под воздействием факторов хемотаксиса нейтрофил способен покинуть сосудистое русло и мигрировать в очаг воспаления. В очаге нейтрофилы выполняют свои эффекторные функции: поглощение микроорганизмов, наработку активных форм кислорода (АФК), секреторную дегрануляцию, выделение цитокинов, а также формирование внеклеточных хроматиновых сетей [3, 4].

Развитие сепсиса и полиорганной недостаточности связано с нарастанием тканевого повреждения, привлечением в очаг и активацией всё большего количества нейтрофилов, интенсификацией и дальнейшим истощением гранулоцитопоза, приводящим к формированию иммунодефицита. Следует также отметить активацию противовоспалительных систем врождённого и адаптивного ответа, выражающуюся в увеличении уровня противовоспалительных цитокинов, а также в появлении супрессорных клеток, таких как Т-регуляторные клетки [5] и миелоидные клетки-супрессоры (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) [6]. Гранулоцитарные MDSC, образующиеся из предшественников нейтрофилов, а также незрелые нейтрофилы обладают пониженной функциональной активностью и выраженным иммуносупрессивным потенциалом, реализация которого вызывает иммунную дисрегуляцию, характерную для сепсиса [7]. Развитие иммунодефицита, прогрессия инфекционного процесса и накапливающееся тканевое повреждение способны запустить необратимую органную недостаточность, которая, в конце концов, может стать причиной гибели пациента с сепсисом.

Поскольку нейтрофил играет ключевую роль в запуске ответа на инфекцию и в патогенезе сепсиса, оценка функциональных характеристик нейтрофилов может стать ценным подспорьем для врача, имеющего дело с инфекционно-септическими осложнениями в ежедневной практике. На сегодняшний день основным биомаркером сепсиса, основанным на характеристике нейтрофилов, является поверхностная экспрессия Fc-γ-рецептора I типа (CD64). Повышение экспрессии CD64 нейтрофилами показано при септических состояниях самого различного генеза; однако массовое применение этого биомаркера затруднено из-за сложности стандартизации, которые в значительной мере затрудняют интерпретацию результатов исследования, а также проведение мультицентровых исследований [8–10]. В связи с этим целесообразен поиск и разработка недорогих, простых и надёжных методов оценки функциональной активности нейтрофилов, пригодных для массового использования в учреждениях здравоохранения [11]. К таким методам можно отнести хемилюминесцентный (ХЛ) анализ активности нейтрофилов, который не требует применения дорогостоящих препаратов антител, легко стандартизуется и не зависит от субъективного фактора работы оператора.

**Целью** предлагаемой работы стала разработка показателей ХЛ анализа с двустадийной активацией нейтрофилов для диагностики инфекционно-септических послеоперационных осложнений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали в динамике нейтрофилы гепаринизированной периферической цельной крови, полученные от 49 пациентов, перенесших абдоминальные вмешательства по поводу колоректального рака. Критериями включения стали: возраст старше 18 лет, радикальные операции по поводу рака ниже- и среднеампулярного отделов прямой кишки, симультанные операции по поводу рецидива или первичного рака с отдалёнными метастазами (резекция трёх и более органов). Включено 49 пациентов колоректальным раком III–IV стадии в возрасте 34–83 лет, (среднее  $57 \pm 3$  года). Клинико-лабораторная оценка выполнялась в следующих контрольных точках: день 0 (перед операцией), 1, 2, 3, 5, 7, затем трижды в неделю до выписки. Послеоперационные осложнения возникли у 17 (34,7%) из 49 пациентов: абсцесс в области ре-

зицированной печени у 5, реактивный плеврит у 1, флегмона передней брюшной стенки у 2, перитонит у 7, парез ЖКТ у 2. Диагноз сепсиса установлен в 14 наблюдениях, 7 из которых имели бактериологическое подтверждение бактериемии. У 2 пациентов из гемокультуры была изолирована *Escherichia coli*, в остальных случаях выделялись *Staphylococcus auricularis*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*. У 2 пациентов бактериемия была ассоциирована с микс-инфекцией, в одном случае изолировалась пара *K. pneumoniae* и *S. aureus*, в другом — *A. baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. Все выделенные из крови штаммы микроорганизмов характеризовались высоким уровнем резистентности к широкому спектру antimicrobных препаратов. Грамнегативные бактерии (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*) продуцировали карбапенемазы.

Оценивали и сравнивали динамику конвенциональных клиничко-лабораторных маркеров — лактат, СРБ, шкала sepsis-related organ failure assessment (SOFA), экспрессии CD64 нейтрофилами методом проточной цитометрии, а также показателей окислительного метаболизма нейтрофилов. Проточную цитометрию выполняли на приборе FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием анти-CD64-FITC антител (BD, США). Окислительный метаболизм оценивали методом хемилюминесцентного анализа с двухстадийной активацией [12–14]. Образцы цель-

ной крови разводили средой DMEM (ПанЭко, Россия), стабилизированной 25 мМ HEPES (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:21 и инкубировали с форбол-миристат-ацетатом (ФМА, Sigma) в конечной концентрации 50 нг/мл при 37 °С для достижения эффекта праймирования. ХЛ анализ включал регистрацию ответа нейтрофилов после процедуры прайминга на внесение 10 мкМ N-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (ФМЛФ, Sigma); в качестве ХЛ-зонда использован 45 мкМ люминол или люцигенин (Sigma), для детекции первичных и вторичных АФК, соответственно. Для тонкого анализа кинетики наработки АФК фагоцитами в среде LabView (National Instruments, США) было разработано программное обеспечение, позволяющее выполнять деконволюцию ХЛ-грамм объективным не зависящим от оператора способом. Процедура деконволюции позволяет отдельно анализировать параметры кинетических компонент результирующего ХЛ-ответа.

ХЛ-граммы моделировали автоматически с помощью линейной комбинации квадратично-экспоненциальных функций, каждая из которых описывала соответствующую фазу синтеза АФК в ответ на стимуляцию (рис. 1).

Сравнивали расчётные относительные кинетические показатели: интенсивности  $I = P_1/P_3$  и светосуммы  $S = \int f(t)dt$ , а также максимальную абсолютную интенсивность ХЛ-сигнала. Относительная интенсивность характеризует темп

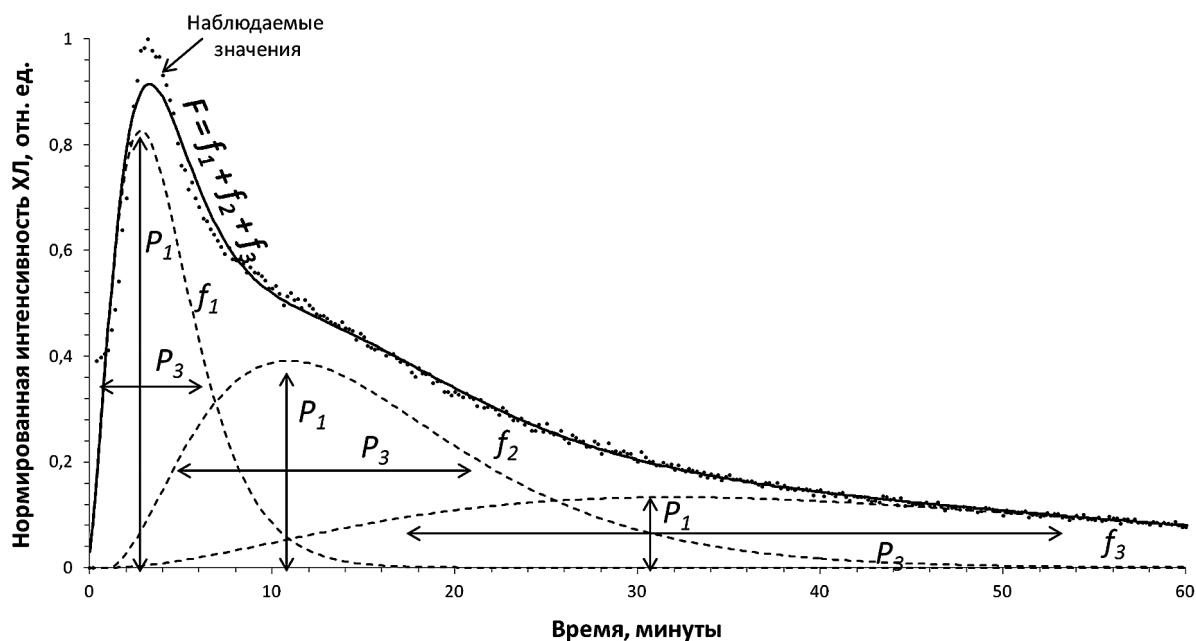
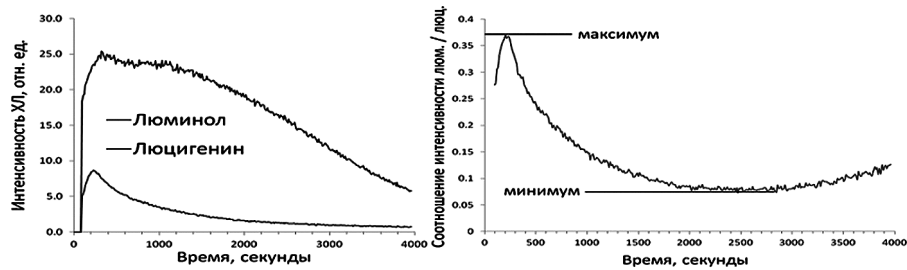
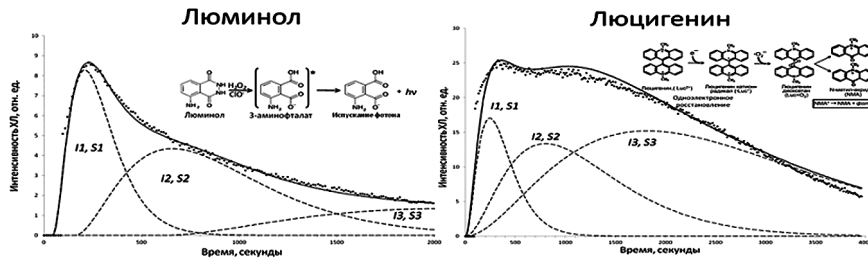


Рис. 1. Кинетический анализ ХЛ-грамм



Запись ХЛ-грамм, оценка соотношения интенсивности ХЛ



Деконволюция ХЛ-грамм, оценка расчётных показателей

Рис. 2. Схема анализа функциональной активности фагоцитов

развития данной кинетической компоненты; относительная светосумма – общее количество АФК, нарабатанных в процессе развития кинетической компоненты. Оценивали светосуммы и интенсивности кинетических компонент люминол- и люцигенин-зависимого ответа, а также определяли минимальное и максимальное значение соотношения абсолютных интенсивностей люминол- и люцигенин-зависимой ХЛ. Методология анализа представлена на рис. 2.

Статистическая обработка выполнена в пакете SPSS21 (IBM, США). Построены описатель-

ные статистики (средние величины, медианы, доверительные интервалы методом z-оценок, коэффициенты вариации); сравнение средних величин проведено на основании t-критерия Стьюдента после предварительной трансформации Бокса-Кокса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика показателей поверхностного фенотипа нейтрофилов у всех пациентов представлена на рис. 3. В раннем послеоперацион-

Таблица 1. Параметры функциональной активности фагоцитов при наличии или отсутствии гнойно-септических осложнений

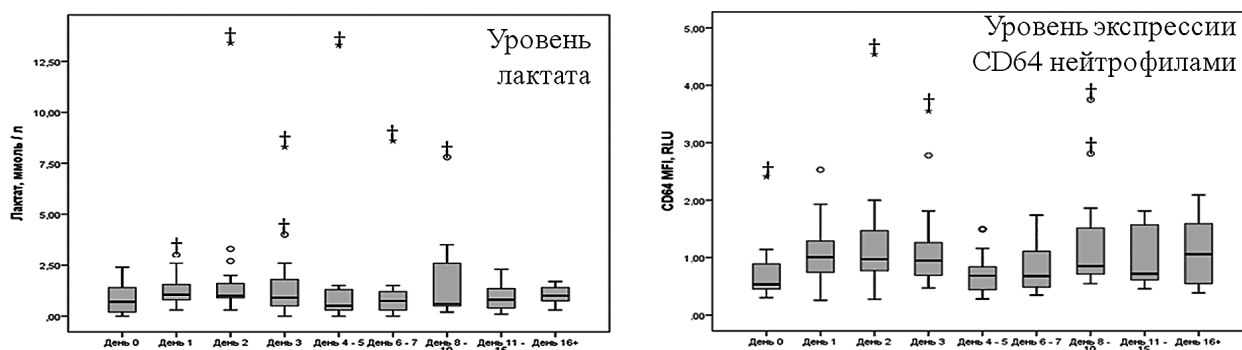
Параметр	Нет осложнений (n = 32)			Есть осложнения (n = 17)		
	Среднее	Медиана	Интерквартир. размах	Среднее	Медиана	Интерквартир. размах
Лактат, моль/л	0,67	0,6	0,7	2,88	1,6	1,8
СРБ, мг/л	68,7	54,1	66,9	129,6	135,2	97,8
CD64, ед. фл.	0,82	0,8	0,357	1,65	1,49	1,321
Светосумма внутриклет. люминол-зависимой ХЛ $S_{\text{вн}} = S_2 + S_3$ , В	72,9	70,2	22,5	98,5	95,6	54,8
Интенсивность быстрой компоненты внутриклет. люцигенин-зависимой ХЛ $I_2$ (люц.), ед. люм. · 10 <sup>-3</sup>	6,4	6,4	5,9	5,7	5,5	5,1
Минимум люм. / люц. соотношения, %	11,4	9,5	9,5	17,3	14,1	21,6

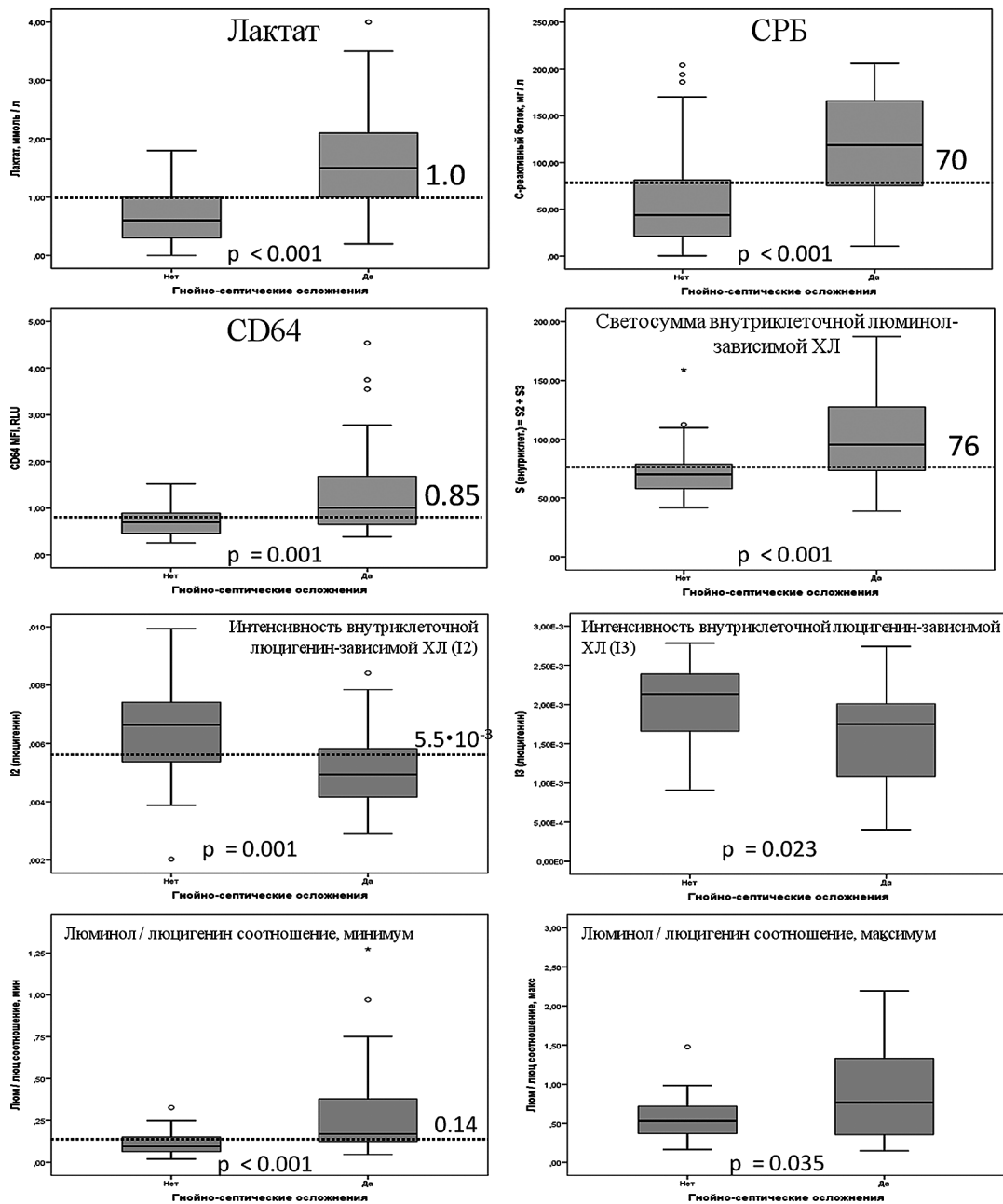
**Таблица 2.** Пороговые значения параметров функциональной активности фагоцитов, чувствительность и специфичность

Параметр	Значение	Чувствительность	Специфичность
CD64, ед. фл.	< 0.85	62%	52%
Светосумма внутриклет. люминол-зависимой ХЛ $S_{\text{вн}} = S_2 + S_3, \text{ В}$	< 76	70%	58%
Интенсивность быстрой компоненты внутриклет. люцигенин-зависимой ХЛ $I_2$ (люц.), ед. люм. · 10 <sup>-3</sup>	> 5.5	70%	47%
Минимум люм. / люц. соотношения, %	< 14	55%	62%

ном периоде (1–2 сутки после вмешательства) наблюдается увеличение уровня экспрессии CD64 нейтрофилами ( $p < 0,05$ ), до 4–5 суток наблюдается снижение уровня экспрессии CD64 нейтрофилами, затем – повторное повышение. Выделяющиеся и экстремальные значения показателей лактата и CD64 получены у 6 пациентов, умерших от полиорганной недостаточности из-за инфекционно-воспалительных осложнений в течение первых двух недель пребывания в стационаре (рис. 3). Пять из этих пациентов характеризовались подтвержденной бактериемией, вызванной *E. coli* (1 случай), *A. baumannii* (2 случая), *K. pneumoniae* в сочетании с *S. aureus* (1 случай) и *Staphylococcus hominis* (1 случай). У 5 пациентов имелись инфекционные очаги в брюшной полости, ассоциированные с моно-инфекцией (2 случая) *Morganella morganii* и *K. pneumoniae*, а также с микст-инфекцией (3 случая): *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. penerii*; *Pseudomonas oryzihabitans* и *S. hominis*; *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *S. aureus*. Все выделенные микроорганизмы кроме *P. oryzihabitans* и *S. hominis* были полирезистентными к антибактериальным препаратам.

Сопоставили значение лабораторных параметров в группах наблюдений, полученных во всех контрольных точках у пациентов с наличием ( $n = 17$ ) или отсутствием ( $n = 32$ ) гнойно-септических осложнений. Показано достоверное увеличение уровня лактата, СРБ и светосуммы внутриклеточной люминол-зависимой ХЛ  $S = S_2 + S_3$  ( $p < 0,001$ ), а также уровня экспрессии CD64 нейтрофилами ( $p = 0,001$ ). Кроме того, у пациентов с осложнениями наблюдается снижение интенсивности быстрой ( $p = 0,001$ ) и медленной ( $p = 0,023$ ) компонент внутриклеточного люцигенин-зависимого ответа ( $I_2$  и  $I_3$ ). Определено увеличение минимального значения соотношения абсолютных интенсивностей люминол- и люцигенин-зависимого ХЛ-ответа у больных с осложнениями. Описательные статистики распределений показателей представлены в табл. 1. На основании полученных данных построены пороговые значения показателей функциональной активности фагоцитов, нарушение которых позволяет предположить риск развития гнойно-септических осложнений; проведена оценка чувствительности и специфичности предлагаемых параметров (табл. 2, рис. 4).

**Рис. 3.** Динамика показателей у всех обследованных пациентов. Отмечены наблюдения, полученные от пациентов с летальным исходом. Обозначения: горизонтальная линия – медиана, ящик – 1-й и 3-й квартили, усы – 95% доверительный интервал ( $p = 0,05$ ), круги – экстремальные значения, звёздочки – выбросы



**Рис. 4.** Показатели функциональной активности фагоцитов при наличии или отсутствии гнойно-септических осложнений

Оценка исследуемых диагностических показателей при различной степени органной дисфункции выявила, что увеличение значения шкалы SOFA ассоциировано с нарастанием лактата, СРБ, экспрессии CD64 и прогностического индекса люминол-зависимой ХЛ  $S = I_2/I_3$ . Выявлена сильная корреляция между содержанием лактата и уровнем экспрессии CD64 (коэффициент корреляции Пирсона  $\eta = 0,708$ ,  $p = 0,002$ ).

Содержание СРБ достоверно ( $p = 0,006$ ) увеличено только в группе критической органной дисфункции ( $SOFA > 8$ ) по сравнению с группой без дисфункции ( $SOFA = 0$ ), в то время как прогностический индекс люминол-зависимой ХЛ не различается в группах с отсутствием, слабо выраженной и тяжёлой полиорганной недостаточностью, но достоверно ( $p = 0,025$ ) возрастает при критической дисфункции (**рис. 5**).

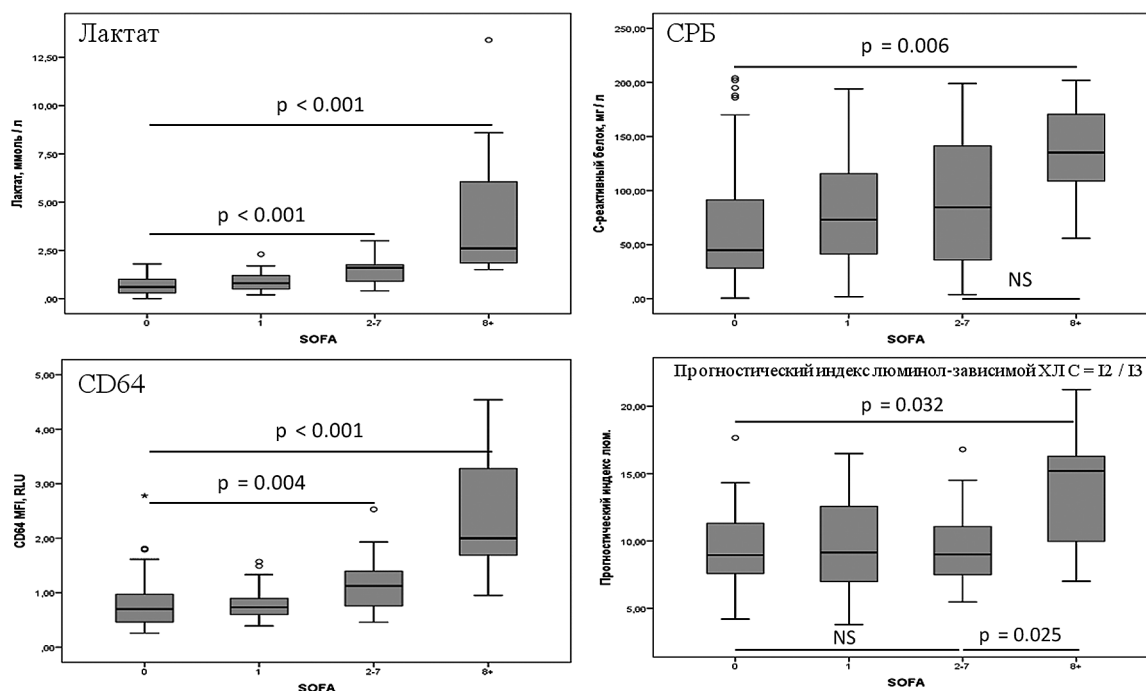


Рис. 5. Показатели функциональной активности фагоцитов при различной выраженности полиорганной недостаточности

## ОБСУЖДЕНИЕ

У всех пациентов, перенесших вмешательство по поводу первичного или метастатического колоректального рака, наблюдается повышение показателей лактата и экспрессии CD64 в первые двое суток после операции. Это повышение представляет собой ответ на операционную травму, который при благоприятном течении послеоперационного периода разрешается к 4–5 дню после вмешательства. Дальнейшее повышение показателей в динамике происходит лишь у пациентов с развившимися инфекционно-септическими осложнениями. При этом подъём уровня лактата выше 2 ммоль/л и уровня экспрессии CD64 нейтрофилами выше 2 единиц флуоресценции следует отнести к крайне неблагоприятным признакам, поскольку выделяющиеся наблюдения, характеризующиеся такими значениями, были получены от пациентов с летальным исходом. Таким образом, указанное увеличение содержания и уровня экспрессии CD64 нейтрофилами свидетельствует о высоком риске развития бактериемии, ассоциированной с полирезистентными штаммами бактерий.

Развитие осложнений ассоциировано с подъёмом содержания лактата и СРБ, что согласо-

ется с литературными данными по сывороточным биомаркерам инфекционно-септических осложнений. Нейтрофилы при этом характеризуются повышением экспрессии CD64, а также увеличением светосуммы люминол-зависимой внутриклеточной ХЛ и снижением интенсивности люцигенин-зависимой внутриклеточной ХЛ. Поскольку люцигенин способен детектировать супероксид-радикал, а люминол – его метаболиты (перекись водорода и гипохлорит-анион), полученные данные свидетельствуют о повышении общей внутриклеточной продукции вторичных АФК. Снижение интенсивности внутриклеточного люцигенин-зависимого ответа может свидетельствовать, как о снижении внутриклеточной продукции супероксид-радикала, так и об интенсификации его превращения во вторичные цитотоксические кислородные метаболиты. При этом показанное в работе увеличение минимального значения соотношения абсолютных интенсивностей люминол- и люцигенин-зависимого ХЛ-ответа свидетельствует в пользу второй гипотезы. Показатели интенсивности внутриклеточной люцигенин-зависимой ХЛ и светосуммы внутриклеточной люминол-зависимой ХЛ в нашем исследовании характеризуются большей чувствительностью, а ми-

нимальное значение соотношения абсолютных интенсивностей люминол- и люцигенин-зависимого ХЛ-ответа – большей специфичностью по сравнению с конвенциональным маркером CD64. Одновременное использование трёх предлагаемых показателей ХЛ анализа может стать альтернативой цитометрической оценки функциональной активности нейтрофилов для ранней диагностики сепсиса и гнойно-инфекционных осложнений.

Прогрессия полиорганной недостаточности, вызванная септическим процессом, ассоциирована с подъёмом содержания лактата и СРБ, а также увеличением уровня экспрессии CD64 нейтрофилами. При этом уровень СРБ, так же, как и прогностический индекс люминол-зависимой ХЛ, достоверно увеличивается лишь при критической органной дисфункции; в то время как возрастание уровня лактата и уровня экспрессии CD64 происходит на более ранних этапах полиорганной недостаточности. Сильная корреляция между уровнем лактата и экспрессией CD64 нейтрофилами говорит о возможной взаимозаменяемости указанных биомаркеров, однако этот вопрос подлежит дальнейшему изучению.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Singer M., Deutschman C. S., Seymour C. W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G. R., Chiche J. D., Coopersmith C. M., Hotchkiss R. S., Levy M. M., Marshall J. C., Martin G. S., Opal S. M., Rubenfeld G. D., van der Poll T., Vincent J. L., Angus D. C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016, 23, 315(8), 801–10.
2. Wiersinga W. J., Leopold S. J., Cranendonk D. R., van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 2014, 1, 5(1), 36–44.
3. Scapini P., Cassatella M. A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* 2014, 31, 124(5), 710–9. doi: 10.1182/blood-2014-03-453217. Epub 2014 Jun 12.
4. Tecchio C., Cassatella M. A. Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin Immunol.* 2016, 28(2), 119–28.
5. Chen L., Lu Y., Zhao L., Hu L., Qiu Q., Zhang Z., Li M., Hong G., Wu B., Zhao G., Lu Z. Curcumin attenuates sepsis-induced acute organ dysfunction by preventing inflammation and enhancing the suppressive function of Tregs. *Int Immunopharmacol.* 2018, 17, 61, 1–7.
6. Janols H., Bergenfelz C., Allaoui R., Larsson A. M., Rydén L., Björnsson S., Janciauskiene S., Wullt M., Bredberg A., Leandersson K. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol.* 2014, 96(5), 685–93. doi: 10.1189/jlb.5HI0214-074R. Epub 2014 Jun 13.
7. Zhou J., Nefedova Y., Lei A., Gabrilovich D. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Semin Immunol.* 2018, 35, 19–28.
8. Tang Z., Qin D., Tao M., Lv K., Chen S., Zhu X., Li X., Chen T., Zhang M., Zhong M., Yang H., Xu Y., Mao S. Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Sci Rep.* 2018, 3, 8(1), 9994.
9. Dal Ponte S. T., Alegretti A. P., Pilger D. A., Rezende G. P., Andrioli G., Ludwig H. C., Diogo L., Goldani L. Z., Loreto M., Machado P. S., Seligman R. Diagnostic Accuracy of CD64 for Sepsis in Emergency Department. *J Glob Infect Dis.* 2018, 10(2), 42–46.
10. Dimitrov E., Enchev E., Halacheva K., Minkov G., Yovichev Y. Neutrophil CD64 – A potential biomarker in patients with complicated intra-abdominal infections? – A literature review. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2018, 23, 1–10.
11. Ачкасов С. И., Суroveгин Е. С., Сушков О. И., Лукашевич И. В., Савушкин А. В. Результаты внедрения программы ускоренного выздоровления в колопроктологии. *Колопроктология* 2018, 64, 2, 32–38. [Achkasov S. I., Surovegina E. S., Sushkov O. I., Lukashovich I. V., Savushkin A. V. Results of the implementation of the accelerated recovery program in coloproctology. *Coloproctology* 2018, 64(2), 32–38.]
12. Проскурнина Е. В., Дудина Г. А., Созарукова М. М., Орлова Л. Р., Филиппова Ю. А., Шестакова М. А., Пивник А. В. Радикал-продуцирующая функция нейтрофилов при миелодиспластическом синдроме: оценка методом кинетической хемилюминесценции с двухстадийной стимуляцией и клиническое значение. *Технологии живых систем* 2018, 15, 2, 16–21. [Proskurnina E. V., Dudina G. A., Sozarukova M. M., Orlova L. R., Philippova Yu. A., Shestakova M. A., Pivnik A. V. Radical-producing function of neutrophils in myelodysplastic syndrome: evaluation by kinetic chemiluminescence with two-stage stimulation and clinical significance. *Technologies of living systems* 2018, 15(2), 16–21.]
13. Покаленьева М. Ш., Нестерова А. М., Соснова Е. А., Белевич С. Б., Проскурнина Е. В. Радикал-продуцирующая функция нейтрофилов при привычном невынашивании беременности: применение метода активированной хемилюминесценции с двойной стимуляцией. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии* 2017, 16, 5, 82–88. [Pokalenieva M. Sh., Nesterova A. M., Sosnova E. A., Bolevich S. B., Proskurnina E. V. Radical-producing function of neutrophils in habitual miscarriage: application of the activated chemiluminescence with two-stage stimulation method. *Questions of gynecology, obstetrics and perinatology* 2017, 16(5), 82–88].
14. Шеримова А. Е., Созарукова М. М., Краснова Т. Н., Проскурнина Е. В., Новиков П. И., Мухин Н. А. Радикал-продуцирующая функция нейтрофилов у пациентов с анца-ассоциированными васкули-



тами Клиническая фармакология и терапия 2017, 26, 5, 37–40. [Sherimova A. E., Sozarukova M. M., Krasnova T. N., Proskurnina E. V., Novikov P. I., Mukh-

in N. A. Radical-producing function of neutrophils in patients with ANCA-associated vasculitis. Clinical pharmacology and therapy 2017, 26(5), 37–40].

## NEUTROPHIL FUNCTION IN PATIENTS WITH POSTSURGERY INFECTIOUS SEPTIC COMPLICATIONS

© 2019 I. V. Obraztsov<sup>1,2\*</sup>, A. Yu. Ryabov<sup>3</sup>, N. S. Tsuranova<sup>4</sup>,  
E. V. Balykova<sup>4</sup>, A. I. Paramonov<sup>4</sup>

\*E-mail: igor\_obraztsov@bk.ru

<sup>1</sup>G. N. Speranskiy City Children Hospital, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Oncogenotest company, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Ludwig-Maximilian University, Munich, Germany;

<sup>4</sup>A. N. Ryzhikh State Scientific Centre for Coloproctology, Moscow, Russia

Received: 04.07.2019. Accepted: 25.08.2019

Dysfunction of the neutrophils is associated with various infectious processes, particularly, with sepsis and other postsurgical bacterial complications. Quantitative evaluation of the neutrophil function is a promising approach for early diagnosis of infectious and septic complications in clinical practice. The aim of this study was to assess the relationship between functional parameters of neutrophils (CD64 expression and oxidative metabolism) and standard clinical and laboratory markers of inflammation in patients who underwent large intestine resections. We assessed 49 patients with III – IV stage colorectal cancers; we evaluated lactate and C-reactive protein levels, assessed sepsis-related organ failure assessment (SOFA) score and performed bacteriological investigation. CD64 expression was determined by means of flow cytometry; oxidative metabolism was studied by means of chemiluminescent (CL) analysis with double-step activation followed by automatic signal deconvolution. We revealed association between complications and the increase of CD64 expression, as well as increase of luminol-dependent intracellular CL light sum and decrease of the lucigenin-dependent intracellular CL intensity. The progression of sepsis-associated multiple organ failure is also associated with increase of CD64 expression; strong significant correlation between the lactate level and CD64 expression has been shown. The prognostic index of luminol-dependent CL significantly increases only in critical organ dysfunction, while CD64 is more sensitive to multi-organ failure progression.

*Key words:* sepsis, inflammatory post-surgery complications, neutrophils, CD64, chemiluminescence, luminol, lucigenin, biomarkers

### Authors:

**Obraztsov I. V.**, ✉ PhD, allergy and immunity physician, G. N. Speranskiy City Children Hospital, Moscow, Russia; Oncogenotest company, Moscow, Russia. **E-mail:** igor\_obraztsov@bk.ru;

**Ryabov A. Yu.**, researcher, Ludwig-Maximilian University, Munich, Germany;

**Tsuranova N. S.**, a physician anesthesiologist-resuscitator, A. N. Ryzhikh State Scientific Centre for Coloproctology, Moscow, Russia;

**Balykova E. V.**, a physician anesthesiologist-resuscitator, A. N. Ryzhikh State Scientific Centre for Coloproctology, Moscow, Russia;

**Paramonov A. I.**, a physician anesthesiologist-resuscitator, A. N. Ryzhikh State Scientific Centre for Coloproctology, Moscow, Russia.

## ОПЫТ ПРОВЕДЕНИЯ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТИТЕЛ КЛАССА G К ВИРУСУ КОРИ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ КОНТРОЛЬНОГО ПРЕПАРАТА

© 2019 г. М. А. Смердова<sup>1,2</sup>, Т. А. Мамаева<sup>1</sup>, М. А. Наумова<sup>1</sup>,  
К. А. Корецкий<sup>2</sup>, Д. С. Иванов<sup>2</sup>, А. П. Топтыгина<sup>1\*</sup>

\*E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

<sup>1</sup>ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии  
им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ЗАО «Вектор-Бест-Европа», Москва, Россия

Поступила: 25.06.2019. Принята: 25.08.2019

Корь – высоко контагиозное инфекционное заболевание, чреватое тяжелыми осложнениями вплоть до смертельных исходов. Принятая ВОЗ программа элиминации кори дала ощутимые плоды, однако корь все еще не побеждена. На этапе элиминации кори особенно актуальными становятся меры по повышению достоверности результатов и качества лабораторных исследований антител к вирусу кори. Целью данных исследований явилась валидация препарата «ВЛК Корь-IgG» для определения коревых антител класса G в сыворотке крови иммуноферментным методом и отработка параметров учета для качественного и количественного вариантов проведения исследований. Материалом исследования являлись коммерческие наборы реагентов для определения концентрации антител к вирусу кори «ВектоКорь-IgG» (ЗАО Вектор-Бест, Новосибирск, Россия), с помощью которых определяли концентрацию искомого анализа в сыворотках крови 654 случайно выбранных условно здоровых жителей г. Москвы и Московской области в возрасте от 0 до 60 лет. При проведении внутрилабораторного контроля качества для оценки внутри- и межсерийной сходимости анализа использовали «ВЛК Корь-IgG» (лиофильно высушенный препарат, содержащий IgG к вирусу кори). Показано, что аттестованный на базе референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского» образец «ВЛК Корь-IgG» пригоден для внутрилабораторного контроля качества при определении коревых IgG в сыворотке крови с использованием наборов «ВектоКорь-IgG» качественным (ОП о.е.) и количественным (МЕ/мл) способом. Установлено, что при оценке сходимости и воспроизводимости результатов «ВЛК Корь-IgG» значения CV не должны превышать 8% и 19% соответственно, а показатели ОП (о.е.) и МЕ/мл рабочих растворов «ВЛК Корь-IgG» (цельный или разведенный 1:2) не должны находиться в зоне значений (точек) тестовых калибровочных образцов.

**Ключевые слова:** корь, внутрилабораторный контроль качества, иммуноферментный метод, антитела, сходимость, воспроизводимость

DOI: 10.31857/S102872210007043-2

**Адрес:** 125212 Москва, ул. Адм. Макарова, д. 10, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, лаборатория цитокинов, Топтыгина Анна Павловна. Тел.: +7(495) 452-18-01 факс: +7(495) 452-18-30, 8916 389 66 05 (моб.). E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

### Авторы:

**Смердова М. А.**, аспирант лаборатории цитокинов ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия, ведущий специалист по продукции ЗАО «Вектор-Бест-Европа», Москва, Россия;

**Мамаева Т. А.**, к.б.н, ведущий научный сотрудник лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Наумова М. А.**, к.м.н, старший научный сотрудник лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Корецкий К. А.**, старший менеджер по продукции ЗАО «Вектор-Бест-Европа», Москва, Россия;

**Иванов Д. С.**, к.б.н, специалист по продукции ЗАО «Вектор-Бест-Европа», Москва, Россия;

**Топтыгина А. П.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры иммунологии Биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Корь — высоко контагиозное заболевание, широко распространенное в разных возрастных группах [1]. В нашей стране принята Программа «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации» 2016–2020 гг.» [2], основанная на стратегическом плане Всемирной Организации здравоохранения по глобальной ликвидации кори и краснухи на 2011–2020 гг. Целью Программы является достижение заболеваемости корью на уровне единичных случаев на территории Российской Федерации. В свете реализации данной программы особенно актуальны меры по повышению достоверности результатов и качества лабораторных исследований на наличие антител к вирусу кори как скрининговых, для выявления не иммунной прослойки населения и прогнозирования заболеваемости, так и с целью оценки эффективности вакцинации.

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) основан на высокой избирательности и специфичности иммунологической реакции антиген-антитело. Но, несмотря на его простоту исполнения, в основе иммуноферментного анализа лежат сложные биологические и физико-химические процессы, влияющие на характер полученных данных. Для полноценного осуществления всей программы по контролю качества необходимо строго выполнять предписания приказов Минздрава России от 07.02.2000 № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» и от 26.05.2003 № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» (ОСТ91500.13.0001-2003)» [3, 4, 5]. Согласно этим приказам в клиничко-диагностических лабораториях при проведении каждой серии лабораторных исследований необходимо выполнять контрольные измерения ежедневно, отображать их результаты на контрольных картах и на основании полученных данных принимать решение о возможности выдачи результатов данной аналитической серии лечащим врачам.

У проблемы качества лабораторных анализов есть и формально юридический аспект — в случае врачебной ошибки, или даже подозрения на такую ошибку, достоверность лабораторных данных, является одним из определяющих моментов, на основе которых принимается реше-

ние. В ряде документов регламентируется порядок проведения внутрилабораторного контроля качества (ВКК) для количественных и неколичественных исследований [3, 4, 5, 6]. Однако в этих документах отсутствуют методические подходы по оценке качества лабораторных тестов количественного определения антител класса IgG не только к вирусу кори, но и к другим вирусам и бактериям.

На первый взгляд нет необходимости в проведении контроля качества с использованием внутрилабораторного контроля (ВЛК) для количественного определения IgG к вирусу кори, так как в наборе имеется контрольный образец (КО) с известной концентрацией. Кроме того, для каждого планшета каждой аналитической серии, обязательно строится калибровочная кривая, согласно которой проводится учет результатов. Тем не менее, следует учитывать, что эти критерии не контролируют стадию разведения исследуемых образцов и межсерийные различия наборов, так как калибровочные образцы и КО в наборах используются неразведенными т.е. готовыми к использованию.

В связи с вышеизложенным, целью данных исследований явилась валидация препарата «ВЛК Корь-IgG» для определения коревых антител класса G в сыворотке крови методом ИФА и отработка параметров учета для качественного и количественного вариантов проведения исследований.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования являлись коммерческие наборы реагентов для определения концентрации антител к вирусу кори «ВектоКорь-IgG» (ЗАО Вектор-Бест, Новосибирск, Россия), с помощью которых определяли концентрацию искомого аналита в сыворотках крови пациентов. Для этого на основании оптических плотностей (ОП) калибровочных тестовых образцов, содержащих коревые IgG в концентрации: 0,0; 0,15; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 МЕ/мл, строят калибровочный график зависимости «ОП (о.е.) — концентрация (МЕ/мл)». Основными критериями достоверности получаемых результатов являются:

- соответствие полученной концентрации IgG в тестовом КО диапазону значений, указанному на этикетке флакона КО или в паспорте к набору;
- выполнение следующих условий:  $ОП_0 \leq 0,2$  о.е.;  $ОП_5 \geq 1,0$  о.е., где:  $ОП_0$  и  $ОП_5$  являются средними значениями оптической плотно-

сти в лунках с калибровочными образцами 0 и 5 МЕ/мл соответственно.

С помощью наборов были исследованы сыворотки крови 654 случайно выбранных условно здоровых жителей г. Москвы и Московской области с неизвестным прививочным анамнезом в возрасте от 0 до 60 лет с целью сероэпидемиологического обследования. Исследования проводились на базе референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского». При проведении ВЛК для оценки внутри- и межсерийной сходимости (далее сходимость и воспроизводимость) анализа использовали «ВЛК Корь-IgG» (лиофильно высушенный препарат, содержащий IgG к вирусу кори), аттестованный в референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского» [7].

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с использованием программы Microsoft Excel. Для каждого показателя была подтверждена статистическая гипотеза о нормальности распределения данных по критерию о равенстве дисперсий. Для оценки сходимости и воспроизводимости результатов измерений «ВЛК Корь-IgG», построения контрольных карт использовали параметры вариационной статистики согласно ГОСТ Р 53133.1-4-2008, часть 2 [8, 9]. Для расчета среднего значения  $\bar{X}$  (1), среднеквадратичного отклонения  $S$  (2), коэффициента вариации  $CV$  (3) образцов «ВЛК-корь-IgG», использовали формулы:

$$\bar{X} = (\sum Xi) / n \quad (1)$$

$$S = \sqrt{(\sum (Xi - \bar{X})^2) / (n - 1)} \quad (2)$$

$$CV = s / \bar{X} \times 100\% \quad (3)$$

Где:

$X_i$  – значения измерений ОП (о.е.) или концентрация (МЕ/мл);

$\bar{X}$  – среднее значение ОП (о.е.) или концентрация (МЕ/мл);

$S$  – среднее квадратичное отклонение ОП (о.е.) или концентрация (МЕ/мл);

$CV$  – коэффициент вариации ОП (о.е.) или концентрация (МЕ/мл);

В инструкции к набору указано, что результаты можно оценивать как количественным, так и качественным способом. Так, исследуемый образец сыворотки крови следует считать отрицательным, если его оптическая плотность менее  $0,8 \times ОП_{0,15}$  ( $ОП_{сыв} < 0,8 \times ОП_{0,15}$ ). Исследуемый образец сыворотки крови следует считать положительным, если его оптическая плотность более  $1,2 \times ОП_{0,15}$  ( $ОП_{сыв} \geq 1,2 \times ОП_{0,15}$ ). Исследуемый образец сыворотки крови следует считать неопределенным, если его оптическая плотность более  $0,8 \times ОП_{0,15}$  и менее  $1,2 \times ОП_{0,15}$  ( $0,8 \times ОП_{0,15} \leq ОП_{сыв} < 1,2 \times ОП_{0,15}$ ). В дальнейшей работе с ВЛК, мы использовали два способа учета – качественный (ОП, о.е.) и количественный (МЕ/мл). В связи с тем, что подходы к проведению работы с ВЛК совпадают как для качественного, так и для количественного анализа, в дальнейшем оба варианта рассматривались параллельно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Подбор и определение концентрации ВЛК

Задачей первого этапа работы было изучение возможности использования цельного и разведенного образца «ВЛК Корь-IgG» для проведения количественного и качественного учета результатов ИФА. Для решения этой задачи были приготовлены двукратные разведения ВЛК (цельный-1:8) с использованием сыворотки, не содержащей антитела класса IgG к вирусу кори. Каждое разведение было протестировано в триплетах на двух разных сериях набора «ВектоКорь-IgG» (табл. 1). Следует отметить, что абсолютные величины ОП (о.е.) для тестов

**Таблица 1.** Результаты сравнения оптической плотности и концентрации ВЛК в двух сериях

Показатели	Серия № 88		Серия № 103	
	ОП, о.е.	МЕ/мл	ОП, о.е.	МЕ/мл
ВЛК цельный	1,217	0,81	0,896	0,80
ВЛК 1/2	0,534	0,44	0,312	0,40
ВЛК 1/4	0,177	0,22	0,284	0,38
ВЛК 1/8	0,096	0,14	0,103	0,20
КО*	2,227	1,56 (1,22–2,0)*	1,720	1,32 (1,05–1,71)*

**Примечание:** КО\* – контрольный образец, входящий в состав набора, в скобках указаны пределы концентрации для контрольного образца (паспортные данные).

вых калибраторов и образцов ВЛК: цельного (ВЛК<sub>1</sub>) и разведенного 1:2 (ВЛК<sub>2</sub>) отличались, в то время как, независимо от серий наборов, концентрация (МЕ/мл) ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2</sub> была одинаковой. Для разведений 1:4 и 1:8 наблюдались существенные различия, что, вероятно, связано не только с погрешностями при приготовлении серийных разведений, но и с измерением низких значений ОП меньше 0,2 о.е. На основании полученных данных были построены калибровочные кривые для 2-х разных серий набора реагентов с использованием метода от точки к точке (рис. 1). Показано, что калибровочные графики практически совпадают. Коэффициент корреляции (R<sup>2</sup>) оказался равным 0,669, что говорит о положительной корреляции средней силы (рис. 2). поэтому в дальнейшей работе мы использовали ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2</sub>.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о возможности использования ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2</sub> для качественного (ОП о.е.) и количественного (МЕ/мл) способа учета результатов.

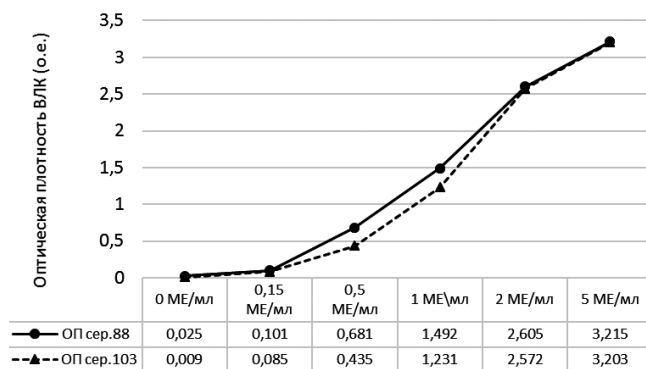


Рис. 1. Калибровочные графики ВЛК для определения концентрации содержания IgG к вирусу кори для двух серий.

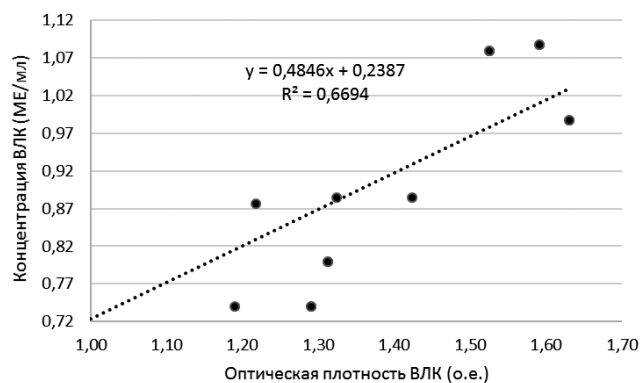


Рис. 2. Корреляция между оптической плотностью и концентрацией при измерении ВЛК<sub>1</sub>.

Определение некоторых параметров вариационной статистики тестовых контролей, ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2</sub>

Как было сказано ранее, особенностью данного набора является то, что тестовые контроли (калибраторы, КО) не подвергаются процедуре разведения т.е. они готовы к использованию, тогда как исследуемые материалы и образцы ВЛК при постановке разводятся 1:100. В связи с этим была сформулирована следующая задача: определить CV как для калибраторов и КО так и для образцов ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2</sub>. Для этого были использованы данные 20 аналитических серий каждого исследуемого материала и рассчитаны их средние значения ОП (о.е.) и CV (табл. 2). Из таблицы следует, что CV для разных калибраторов достоверно отличаются, (p < 0,05). При этом, чем ниже ОП, а значит и концентрация образца, тем выше CV. Интересно, что для калибратора, выполняющего роль cut-off (0,15 МЕ/мл), CV равен 17%, что практически совпадает с указанным производителем значением (+ 20%), так называемой серой зоной (12–18 МЕ/мл). Такой CV в области cut-off, возможно, является одной из причин феномена «мигания образцов», т.е. для образцов с низкой концентрацией аналита при повторных постановках могут получаться разноречивые результаты – как положительные, так и сомнительные и даже отрицательные. Кроме того, на примере ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2</sub> видно, что наличие стадии разведения увеличивает погрешность измерения концентрации (МЕ/мл) – для ВЛК<sub>1</sub> погрешность ОП (о.е.) составила 19,0%, в МЕ/мл – 16,8%, тогда как для ВЛК<sub>2</sub> эти показатели увеличились до 23,5% и 26,7% соответственно. Вероятно, это объясняется как появлением дополнительной стадии разведения, так и смещением ОП (о.е.) в область более низких значений.

При анализе результатов количественного учета установлено, что результаты ВЛК<sub>2</sub>, практически совпали по концентрации (МЕ/мл) с тестовым калибратором 0,5 МЕ/мл, и именно для этой точки получен высокий CV для ВЛК<sub>2</sub>. Вероятно, это связано с тем, что при количественном расчете (МЕ/мл), согласно инструкции производителя, калибровочная кривая строится от точки к точке. Зависимость величины регистрируемого сигнала от содержания аналита при проведении ИФА практически всегда имеет в той или иной степени нелинейный характер, поэтому на каждом участке от точки к точке будет свое уравнение, по которому в автоматическом ре-

**Таблица 2.** Результаты средних значений и коэффициента вариации оптической плотности калибровочных образцов, контрольного образца, входящего в состав набора и ВЛК

	0 МЕ/мл	0,15 МЕ/мл	0,5 МЕ/мл	1 МЕ/мл	2 МЕ/мл	5 МЕ/мл	КО	ВЛК <sub>1</sub> ОП/ (МЕ/мл)	ВЛК <sub>2</sub> ОП/ (МЕ/мл)	ВЛК <sub>2*</sub> ОП/ (МЕ/мл)
ОП сред.	0,025	0,108	0,689	1,492	2,605	3,215	2,12	1,29/0,86	0,534/0,57	0,298/0,420
CV <sub>оп</sub> ,%	30	17	15,4	11,3	5	1,9	12,5	19,0/16,8	23,5/26,7	17,7/10,6

**Примечание:** ВЛК<sub>1</sub> – цельный, ВЛК<sub>2</sub> – разведенный 1:2, ВЛК<sub>2\*</sub> – другая серия разведений 1:2.

**Таблица 3.** Параметры для построения контрольной карты

Показатель	ВЛК <sub>1</sub>		ВЛК <sub>2*</sub>	
	МЕ/мл.	ОП.	МЕ/мл.	ОП.
X ср ВЛК	0,862	1,287	0,398	0,298
Ст. откл(S)	0,145	0,244	0,042	0,053
CV, %	16,78	18,98	10,55	17,68
X+1S	1,007	1,531	0,440	0,351
X-1S	0,718	1,043	0,356	0,245
X+2S	1,152	1,775	0,482	0,403
X-2S	0,573	0,798	0,314	0,193
X+3S	1,296	2,020	0,524	0,456
X-3S	0,428	0,554	0,272	0,140

жиме рассчитывается концентрация (МЕ/мл) антител в образцах крови пациентов. В нашем эксперименте значения 0,418–0,722 МЕ/мл (ср.зн. 0,57 МЕ/мл) образца ВЛК<sub>2</sub> оказались по обе стороны от данных калибровочного образца с концентрацией 0,5 МЕ/мл т.е. попали в зону «точки калибратора». Следовательно, расчет по данным ВЛК<sub>2</sub>, расположенным справа и слева от «точки калибратора» производился по разным уравнениям, что и дало более высокий CV (26,7%) по сравнению с ВЛК<sub>1</sub>, который не попал в зону «точки калибратора», CV которого составил 16,8%. Справедливость заключений о значимости попадания значений ВЛК<sub>2</sub> в зону «точки калибратора» была подтверждена:

– результатами исследования вновь приготовленного разведенного контроля – ВЛК<sub>2\*</sub>, интервал значений которого составил 0,375–0,465 МЕ/мл и был вне зоны «точки калибратора». При этом были показаны лучшие значения CV (10,6%) по МЕ/мл и по ОП CV 17,7% (табл. 2).

– результатами значений ВЛК<sub>1</sub>+2S, которые попали в зону «точки калибратора» 1,0 МЕ/мл,

но согласно нормальному распределению 68,2% значений попадают в интервал +1S, это объясняет полученные CV для ВЛК<sub>1</sub>, которые больше чем для ВЛК<sub>2\*</sub> и меньше, чем для ВЛК<sub>2</sub>.

Полученные данные показали, что при создании рабочего раствора ВЛК необходимо учитывать значимость попадания значений ВЛК в зону «точки калибратора», так как расчет концентрации (МЕ/мл) при этом будет происходить по двум уравнениям в зависимости от того, с какой стороны окажется измеренное значение ОП (о.е.) ВЛК и следовательно разброс значений по концентрации (МЕ/мл) будет больше. Кроме того, для определения реальных погрешностей при определении содержания антител к вирусу кори и проведения оперативного контроля качества образец ВЛК должен проходить те же стадии разведения, что и исследуемые образцы пациентов. Данный подход позволит контролировать правильность стадии предварительного разведения исследуемых образцов, а значит и достоверность получаемых результатов.

Учитывая полученные данные, в дальнейшей работе были использованы ВЛК<sub>1</sub> (цельный)

и ВЛК<sub>2\*</sub> (разведенный 1:2), значения которого не совпадали с «точками калибраторов».

*Проведение внутрилабораторного контроля качества*

Проведение ВКК осуществляли в три стадии: Стадия 1 – оценка сходимости результатов измерений ВЛК;

Стадия 2 – оценка воспроизводимости результатов измерений ВЛК и построение контрольных карт;

Стадия 3 – проведение оперативного внутрилабораторного контроля качества.

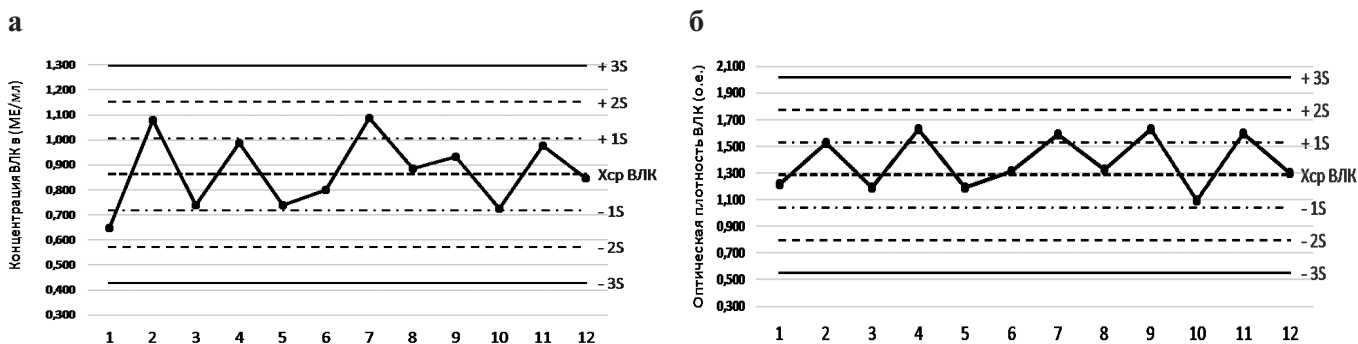
*Стадия 1. Оценка сходимости результатов измерений ВЛК*

Согласно ГОСТ Р 53133.1-4-2008, были проведены 10 измерений двух вариантов ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2\*</sub> в одной аналитической серии на одном планшете [8]. Результаты учитывали двумя способами: качественным (ОП (о.е.)) и количественным (МЕ/мл). На основе полученных

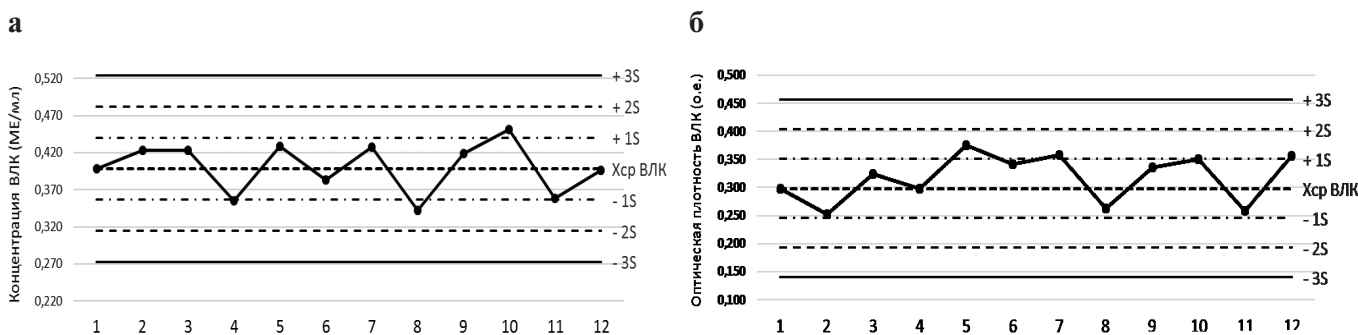
10 значений был рассчитан CV<sub>10</sub> для ВЛК<sub>1</sub>, который оказался равным 8,0% для качественного учета (ОП (о.е.)) и 7,1% для количественного (МЕ/мл); для ВЛК<sub>2\*</sub> эти показатели составили 7,7% и 6,4% соответственно.

*Стадия 2. Оценка воспроизводимости результатов измерений ВЛК и построение контрольных карт*

На второй стадии проводили по 20 измерений ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2\*</sub>. Для сокращения продолжительности построения контрольной карты проводили измерение два раза в день в течение 10 дней. Фиксировали ОП (о.е.) ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2\*</sub> и рассчитывали концентрацию (МЕ/мл). По результатам рассчитывали средние показатели ОП(о.е.) и МЕ/мл, S и его контрольные пределы + 1S, + 2S, + 3S и CV<sub>20</sub> согласно ГОСТ Р 53133.1-4-2008 [8]. По полученным результатам были построены контрольные карты по показателям ОП(о.е.) и концентрации (МЕ/мл) для ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2\*</sub> (табл. 3).



**Рис. 3.** Оперативный контроль качества для определения концентрации антител класса IgG к вирусу кори для цельного ВЛК. **а** – по оси ординат отложена концентрация в МЕ/мл ВЛК<sub>1</sub>, **б** – по оси ординат отложена ОП ВЛК<sub>1</sub>.



**Рис. 4.** Оперативный контроль качества для определения концентрации антител класса IgG к вирусу кори для ВЛК, разведенного 1:2. **а** – по оси ординат отложена концентрация в МЕ/мл ВЛК<sub>2\*</sub>, **б** – по оси ординат отложена ОП ВЛК<sub>2\*</sub>.

### Стадия 3. Проведение оперативного внутрилабораторного контроля качества

Серологическое исследование 654 сывороток крови методом ИФА проводили с использованием ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2\*</sub>, охарактеризованных как показано выше. Все точки ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2\*</sub>, для качественного (ОП о.е.) и количественного вариантов (МЕ/мл), наносили на построенные контрольные карты и оценивали приемлемость полученных результатов с применением контрольных правил Вестгарда [3, 8]. Полученные результаты находились в соответствии с контрольными правилами, что свидетельствует о практической пригодности контрольного материала «ВЛК КОРЬ-IgG» и использовании его в виде цельного препарата (ВЛК<sub>1</sub>) и разведенного 1:2 (ВЛК<sub>2\*</sub>). (рис. 3а, б, 4а, б).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно ГОСТ Р 53022.3-2008 значения результатов лабораторных исследований отражают содержание искомым компонентов с некоторой степенью неопределенности, вызванной факторами случайных и систематических погрешностей аналитических процедур. Поэтому, для получения достоверных результатов, особенно в области принятия решения, необходимо учитывать полученное значение коэффициента вариации в каждой лаборатории [10].

Полученные результаты свидетельствуют, что использование «ВЛК КОРЬ-IgG» при тестировании сывороток крови на наличие IgG к вирусу кори методом ИФА позволяет повысить надежность и качество метода и исключить некоторые ошибки при проведении исследований. Преимуществом используемого препарата «ВЛК-корь IgG» является то, что один и тот же препарат может быть использован как при количественном, так и при качественном формате постановки эксперимента. В приказах и ГОСТах на территории РФ нет определенных рекомендаций, какую ОП (о.е.) должен иметь ВЛК, используемый в ИФА для определения коревых Ig G. В ГОСТе Р 53133.2-2008, часть 2 [8] есть указания о нормальном и патологическом значении антител, но для нашей задачи это не применимо, так как нет понятия «нормальное» и «патологическое» значение концентрации антител к вирусу кори у здоровых лиц. В работе Kim J. с соавторами предлагается использование 2-х образцов ВЛК с низкой ОП, один из которых, близкий к значению cut-off, используется для определения

чувствительности тест-систем [11]. ВОЗ в рамках программы элиминации кори и краснухи рекомендует использование рабочего разведения контрольного материала в пределах 2–3 cut-off для неколичественных методов определения IgM [12]. В то же время, в работе И. Г. Нетесовой с соавторами, при определении HBsAg и антител к гепатиту С, ВИЧ и сифилису указаны значения ОП (о.е.) выбранного образца ВЛК, коммерчески доступного либо изготовленного самостоятельно, в пределах 0,5–1,5 о.е., а CV сходимости от 11 до 15% [6]. Коэффициент вариации (CV), по данным ГОСТ Р 53133.1-4-2008, не должен превышать показателя 25% для количественных методов [8]. Этот показатель регламентирован также и в ГОСТе Р 51352-2013 [13]. Как видно из приведенных выше литературных данных по вопросу использования ВЛК, мнения весьма разрознены и противоречивы. Именно поэтому наши исследования были посвящены валидации препарата «ВЛК КОРЬ-IgG» для определения коревых антител класса G в сыворотке крови методом ИФА с помощью тест-систем «Векто КОРЬ-IgG» и отработке параметров учета качественного (ОП о.е.) и количественного (МЕ/мл) вариантов проведения исследований. С этой целью были сопоставлены два варианта ВЛК: цельный (ВЛК<sub>1</sub>), согласно паспортным данным который имеет значение ОП  $0,811 \pm 0,132$ , и (ВЛК<sub>2\*</sub>) разведенный 1:2. При этом ВЛК<sub>1</sub> соответствовал критериям, предложенным Нетесовой И. Г. с соавторами [6] – 0,5–1,5 о.е. [6], а показатели ВЛК<sub>2\*</sub> – критериям ВОЗ в 2–3 cut-off – 0,4 о.е., что находилось в соответствии с данными Долгова В. В. о том, что при ОП меньше 0,2 о.е. резко возрастает погрешность измерения современных фотометров, рабочий (линейный) интервал измеряемых оптических плотностей которых равен 0,2–2,0 о.е. [14].

Таким образом, опираясь на вышеприведенные сведения и полученные нами результаты, можно считать, что использованные нами препараты ВЛК<sub>1</sub> и ВЛК<sub>2\*</sub> пригодны для проведения рутинного контроля качества в клинико-диагностических лабораториях, проводящих обследование на антитела к вирусу кори. Для оценки сходимости результатов, построения контрольных карт и проведения оперативного контроля целесообразно использовать цельный «ВЛК КОРЬ-IgG» с ОП  $0,811 \pm 0,132$  о.е., поскольку эти значения оказываются в линейной части калибровочной кривой, что способствует повышению точности расчетов. Проведение ВЛК



с использованием ОП (о.е.) позволит заметить и снижение результатов всего планшета (например, при снижении температуры инкубации или уменьшении времени инкубации), в то время как при количественном варианте (МЕ/мл) данный процесс будет нивелирован снижением ОП (о.е.) тестовых калибровочных образцов, что приведет к изменению и всей калибровочной кривой. Тем не менее, в обоих случаях результаты пациентов будут достоверные, так как ОП крит. в данном наборе не рассчитывается от ОП (о.е.) отрицательного контроля и некоего постоянного коэффициента, а равен измеряемой в каждом протоколе ОП (о.е.) калибровочного образца с 0,15 МЕ/мл.

Для оценки чувствительности метода целесообразнее использовать «ВЛК Корь-IgG», разведенный 1:2 с ОП (о.е.) равной 2–3 cut-off, поскольку эти значения также находятся в линейной части калибровочной кривой, но близки по значению к «серой зоне», что позволяет точнее интерпретировать результаты с низкими концентрациями исследуемого анализа.

## ВЫВОДЫ

1. Аттестованный на базе референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского» образец «ВЛК Корь-IgG» пригоден для проведения ВКК при определении коревых IgG в сыворотке крови с использованием наборов «ВектоКорь-IgG» качественным (ОП о.е.) и количественным (МЕ/мл) способом.

2. При оценке сходимости и воспроизводимости результатов «ВЛК Корь-IgG», построения контрольных карт, значения CV не должны превышать 8% и 19% соответственно.

3. При построении контрольных карт показатели ОП (о.е.) и МЕ/мл рабочих растворов «ВЛК Корь-IgG» (цельный или разведенный 1:2) не должны находиться в зоне значений (точек) тестовых калибровочных образцов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимировна Н.П., Мамаева Т.А.* Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой. Инфекция и иммунитет 2018, 3, 341–348. [*Toptygina A. P., Smerdova M. A., Naumova M. A., Vladimirova N. P., Mamaeva T. A.* Influence of populational immunity peculiarities on measles and rubella morbidity. Infection and immunity 2018, 3, 341–348.]
2. Национальная программа элиминации кори и краснухи в Российской Федерации (2016–2020). Утв. руководителем федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека А. Ю. Поповой 28.12.2015 г., министром здравоохранения Российской Федерации В. Ю. Скворцовой 31.12.2015. Электронный доступ: [http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/bcf/programma\\_elyuminatsii\\_kori\\_i\\_krasnukhi\\_v\\_rf\\_2016\\_2020\\_gg.pdf](http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/bcf/programma_elyuminatsii_kori_i_krasnukhi_v_rf_2016_2020_gg.pdf). [National measles and rubella elimination program of Russian Federation (2016–2020). Approved by A. Popova, the head of the Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare, on 28.12.2015, V. Skvortsova, the Minister of healthcare of Russian Federation, on 31.12.2015. Available from: [http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/bcf/programma\\_elyuminatsii\\_kori\\_i\\_krasnukhi\\_v\\_rf\\_2016\\_2020\\_gg.pdf](http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/bcf/programma_elyuminatsii_kori_i_krasnukhi_v_rf_2016_2020_gg.pdf)].
3. Приказ Минздрава России от 07.02.2000 № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации». Электронный доступ: <http://docs.cntd.ru/document/901755005>. [Directive of the Ministry of healthcare of Russian Federation of 07.02.2000, № 45 “On the system of measures to improve the quality of clinical laboratory studies in healthcare institutions of the Russian Federation”. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/901755005>].
4. Приказ от 26 мая 2003 г. № 220. Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». Электронный адрес: <http://docs.cntd.ru/document/901868423>. [Directive No. 220 of May 26, 2003. On approval of the industry standard “Rules of carrying out intralaboratory quality control of quantitative methods for clinical laboratory testing with the use of control materials”. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/901868423>].
5. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов ОСТ91500.13.0001–2003. Электронный адрес: [http://www.hemltd.ru/export/sites/HemLtd/.galleries/publications\\_nd\\_kdl/23.Prikaz\\_26.05.03-220.pdf](http://www.hemltd.ru/export/sites/HemLtd/.galleries/publications_nd_kdl/23.Prikaz_26.05.03-220.pdf). [Rules for conducting intralaboratory quality control of quantitative methods for clinical laboratory testing using control materials OST91500.13.0001–2003. Available from: [http://www.hemltd.ru/export/sites/HemLtd/.galleries/publications\\_nd\\_kdl/23.Prikaz\\_26.05.03-220.pdf](http://www.hemltd.ru/export/sites/HemLtd/.galleries/publications_nd_kdl/23.Prikaz_26.05.03-220.pdf)].
6. *И.Г.Нетесова, М.Р.Бобкова.* Проведение внутрилабораторного контроля качества неколичественных методов иммуноферментного анализа. Справочник заведующего КДЛ 2011, 6, 9–15. [*I. G. Netesova, M. R. Bobkova.* Conducting intralaboratory quality control of non-quantitative methods of enzyme immunoenzymatic analysis. Handbook of the head of KDL 2011, 6, 9–15]
7. *Смердова М.А., Мамаева Т.А., Наумова М.А., Топтыгина А.П.* Разработка стандартных образцов для внутрилабораторного контроля, используемых

- мых при оценке специфических антител к кори и краснухе иммуноферментным методом. Российский иммунологический журнал 2016, 10(19), 2, 396–397. [Smerdova M. A., Mamaeva T. A., Naumova M. A., Toptygina A. P. Internal verification standard development for internal quality control using in measles and rubella specific antibodies evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay. Russian immunological journal 2016, 10(19), 2, 396–397].
8. Янцев А. В. Выбор статистических критериев. Фолиант. Симферополь, 2012, 138. [Yantsev A. V. Choice of statistical criteria. Folio. Simferopol, 2012, 138].
  9. ГОСТ Р 53133.2–2008. Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Москва, Стандартинформ, 2009, 20. [GOST R53133.2–2008. Laboratory clinical technologies. Quality control of clinical laboratory tests. Moscow, STANDARTINFORM, 2009, 20].
  10. Кочетов А. Г., Лянг О. В., Масенко В. П., Жиров И. В., Наконечников С. Н., Терещенко С. Н. Методы статической обработки медицинских данных. Москва, 2012, 42. [Kochetov A. G., Liang O. V., Masenko V. P., Zhiron I. V., Nakonechnikov S. N., Tereshchenko S. N. Methods for statistical processing of medical data. Moscow, 2012, 42].
  11. ГОСТ Р 53022.3–2008. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Москва, Стандартинформ, 2009, 17. [GOST R53022.3–2008. The requirements for quality of clinical laboratory tests. Moscow, STANDARTINFORM, 2009, 17].
  12. Kim J., Swantee C., Lee B., Gunning H., Chow A., Sidaway F., Sherlock C., Garceau R., Dimech W., Malloch L.; CAHCLSLaboratories. Identification of performance problems in a commercial human immunodeficiency virus type 1 enzyme immunoassay by multiuser external quality control monitoring and real-time data analysis. J. Clin. Microbiol. 2009, vol. 47, no. 10, 3114–3120. doi: 10.1128/JCM.00892–09.
  13. WHO. Manual for the Laboratory-based Surveillance of Measles, Rubella, and Congenital Rubella Syndrome. 3-end. Geneva, Switzerland: WHO.— 2018.—P. 583. Available from: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/laboratory/manual/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/laboratory/manual/en/)
  14. ГОСТ Р 51352–2013. Медицинские изделия для диагностики ин витро. Москва, Стандартинформ, 2014, 23. [GOST R51352–2013. Medical products for in-vitro diagnostics. Moscow, STANDARTINFORM, 2014, 23].
  15. Долгов В. В., Ованесов Е. Н., Шетникович К. А. Фотометрия в лабораторной практике. Фолиант, Москва, 2004, 142. [Dolgov, V. V., Ovanesov E. N., Shetnikovich K. A. Photometry in laboratory practice. Folio, Moscow, 2004, 142].

**EXPERIENCE OF INTRA-LABORATORY QUALITY CONTROL APPLICATION AT DETERMINATION OF CLASS G ANTIBODIES TO MEASLES VIRUS BY IMMUNE-ENZYME ANALYSIS METHOD USING CONTROL DRUG**

© 2019 M. A. Smerdova<sup>1,2</sup>, T. A. Mamaeva<sup>1</sup>, M. A. Naumova<sup>1</sup>,  
K. A. Koretsky<sup>2</sup>, D. S. Ivanov<sup>2</sup>, A. P. Toptygina<sup>1\*</sup>

\*E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

<sup>1</sup>G.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>CJSC "Vector-Best-Europe", Moscow, Russia

Received: 25.06.2019. Accepted: 25.08.2019

Measles is a highly contagious infectious disease, fraught with serious complications and even death. The measles elimination program adopted by WHO has produced tangible benefits, but measles is still not defeated. At the stage of measles elimination, measures to increase the reliability of the results and quality of laboratory tests of antibodies to the measles virus become particularly relevant. The purpose of these studies was the validation of the drug "ILC measles-IgG" for the determination of measles antibodies of class G in serum by ELISA and the development of accounting parameters for qualitative and quantitative research options. The study material was commercial reagent kits for determining the concentration of antibodies to the measles virus VectoMeasles-IgG (JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russia), which determined the concentration of the desired analyte in blood serums of 654 randomly selected conditionally healthy residents of Moscow and the Moscow region in age from 0 to 60 years. When conducting laboratory quality control, "ILC measles-IgG" (lyophilized preparation containing IgG to measles virus) was used to assess the intra- and inter-series convergence of the analysis. It is shown that certified on the basis of the reference laboratory of WHO / Europe of G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology sample "ILC-measles IgG" is suitable for conducting internal laboratory quality control in determining measles IgG in serum using the "VectoMeasles-IgG" kits by the qualitative (OU) and quantitative (IU / ml) method. When assessing the convergence and reproducibility of the results of "ILC IgG-measles", the CV values should not exceed 8% and 19%, respectively, and the OD values (OU) and IU / ml of "ILC measles-IgG" working solutions (native or diluted 1: 2) should not be in the range of values (points) of test calibration samples.

*Key words:* measles, intra-laboratory quality control, enzyme immunoassay, antibodies, convergence, reproducibility

**Authors:**

**Smerdova M. A.**, graduate student of the cytokine laboratory G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; leading product specialist of JSC "Vector-Best-Europe", Moscow, Russia;

**Mamaeva T. A.**, PhD (Biology) Leading researcher, Laboratory of immunochemistry, G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

**Naumova M. A.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of immunochemistry, G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

**Koretsky K. A.**, Senior Product Manager, Vector-Best-Europe, Moscow, Russia;

**Ivanov D. S.**, PhD (Biology), Product Specialist, CJSC Vector-Best-Europe, Moscow, Russia;

**Toptygina A. P.**, ✉ PhD, MD (Medicine), ScD, leading researcher of the cytokine laboratory G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; Professor of the Department of Immunology, Faculty of Biology, Moscow State University. M. V. Lomonosov, Moscow, Russia. **E-mail:** toptyginaanna@rambler.ru

## ФАГОЦИТАРНАЯ И ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C, ПРИВИТЫХ ПРОТИВ ЧУМЫ НА ФОНЕ ИММУНОМОДУЛЯЦИИ ПОЛИОКСИДОНИЕМ

© 2019 г. С. Н. Ключева\*, А. Л. Кравцов, С. А. Бугоркова, Т. Н. Щуковская, В. А. Кожевников, А. Ю. Гончарова

\*E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Поступила: 13.12.2018. Принята: 25.08.2019

Полиоксидоний повышает иммуногенность и протективность живой чумной вакцины, но клеточные механизмы, лежащие в основе его иммуномодулирующего эффекта, недостаточно изучены. В настоящей работе с помощью проточной цитометрии исследовали фагоцитарную активность (ФА) гранулоцитов крови привитых и не привитых против чумы мышей BALB/c по отношению к *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Результаты фагоцитарной реакции учитывали в микрообъемах цельной крови на 3, 7 и 21 сутки иммуногенеза. Спонтанную и Кон-А-индуцированную продукцию цитокинов (IFN- $\gamma$  и IL-10) оценивали в крови иммуноферментным методом. В одной из групп животных противочумную вакцинацию проводили на фоне иммуномодуляции препаратом полиоксидонием. Установлено, что у интактных мышей ФА гранулоцитов крови в отношении клеток *Y. pestis* вдвое ниже, чем в опытах с клетками *E. coli* и *S. aureus*. Противочумная вакцинация специфически активировала *in vitro* поглотительную способность фагоцитов крови только по отношению к чумным микробам. На фоне иммуномодулирующего эффекта полиоксидония, ФА повышалась в опытах с клетками *Y. pestis* уже на 3 сутки иммуногенеза, что согласуется с известной способностью данного иммуномодулятора стимулировать более ранний антителогенез при противочумной вакцинации. Кроме того, повышение значений фагоцитарных индексов коррелировало с усилением спонтанной и индуцированной продукции цитокинов в образцах крови привитых против чумы животных. Полученные данные отражают зависимость ФА лейкоцитов крови от вида возбудителя, специфических антител и цитокинов. Они свидетельствуют, что способность полиоксидония повышать протективность живой чумной вакцины может быть связана с активацией ФА лейкоцитов по отношению к клеткам чумного микроба.

**Ключевые слова:** лейкоциты крови, фагоцитоз, *Yersinia pestis*, цитокины, полиоксидоний, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210007044-3

Адрес: 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Ключева Светлана Николаевна. Тел. 8(452) 26-21-31, Факс: 8(452) 51-52-12.

E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

### Авторы:

**Ключева С. Н.**, к.б.н., н.с. отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

**Кравцов А. Л.**, д.м.н., в.н.с. отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

**Бугоркова С. А.**, д.м.н., заведующая отделом иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

**Щуковская Т. Н.**, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

**Кожевников В. А.**, м.н.с. отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

**Гончарова А. Ю.**, к.м.н., н.с. отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

При моделировании у мышей бубонной чумы в настоящее время установлено, что на вну-

трикожное введение в организм живых клеток *Yersinia pestis* первыми отвечают нейтрофильные гранулоциты, которые принимают активное участие в обезвреживании чумных микробов и эффективность киллинга клеток *Y. pestis* нейтрофилами существенно повышается в присутствии иммунной сыворотки, полученной от мышей, привитых живой чумной вакциной [1]. С другой стороны известно, что существенно повысить иммуногенность и протективность живой чумной вакцины позволяет иммуномодулятор полиоксидоний, который оказывает стимулирующее воздействие на клетки врождённого иммунитета организма хозяина (фагоциты) [2] и стимулирует антилообразование у привитых против чумы лабораторных животных [3].

Хотя специфические антитела к поверхностным бактериальным антигенам (опсонины) и регуляторные цитокины, продуцируемые в плазму крови лимфоцитами, являются «вооружающими» фагоциты факторами, активирующими лейкоцитарный фагоцитоз и киллинг бактерий в иммунном организме [4, 5], клеточные механизмы, лежащие в основе стимулирующего эффекта полиоксидония, недостаточно изучены. В частности, на фоне иммуномодуляции полиоксидонием в динамике иммуногенеза не определялась фагоцитарная и цитокин-продуцирующая активность лейкоцитов крови привитых против чумы мышей в условиях *in vitro*.

Повысить эффективность сравнительной оценки показателей фагоцитарной реакции в опытах с лейкоцитами крови до и после вакцинации позволяет метод проточной цитометрии [6, 7], который способен определять ФА гранулоцитов в 100 мкл цельной крови человека [8, 9] или животного [10] без предварительного выделения из нее фагоцитов и сыворотки. Однако с клетками *Y. pestis* такие исследования не проводились.

**Целью** настоящей работы явилась оценка в условиях *in vitro* фагоцитарной и цитокин-продуцирующей активности лейкоцитов крови у мышей линии BALB/c, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальной моделью в опытах служили мыши линии BALB/c весом 18–20 г, полученные из отдела экспериментальных животных с виварием РосНИПЧИ «Микроб». Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами лабораторной практи-

ки в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г. и Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Мыши линии BALB/c были разделены на две опытных и одну контрольную группы по 30 особей в каждой. I группу животных иммунизировали подкожно 2-х суточной культурой *Y. pestis* EV НИИЭГ в концентрации  $2,5 \times 10^4$  КОЕ. II группе за 1 час до иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$  КОЕ) подкожно вводили полиоксидоний (НПО «ПетроваксФарм», Россия) в количестве 4 мкг в 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида pH 7,2 [2]. Программа экспериментальной работы с животными одобрена Комиссией по биоэтике при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 2 от 01.02.2018 г.). Контрольную группу составили интактные мыши.

Исследования проводили со штаммами *Y. pestis* EV НИИЭГ, *Escherichia coli* 25922 ATCC и *Staphylococcus aureus* 209-P, полученными из «Государственной коллекции патогенных бактерий» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Культуру клеток *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) в течение 48 ч при 28 °С (*Y. pestis* (28)). Кроме того, готовили культуру клеток *Y. pestis* (*Y. pestis* (37)), обладающую повышенной устойчивостью к лейкоцитарному фагоцитозу [11, 12]. Для этого клетки *Y. pestis* высевали из 28 °С культуры в концентрации  $1 \times 10^7$  КОЕ на бульон Хоттингера (pH 7,2) и культивировали в условиях аэрации при 37 °С в течение 5 ч.

Культуры *E. coli* и *S. aureus* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) в течение 24 ч при 37 °С. Из культур *Y. pestis* (28), *Y. pestis* (37), *E. coli* и *S. aureus* в 0,9% растворе натрия хлорида pH 7,2 готовили по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П взвеси с концентрацией  $10^9$  м.к./мл, которые обеззараживали нагреванием при 60 °С в течение 1 ч 20 мин [13].

Обеззараженные бактерии окрашивали ФИТЦ (Sigma, США) [7] и готовили по стандарту мутности миллиардные взвеси ФИТЦ-меченых клеток *Y. pestis* (28), *Y. pestis* (37), *E. coli* и *S. aureus* в фосфатно-солевом буфере pH 7,2 (ФСБ) с 5 mM глюкозы и 0,1% желатина (ФСБг) [8], которые разливали в микропробирки и хранили до использования при –20 °С [10].

Фагоцитарную реакцию ставили по методу Miliukienė V. et al. [10], модифицированному нами с учётом методических рекомендаций Nasui M. et al. [8] и White-Owen C. et al. [9]: 100 мкл крови разводили путём добавления 800 мкл ФСБг

и смешивали со 100 мкл миллиардной взвеси исследуемого вида ФИТЦ-меченых бактерий; образцы инкубировали в темноте в течение 15 мин при 37 °С с перемешиванием в шейкере-инкубаторе ES20 (BioSan, Латвия). Фагоцитоз блокировали добавлением 2 мл ФСБ с 3 mM ЭДТА в течение 2 мин, клеточные элементы осаждали центрифугированием (300 g, 5 мин). Осадок ресуспендировали на вортексе в 2 мл разведённого в 10 раз (согласно инструкции) BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, USA) для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов в течение 20 мин. Образцы фиксированных клеток можно хранить до 3-х суток при температуре 4 °С.

Непосредственно перед проведением цитофлуориметрического анализа лейкоциты осаждали из FACS Lysing Solution центрифугированием и осадок ресуспендировали в 2 мл ФСБ с 3 mM ЭДТА. Оценку процесса фагоцитоза проводили с помощью проточного цитометра CyAn ADP (DakoCytomation, Дания) по программе Summit v.4.3 Built 2445. Гранулоциты дифференцировали в крови от лимфоцитов и моноцитов по показателям светорассеяния [8] и путём гейтирования по гранулоцитарной популяции определяли в исследуемых образцах значения фагоцитарных индексов (ФИ, %) и средних значений (Mean) фагоцитарных чисел (ФЧ) на клетку в условных единицах интенсивности ФИТЦ-флуоресценции [9, 14].

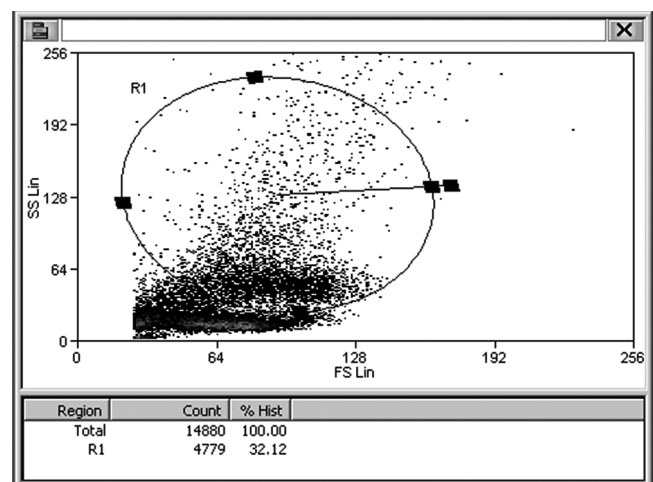
Для определения продукции цитокинов лейкоцитов крови [13] гепаринизированную мышиную кровь разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640 (ПанЭко Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ФГУП им. Н.А. Семашко, Россия). В качестве индуктора продукции цитокинов использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (Пан Эко, Россия) в концентрации 15 мкг/мл. Опытные и контрольные образцы инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С. Клеточные суспензии осаждали центрифугированием при 300 g в течение 15 мин, отбирали супернатанты. Спонтанную и стимулированную конканавалином А продукцию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов для определения IFN- $\gamma$  и IL-10 (eBioscience, Австрия). Исследования выполняли на автоматическом иммуноферментном анализаторе «LAZURIT» (Dunpex Technologies, USA) при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016,

Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2010). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Корреляционные связи считали сильными при коэффициенте корреляции  $r=0,7-1,0$ , умеренной (средней) силы – при  $r=0,3-0,7$ , слабыми – при  $r=0-0,3$ . Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента. Полученные данные представляли в виде медианы (Me) и квартильных отклонений (Q25; Q75).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На цитограмме (рис. 1) представлен результат идентификации гранулоцитов по клеточному объёму и по степени внутриклеточной гранулярности с помощью одновременного измерения методом проточной цитометрии для каждого из лейкоцитов крови показателей прямого (малоуглового, FS- Forward Scatter) и бокового (под углом 90°, SS- Side Scatter) светорассеяния. Гранулоциты, обладающие более высокой степенью внутриклеточной гранулярности, выделены по параметру SS в область R1, где более 95% клеток это нейтрофилы [10]. Относительное содержание гранулоцитов в крови контрольной группы мышей было  $31,8 \pm 1,4\%$ , что является характерным для выбранной линии мышей BALB/c и подтверждается литературными данными [15].



**Рис. 1.** FS/SS dot plot образца цельной крови интактной мыши линии BALB/c. Представлено характерное распределение отдельных лейкоцитов в образце цельной крови по размеру (FS) и по степени гранулярности (SS). Гранулоциты крови (32,12% клеток) локализуются в области R1 цитограммы.

Гейтирование по области R1 позволяло автоматически регистрировать интенсивность флуоресценции активных фагоцитов и оценивать в крови ФА только гранулоцитов. На рис. 2 представлены частотные распределения отдельных гранулоцитов крови интактной мыши линии BALB/c по ФЧ, измеренные в условных единицах интенсивности ФИТЦ-флуоресценции в опытах с клетками *Y. pestis* (28), *Y. pestis* (37), *E. coli* и *S. aureus*. Они наглядно иллюстрируют зависимость фагоцитарной активности лейкоцитов крови от вида возбудителя, а также от особенностей антигенных свойств *Y. pestis*, зависящих от температуры выращивания микроорганизма (28 °С или 37 °С).

Цитометрический анализ показал, что в контрольной группе при взаимодействии лейкоцитов крови мышей с *Y. pestis* (28) значения ФИ были значительно ниже ( $p < 0,0001$ ), чем ФИ, измеренные в тех же экспериментальных условиях в опытах с клетками *E. coli* и *St. aureus* (табл. 1). Кроме того, ФИ по отношению к *Y. pestis* (28) в среднем были в 1,7 раза выше ( $p < 0,0001$ ), чем в отношении *Y. pestis* (37).

При анализе фагоцитарной активности гранулоцитов крови у животных из I группы в динами-

ке вакцинального процесса (табл. 1) отсутствовали существенные изменения ФИ по отношению к *Y. pestis* (28). Изменяющий реактивность фагоцитов крови мышей полиоксидоний [2], оказывал модулирующий эффект на фагоцитоз в условиях *in vitro*, поскольку у животных II группы ФИ повышались по отношению к *Y. pestis* (28) на 21-е сутки ( $p < 0,0001$ ), а по отношению к *Y. pestis* (37) – начиная с 3-х суток ( $p < 0,05$ ).

Повышение ФЧ для лейкоцитов крови мышей I и II групп отмечали в опытах с клетками *Y. pestis* (37) на 7-е сутки ( $p < 0,001$ ), а в опытах с клетками *Y. pestis* (28) – на 21-е сутки ( $p < 0,0001$ ) иммуногенеза во II группе (табл. 2).

В тех же экспериментальных условиях после иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ при контакте *in vitro* лейкоцитов крови с клетками *St. aureus* не было выявлено существенных различий в уровне фагоцитарной активности (ФИ). Различия в поглотительной способности гранулоцитов выражались в повышении ФЧ у животных I и II групп ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичным показателем в контроле на 3-и сутки иммуногенеза. По отношению к *E. coli* во все сроки после иммунизации снижались ФИ в обеих группах, но повышались ФЧ ( $p < 0,05$ ) гранулоцитов кро-

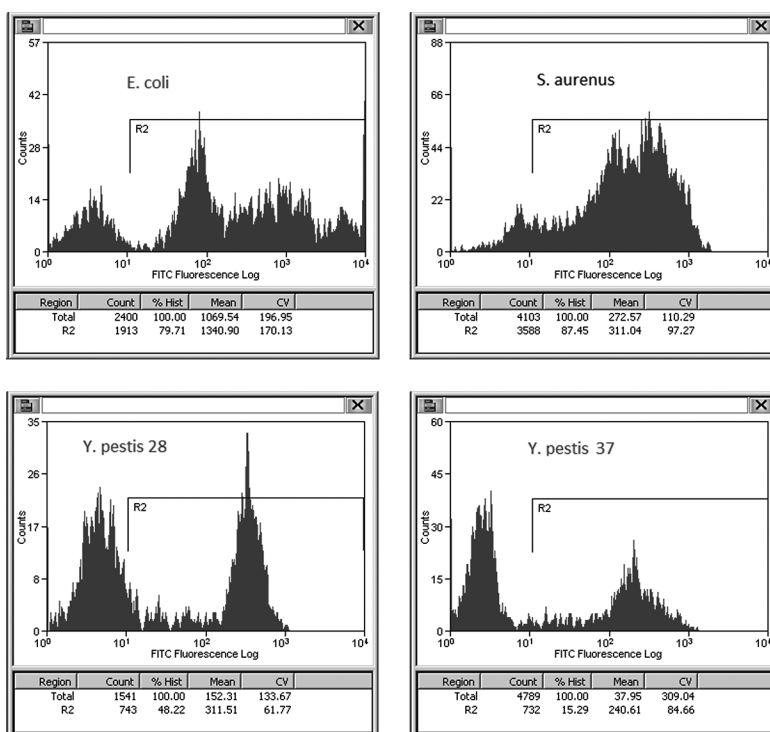


Рис. 2. Примеры гистограмм сравнительной оценки фагоцитарной активности гранулоцитов крови интактной мыши линии BALB/c по отношению к *Y. pestis* (28), *Y. pestis* (37), *E. coli* и *St. aureus*. Активные фагоциты локализируются на гистограммах в области R2.

**Таблица 1.** Фагоцитарные индексы (ФИ) гранулоцитов крови мышей линии BALB/c по отношению к *Y.pestis*, *E. coli* и *St. aureus* при противочумной вакцинации и иммуномодуляции полиоксидонием

Группа	Срок забора крови (сутки)	ФИ (%), Me (Q25; Q75)			
		<i>Y.pestis</i> (28)	<i>Y.pestis</i> (37)	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>
I	3	30,54(24,54; 33,02)	16,04(15,73; 16,95)	51,60(41,34; 57,30)*	88,97(87,10; 90,93)
II		35,48(11,66; 41,63)	21,59(15,65; 26,73)**	47,29(45,81; 49,19)*	90,97(89,34; 91,05)
I	7	27,49(27,26; 30,79)*	18,72(17,78; 29,41)*	50,60(47,3; 51,34)*	88,93(86,8; 89,97)
II		38,10(20,29; 48,76)	23,31(16,49; 28,14)*	43,81(39,19; 50,29)**	91,65(90,78; 97,69)**
I	21	33,43(33,25; 34,15)	21,82(21,57; 27,16)*	43,52(36,63; 50,57)*	90,97(87,46; 91,93)
II		54,36(50,59; 54,97)**	26,03(25,51; 28,24)**	49,19(48,81; 49,29)**	90,05(88,69; 93,97)
Контроль	3, 7, 21	35,79(27,29; 38,75)	16,53(14,7; 19,5)	76,88(71,11; 77,75)	87,89(87,09; 88,29)

**Примечание:** \*статистически значимые различия по сравнению с показателями в контрольной группе; \*\*статистически значимые различия между показателями I и II групп.

**Таблица 2.** Фагоцитарные числа (ФЧ) гранулоцитов крови мышей линии BALB/c по отношению к *Y.pestis*, *E. coli* и *St. aureus* при противочумной вакцинации и иммуномодуляции полиоксидонием

Группа	Срок забора крови (сутки)	ФЧ (y.e.), Me (Q25; Q75)			
		<i>Y.pestis</i> (28)	<i>Y.pestis</i> (37)	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>
I	3	193,66 (183,34; 217,78)	201,25 (168,62; 213,69)	249,5 (202,9; 327,7)*	330,10(313,67; 351,32)*
II		171,36 (133,08; 182,32)	208,61 (186,59; 209,56)*	189,82(167,53; 240,63)**	351,86(275,77; 379,21)*
I	7	193,20 (191,9; 196,50)	223,73 (219,45; 225,14)*	249,50(202,90;327,70)*	334,1(319,63; 354,35)
II		215,80 (196,80; 257,10)	220,96(211,01; 223,21)*	189,82(167,53; 240,63)*	351,86(298,73; 382,34)
I	21	166,40(153,28; 181,06)	169,0(158,70; 219,60)	249,50(202,90; 327,70)*	330,10(309,77; 348,37)
II		285,47(278,35; 325,3)**	149,89(148,18; 202,96)	89,82(167,53; 240,63)*	346,92(285,44; 371,08)
Контроль	3, 7, 21	228,28 (135,22; 227,79)	178,76(112,96; 210,24)	137,90(131,50; 141,80)	271,60(257,60; 275,90)

**Примечание:** \*статистически значимые различия по сравнению с показателями в контрольной группе; \*\*статистически значимые различия между показателями I и II групп.

ви у привитых против чумы мышей (I группа) в сравнении с контролем (табл. 1, 2).

Иммуноферментный анализ супернатантов крови мышей линии BALB/c показал, что уровни спонтанной и КонА-индуцированной продукции цитокинов (IFN- $\gamma$  и IL-10) в опытных группах на 3-и, 7-е и 21-е сутки иммунного ответа статистически достоверно превышали ( $p < 0,001$ ) аналогичные показатели контрольной группе (табл. 3). Причём во все сроки исследования у животных II группы показатели спонтанной и КонА-индуцированной продукции IL-10 превышали аналогичные показатели у животных I группы ( $p < 0,0001$ ).

Установлен ряд сильных зависимостей между показателями фагоцитарной активности и концентрациями цитокинов. Так, в I группе животных ФИ коррелировали с концентрациями IL-10 при спонтанной продукции на 21-е сутки исследования ( $r=0,86$ ,  $p=0,002$ ), а с концентрациями IFN- $\gamma$  при КонА-индуцированной продукции — на 7-е и 21-е сутки ( $r=0,93$ ,  $p=0,0002$ ;  $r=0,85$ ,  $p=0,003$  соответственно). Показатели ФЧ коррелировали с концентрациями IL-10 при спонтанной продукции на 7-е сутки ( $r=0,76$ ,  $p=0,015$ ).

Во II группе сильная корреляция выявлена между ФИ и количеством IL-10 при спонтанной продукции на 7-е и 21-е сутки ( $r=0,93$ ,



**Таблица 3.** Продукция цитокинов лейкоцитами крови мышей BALB/c на фоне противочумной вакцинации и иммуномодуляции полиоксидонием

Группа	Срок забора крови (сутки)	Продукция IFN- $\gamma$ , пг/мл		Продукция IL-10, пг/мл	
		Спонтанная	КонА-индуцированная	Спонтанная	КонА-индуцированная
		Me (Q25; Q75)			
I	3	55,73(50,804; 68,60)*	82,06 (56,06; 99,23)**	33,10(23,0; 37,90)*	38,50(24,50; 43,0)*
	7	59,68(59,41; 76,76)*	76,72 (64,16; 81,94)*	31,30(20,80; 34,90)*	33,70(24,50; 46,50)*
	21	55,06(43,33; 63,83)*	64,10(55,14; 67,89)*	18,50(11,10; 21,10)*	23,80(17,10; 25,60)**
II	3	58,89(48,34; 64,42)*	67,10(66,27; 81,83)*	63,10(54,10; 80,60)**	86,0(71,2; 120,9)**
	7	63,72(53,21; 76,58)*	65,61(65,51; 78,14)*	69,70(54,90; 80,80)**	71,50(67,90; 91,5)**
	21	47,98(44,84; 51,16)*	68,94(63,02; 70,84)*	62,50(42,10; 63,0)**	67,70(42,10; 73,0)**
Контроль		28,43 (21,25;35,17)	53,51 (31,74;55,95)	11,2 (8,85;11,55)	16,1 (14,8;16,3)

**Примечание:** \*статистически значимые различия по сравнению с показателями в контрольной группе; \*\*статистически значимые различия между показателями I и II групп ( $p < 0,05$ ).

$p=0,0002$  и  $r=0,90$ ,  $p=0,0009$ ). Корреляционные зависимости установлены между ФЧ и количеством IFN- $\gamma$  при КонА-индуцированной продукции ( $r=0,70$ ,  $p=0,03$ ) на 3-и сутки, между ФЧ и уровнем IFN- $\gamma$  при спонтанной и КонА-индуцированной продукции на 7-е ( $r=0,76$ ,  $p=0,01$  и  $r=0,68$ ,  $p=0,04$  соответственно) и 21-е сутки иммуногенеза ( $r=0,78$ ,  $p=0,01$  и  $r=0,81$ ,  $p=0,007$  соответственно).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе с использованием точной цитометрии получены экспериментальные данные, которые подтверждают современное положение о зависимости фагоцитарной активности гранулоцитов крови от вида и биологических свойств возбудителя [16], от наличия в организме активных при фагоцитозе специфических антител (опсонинов) к поверхностным бактериальным антигенам [5–7].

Низкие значения ФИ гранулоцитов крови у контрольных животных в отношении бактерий *Y. pestis* (28) и *Y. pestis* (37), в сравнении с ФИ, зарегистрированными в опытах с бактериями *E. coli* и *St. aureus*, можно объяснить недостатком опсонизирующих факторов, а именно, отсутствием в крови специфических антител к поверхностным антигенам чумного микроба. Причём, клетки *Y. pestis* (37) поглощались гранулоцитами крови интактных мышей менее эффективно, чем *Y. pestis* (28), что полностью согласуется с вы-

водами исследователей, установивших ингибирующее воздействие на фагоцитарную функцию лейкоцитов крови человека и животных поверхностных антигенов *Y. pestis* (капсульный антиген F1, *Yersinia outer proteins* и др.), синтезируемых при температуре 37°C [11, 12].

Противочумная иммунизация в условиях иммуномодуляции стимулировала у мышей поглотительную способность гранулоцитов крови по отношению к клеткам *Y. pestis* (37), начиная уже с 3-х суток иммуногенеза, что согласуется с литературными данными о более ранней продукции специфических антител к капсульному антигену F1 у животных, привитых вакциной живой чумной на фоне иммуномодулирующего эффекта полиоксидония [3].

На 21-е сутки иммуногенеза, в период формирования у мышей наиболее напряжённого приобретенного противочумного иммунитета [17], в условиях иммуномодуляции существенно возросли ФИ по отношению к клеткам *Y. pestis* (28). Однако в группе I, где иммунизация проводилась без иммуномодуляции, таких изменений не регистрировали. Возможно по той причине, что на фоне иммуномодулирующего эффекта полиоксидония у мышей линии BALB/c формируется по нашим данным в 2,7 раза более эффективная защита от заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* [2].

По-видимому, повышение уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови по отношению к *Y. pestis* отражает специфичность

происходящей в организме иммунологической перестройки, поскольку такие изменения отсутствовали в опытах с клетками золотистого стафилококка и кишечной палочки. Наоборот, при использовании *E. coli*, мы отмечали снижение значений ФИ.

Способность нейтрофилов отвечать функциональной активацией на специфические иммунные комплексы антиген-антитело зависит, как известно, от их прайминга, индуцируемого *in vivo* первичным контактом с бактериальными ЛПС [15] и иммунорегуляторными цитокинами [5]. В пользу этого свидетельствуют выявленные корреляционные взаимосвязи между изменениями в уровнях фагоцитарной и цитокин-продуцирующей активности лейкоцитов в процессе формирования специфического противочумного иммунитета.

Таким образом, предварительное введение полиоксидония перед противочумной вакцинацией стимулирует фагоцитарную и цитокин-продуцирующую активность лейкоцитов крови по отношению к чумному микробу, что согласуется с современными представлениями о механизме действия этого биологически активного препарата и свидетельствует о возможности его использования с целью повышения эффективности противочумной вакцинации. Применение проточной цитометрии для быстрой и объективной оценки показателей фагоцитарной реакции в микрообъемах цельной крови может способствовать повышению производительности и информативности исследований, направленных на разработку теста *in vitro* определения уровня клеточного противочумного иммунитета.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shannon J. G., Hasenkrug A. M., Dorward D. W., Nair V., Carmody A. B., Hinnebusch B. J. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague. *Mbio* 2013, 4, e00170-e00113.10.1128/mbio.00170-13.
2. Кравцов А. Л., Курьлина А. Ф., Ключева С. Н., Шуковская Т. Н. Модулирующий эффект полиоксидония на реактивность клеток иммунной системы при формировании противочумного иммунитета. *Иммунология* 2016, 37(6), 320–325. [Kravtsov A. L., Kurylina A. F., Klyueva S. N., Shchukovskaya T. N. The modulating effect of polyoxidonium on the reactivity of cells of the immune system during the formation of anti-plague immunity. *Immunology* 2016, 37 (6), 320–325].
3. Пономарева Т. С., Дерябин П. Н., Каральник Б. В., Тугамбаев Т. И., Атишбар Б. Б., Денисова Т. Г., Закарян С. Б., Мельникова Н. Н. Влияние полиоксидония на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Иммунология* 2014, 5, 286–290. [Ponomareva T. S., Deryabin P. N., Karalnik B. V., Tugambaev T. I., Atshabar B. B., Denisova T. G., Zakaryan S. B., Mel'nikova N. N. The impact of polyoxidonium on immunogenic and protective activity alive plague vaccine. *Immunology* 2014, 5, 286–290].
4. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Основные задачи клинической иммунологии по изучению функциональной активности фагоцитирующих клеток. *Иммунология* 1995, 3, 6–10. [Khaitov R. M., Pinegin B. V. The main objects of clinical immunology for the study of the functional phagocytic cell activity. *Immunology* 1995, 3, 6–10].
5. Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Ковалева С. В., Евлевский А. А., Нгуен Т. З. Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // *Инфекция и иммунитет* 2017, 7(3), 219–230. [Nesterova I. V., Kolesnikova N. V., Chudilova G. A., Lomtatidze L. V., Kovaleva S. V., Evglevsky A. A., Nguyen T. D. L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Russian Journal of Infection and Immunity* 2017, 7(3), 219–230].
6. Jansen W. T. M., Väkeväinen-Anttila M., Käyhty H., Nahm M., Bakker N., Verhoef J., Snippe H., Verheul A. F. Comparison of a classical phagocytosis assay and a flow cytometry assay for assessment of the phagocytic capacity of sera from adults vaccinated with pneumococcal conjugate vaccine. *Clin. Diag. Lab. Immunology* 2001, 8(2), 245–250.
7. Ison C. A. Whole-blood model. *Methods Mol Med* 2001, 66, 317–329.
8. Hasui M., Hirabayashi Y., Kobayashi Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J. Immunol. Methods* 1989, 117, 53–58
9. White-Owen C., Alexander J. W., Sramkoski R. M., Babcock G. F. Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J. Clin. Microbiology* 1992, 30 (8), 2071–2076.
10. Miliukienė V., Šiaurys A., Pilinkienė A., Chaustova L. Flow cytometry measurement of *Saccharomyces cerevisiae* phagocytosis by neutrophils in mouse blood. *Biologiya* 2005, 3, 69–73.
11. Spinner J. L., Cundiff J. A., Kobayashi S. D. *Yersinia pestis* type III secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immunity* 2008, 76 (8), 3754–3760.
12. Du Y., Rosqvist R., Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* 2002, 70, 1453–1460.
13. Ключева С. Н., Шуковская Т. Н. Влияние адьювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц. *Российский иммунологический журнал* 2015, 9(18), 2, 201–208. [Klyueva S. N., Schukovskaya T. N. Adjuvants influence of new generation *in vitro* cytokine production by blood cells vaccinated against plague persons. *Russian Journal of Immunology* 2015, 9 (18), 2, 201–208].

14. Олиферук Н. С., Пинегин Б. В. Определение фагоцитарного числа лейкоцитов периферической крови по отношению к *Staphylococcus aureus* с помощью проточной цитометрии. Иммунология 2007, 4, 236–240. [Oliferuk N. S., Pinegin B. V. The phagocytic number definition of peripheral blood leukocytes in the ratio *Staphylococcus aureus* with flowing cytofluorimetry. Immunology 2007, 4, 236–240].
15. Landoni V. I., Chiarella P., Martire-Greco D., Schierloh P., van-Rooijen N., Rearte B., Palermo M. S., Isaturiz M. A., Fernandez G. C. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. Clinical and Experimental Immunology 2012, 168, 153–163.
16. Исачкова Л. М., Плехова Н. Г. К развитию представлений об антиинфекционной резистентности. Эпидемиология и инфекционные болезни 2002, 1, 11–15. [Isachkova L. M., Plekhova N. G. To the development of ideas about anti-infectious resistance. Epidemiology and infectious diseases 2002, 1, 11–15].
17. Девдариани З. Л., Терешкина Н. Е., Тараненко Т. М., Киреев М. Н., Терехова И. В., Григорьева Г. В., Исляева М. Н., Ермаков Н. М., Виноградова Н. А., Малахаева А. Н. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*). Проблемы особо опасных инфекций 2013, 1, 74–77. [Devdariani Z. L., Tereshkina N. E., Taranenko T. M., Kireev M. N., Terekhova I. V., Grigor'eva G. V., Grigor'eva G. V., Islyayeva M. N., Ermakov N. M., Vinogradova N. A., Malakhaeva A. N. The results of model experiments on the construction of enzyme immunoassay test system for the detection of antibodies to the F1 *Y. pestis* (IFA-AT-F1 *Yersinia pestis*). Problems of Particularly Dangerous Infections 2013, 1, 74–77].

## BLOOD LEUKOCYTE PHAGOCYtic AND CYTOKINE-PRODUCING ACTIVITY OF ANTI-PLAGUE VACCINATED BALB/C LINE MICE AGAINST THE BACKGROUND OF IMMUNOMODULATION BY POLYOXIDONIUM

© 2019 S. N. Klyueva\*, A. L. Kravtsov, S. A. Bugorkova, T. N. Schukovskaya, V. A. Kozhevnikov, A. Yu. Goncharova

\*E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Received: 13.12.2018. Accepted: 25.08.2019

Polyoxidonium increases the immunogenicity and protection of the live plague vaccine, but the cellular mechanisms underlying its immunomodulating effect are not well understood. In present study, the blood granulocyte phagocytic activity (PA) of anti-plague vaccinated and not vaccinated BALB/c mice in relation to *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was investigated using flow cytometry. The results of the phagocytic reaction were taken into account in the microvolumes of whole blood on days 3, 7 and 21 of immunogenesis. Spontaneous and CoA-induced cytokine production (IFN- $\gamma$  and IL-10) was evaluated in the blood by an ELISA method. In one of the groups of animals, anti-plague vaccination was carried out against the background of immunomodulation with a polyoxidonium. It was established that in intact mice the blood granulocyte PA in relation to *Y. pestis* cells is twice as low as in experiments with *E. coli* and *S. aureus* cells. Anti-plague vaccination specifically activated *in vitro* the blood granulocyte absorptive capacity only in relation to plague microbes. Against the background of the polyoxidonium immunomodulating effect, PA increased in experiments with *Y. pestis* cells already on the 3<sup>rd</sup> day of immunogenesis, which is consistent with the known ability of this immunomodulator to stimulate earlier antibody genesis during anti-plague vaccination. In addition, an increase in phagocytic index values correlated with an increase in spontaneous and induced cytokine production in blood samples of animals vaccinated against the plague. The data obtained reflect the dependence of blood leukocyte PA from the pathogen type, specific antibodies and cytokines. They indicate that the polyoxidonium ability to increase the live plague vaccine protectivity may be associated with the activation of leukocyte PA to plague microbes.

*Key words:* blood leukocytes, phagocytosis, *Yersinia pestis*, cytokines, polyoxidonium, flow cytometry

**Authors:**

**Klyueva S. N.**, ✉ PhD (Biology), Researcher, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia. **E-mail:** klyueva.cvetlana@mail.ru;

**Kravtsov A. L.**, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia;

**Bugorkova S. A.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia;

**Shchukovskaya T. N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia;

**Kozhevnikov V. A.**, Junior Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia;

**Goncharova A. Y.**, PhD (Medicine), Researcher, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia.

**Пятая научно-практическая школа-конференция  
АЛЛЕРГОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ  
ДЛЯ ПРАКТИКУЮЩИХ ВРАЧЕЙ  
посвященная 45-летию ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России  
29 сентября – 5 октября 2019 года  
Сочи, отель «Sea Galaxy», ул. Черноморская, 4**

**Организаторы конференции:**

Федеральное медико-биологическое агентство  
ФГУП «Гос.НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России  
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России  
ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России  
МОУ «Институт инженерной физики»  
Министерство здравоохранения Краснодарского края  
Управление здравоохранения администрации г. Сочи  
ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ  
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова МЗ РФ  
Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов  
Российское научное общество иммунологов  
Российское цитокиновое общество  
МОО «Евро-Азиатское общество по инфекционным болезням»  
ООО «ЭКСПОКОН»

**Председатель оргкомитета:**

В. В. Уйба, руководитель ФМБА России, профессор

**Заместители председателя оргкомитета:**

Р. М. Хаитов, научный руководитель ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России,  
президент РААКИ, академик РАН  
В. А. Черешнев, главный научный сотрудник ИИФ УрО РАН, президент РНОИ, академик РАН  
Ю. В. Лобзин, директор ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, зав. кафедрой инфекционных болезней  
ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России, академик РАН  
А. С. Симбирцев, научный руководитель ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, чл.-корр. РАН

**Программный комитет:**

**Председатель:** чл.-корр. РАН Симбирцев Андрей Семенович  
**Заместитель председателя:** профессор Колесникова Наталья Владиславовна

**Члены программного комитета:**

чл.-корр. РАН Иванов Андрей Михайлович  
профессор Клишко Николай Николаевич  
профессор Козлов Иван Генрихович

**Ответственные секретари оргкомитета:**

доцент Волжанин Валерий Михайлович  
доцент Лебедев Михаил Федорович  
доцент Козлова Яна Игоревна  
доцент Романова Елена Сергеевна

**Административный секретариат оргкомитета:**

МОО «Евро-Азиатское общество по инфекционным болезням»

Чадина Вероника: Тел.: +7(903) 094 9944; +7(812) 234-34-88 (доб. 1478); E-mail: veronika-igm.spb@mail.ru  
Юрьева Евгения: Тел.: +7 921 789-33-64, E-mail: allergolog-2019@inbox.ru

**Официальный сайт школы-конференции <http://shkola-immunologa.ru>**

## Список лекторов:

Афанасьева Ольга Ивановна, профессор (Санкт-Петербург)  
Балдуева Ирина Александровна, профессор (Санкт-Петербург)  
Богданова Ольга Михайловна (Москва)  
Борисов Александр Геннадиевич, к.м.н. (Красноярск)  
Бычкова Наталия Владимировна, к.б.н. (Санкт-Петербург)  
Ганковская Людмила Викторовна, профессор (Москва)  
Гариб Фируз Юсупович, профессор (Москва)  
Гребенюк Александр Николаевич, профессор (Санкт-Петербург)  
Гудима Георгий Олегович, профессор (Москва)  
Долгушин Илья Ильич, академик РАН (Челябинск)  
Евсегнеева Ирина Валентиновна, профессор (Москва)  
Жданов Константин Валерьевич, чл.-корр РАН (Санкт-Петербург)  
Заморина Светлана Анатольевна, д.б.н. (Пермь)  
Зверев Виталий Васильевич, академик РАН (Москва)  
Зурочка Александр Владимирович, профессор (Челябинск)  
Иванов Андрей Михайлович, чл.-корр РАН (Санкт-Петербург)  
Калинина Наталья Михайловна, профессор (Санкт-Петербург)  
Калюжин Олег Витальевич, профессор (Москва)  
Караулов Александр Викторович, академик РАН (Москва)  
Климко Николай Николаевич, профессор (Санкт-Петербург)  
Кожина Елена Вадимовна, профессор (Москва)  
Козлов Владимир Александрович, академик РАН (Новосибирск)  
Козлов Иван Генрихович, профессор (Москва)  
Козлова Яна Игоревна, доцент (Санкт-Петербург)  
Колесникова Наталья Владиславовна, профессор (Краснодар)  
Красильников Игорь Викторович, профессор (Санкт-Петербург)  
Курбачева Оксана Михайловна, профессор (Москва)  
Латышева Елена Александровна, д.м.н. (Москва)  
Латышева Татьяна Васильевна, профессор (Москва)  
Летяева Ольга Ивановна, профессор (Челябинск)  
Лобзин Юрий Владимирович, академик РАН (Санкт-Петербург)  
Лусс Людмила Васильевна, профессор (Москва)  
Лядова Ирина Владимировна, профессор (Москва)  
Маевский Евгений Ильич, профессор (МОУ «ИИФ», Серпухов)  
Маркова Татьяна Петровна, профессор (Москва)  
Мелехина Елена Валериевна, к.м.н. (Москва)  
Мурашов Александр Григорьевич, вице-президент МОУ "ИИФ" (Серпухов)  
Назарова Евгения Валерьевна, к.м.н. (Москва)  
Нестерова Ирина Вадимовна, профессор (Москва)  
Нехаева Татьяна Леонидовна, к.м.н. (Санкт-Петербург)  
Никитин Юрий Владимирович (Санкт-Петербург)  
Новик Алексей Викторович, к.м.н. (Санкт-Петербург)  
Пипиа Нино Петровна, к.м.н. (Санкт-Петербург)  
Погромская Маргарита Николаевна, доцент (Санкт-Петербург)  
Продеус Андрей Петрович, профессор (Москва)  
Прохорова Марина Владимировна (Москва)  
Раев Михаил Борисович, профессор (Пермь)  
Ризопулу Анна Панаетисовна, д.б.н. (Москва)  
Романова Елена Сергеевна, доцент (Санкт-Петербург)  
Руднев Денис Сергеевич, генеральный директор АО "Столетика" (Серпухов)  
Свитич Оксана Анатольевна, чл.-корр. РАН (Москва)  
Сенников Сергей Витальевич, профессор (Новосибирск)  
Серебряная Наталья Борисовна, профессор (Санкт-Петербург)  
Сизякина Людмила Петровна, профессор (Ростов-на-Дону)  
Симбирцев Андрей Семенович, чл.-корр. РАН (Санкт-Петербург)  
Соболев Алексей Владимирович, профессор (Санкт-Петербург)  
Топтыгина Анна Павловна, д.м.н. (Москва)  
Тотоян Арег Артемович, академик РАН (Санкт-Петербург)  
Тришина Светлана Васильевна, профессор (Симферополь)  
Тузанкина Ирина Александровна, профессор (Екатеринбург)  
Федоскова Татьяна Германовна, профессор (Москва)  
Хайтов Муса Рахимович, чл.-корр. РАН (Москва)  
Хайдуков Сергей Валерьевич, профессор (Москва)  
Чеботарева Татьяна Александровна, профессор (Москва)  
Черешнев Валерий Александрович, академик РАН (Екатеринбург)  
Чувиров Денис Геннадьевич, доцент (Москва)  
Хижняк Евгений Павлович, д. физ.-мат. н. (МОУ «ИИФ», Серпухов)  
Шульженко Андрей Евгеньевич, профессор (Москва)  
Ярилина Лариса Геннадьевна, к.м.н. (Москва)

## Генеральные партнеры и спонсоры

МОУ «Институт инженерной физики»  
ООО «ФИРН М»

## Главные спонсоры

ФП «Оболенское»  
ООО «Корус Фарм»

## Спонсоры

АО «Валента Фарм», НПФ «Материа Медика Холдинг», ООО «Др. Редди'с Лабораторис»

## Ко - спонсор

АО «Отисифарм»

## Участники

ООО «Бекмен Культер», АО «Генериум», ООО «Диаэм», ООО «Замбон Фарма», ООО «Мерк», ООО «ФЕРОН»

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ЧИСЛА НЕЙТРОФИЛОВ В КРОВИ У ОБЛУЧЁННЫХ ЛИЦ ДО РАЗВИТИЯ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

© 2019 г. А. А. Аклеев<sup>1,2\*</sup>, И. И. Долгушин<sup>2</sup>, Е. А. Блинова<sup>1,3</sup>

\*E-mail: andrey.akleev@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины»  
ФМБА России, Челябинск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Челябинск, Россия;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 17.07.2019. Принята: 21.08.2019

Проведён ретроспективный анализ динамики числа нейтрофилов в крови у облучённых жителей прибрежных сёл реки Течи, заболевших впоследствии острыми лейкозами. Обнаружены особенности в реакции гранулоцитарного ростка кроветворения на облучение у этих лиц по сравнению с облучёнными людьми без лейкозов.

**Ключевые слова:** радиация, нейтрофилы, острые лейкозы

DOI: 10.31857/S102872210007045-4

Адрес: 454092 Челябинск, ул. Воровского, 64, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Аклеев Андрей Александрович.  
Тел.: +7(351)2327456; +79043011682 (моб.).

E-mail: andrey.akleev@yandex.ru

### Авторы:

**Аклеев А. А.**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия; старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, Челябинск, Россия;

**Долгушин И. И.**, академик РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Блинова Е. А.**, к.б.н., заведующая лабораторией молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, Челябинск, Россия; доцент кафедры радиационной биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что одними из наиболее неблагоприятных последствий воздействия ионизирующей радиации на организм человека

являются лейкозы, радиационный риск развития которых существенно превышает таковой для солидных опухолей. При этом особенно высокий риск отмечен для острых лейкозов (ОЛ) после облучения в раннем постнатальном периоде онтогенеза [1]. Летальность при ОЛ остаётся очень высокой и поэтому представляется важным разработать способ определения предрасположенности облучённых лиц к этой патологии.

**Целью** нашей работы была ретроспективная оценка динамики числа нейтрофилов крови у жителей прибрежных сёл реки Течи, заболевших впоследствии ОЛ.

Жители прибрежных сёл реки Течи – это когорта людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в результате сбросов жидких радиоактивных отходов производственным объединением «Маяк» в реку Течу. Облучение этих лиц характеризовалось определённой спецификой. Во-первых, оно было обусловлено, в основном, остеотропным радионуклидом <sup>90</sup>Sr, который длительно воздействовал на красный костный мозг. Во-вторых, имела место определённая динамика мощности дозы облучения (максимальные мощности регистрирова-

лись в период с 1950 по 1956 гг. – время сбросов радиоактивных отходов в реку, затем мощность дозы постепенно снижалась и в дальнейшем не превышала допустимых значений для населения России).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 22 случая первичных ОЛ, в том числе 8 случаев острых миелобластных лейкозов, по 1 случаю острого монобластного, лимфобластного и эритроидного лейкозов, 11 случаев лейкозов неутонченно-клеточного типа, которые были зарегистрированы у жителей прибрежных сёл реки Течи с 01.01.1953 г. по 31.12.2016 г. (основная группа). С учётом ранее установленных особенностей иммуногемопоза у этих людей [2], анализ числа нейтрофилов проводили в период максимального радиационного воздействия (1950–1956 гг.), когда преобладали процессы угнетения кроветворения; во время восстановления гемопоза (1957–1970 гг.), когда в системе кроветворения начали превалировать регенерационные процессы; а также в период отдалённых последствий (после 1970 года), когда дозы облучения не превышали допустимых уровней, и в латентном периоде (за 2 года до манифестации ОЛ). Следует отметить, что большинство случаев ОЛ (15 случаев) было диагностировано в периоде отдалённых последствий, 6 случаев – во время восстановления гемопоза, 1 случай – в периоде максимального радиационного воздействия. Группу сравнения формировали методом «копия-пара» из 22 облучённых жителей прибрежных сёл реки Течи, сопоставимых с представителями основной группы по возрасту, полу, этнической принадлежности и дозе облучения, но не заболевших ОЛ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание нейтрофилов в крови оценивали ретроспективно на основании данных амбулаторных карт и историй болезни облучённых лиц, наблюдавшихся в клинике ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России (г. Челябинск). В 1950–1956 гг. у представителей основной группы отмечено значительное «омоложение» популяции нейтрофилов за счёт увеличения относительного ( $p=0,001$ ) и абсолютного ( $p=0,001$ ) содержания палочкоядерных нейтрофилов в крови, однако доля зрелых сегментоядерных нейтро-

филов у них была более низкой ( $p=0,006$ ), чем в группе сравнения. В 1957–1970 гг. в обеих группах лиц абсолютное и относительное количество палочкоядерных нейтрофилов в крови снизилось до нормального уровня, при этом не было отмечено статистически значимых межгрупповых отличий, однако у представителей основной группы сохранялось более высокое общее абсолютное ( $p=0,021$ ) и относительное ( $p=0,011$ ) содержание нейтрофилов в крови за счёт сегментоядерных форм. В период отдалённых последствий (после 1970 года) по сравнению с предыдущим периодом наблюдения у лиц основной группы отмечено повышение относительного общего содержания нейтрофилов в крови ( $p=0,01$ ) за счёт увеличения доли зрелых сегментоядерных клеток ( $p=0,004$ ). У лиц группы сравнения в этом периоде отмечено существенное снижение как абсолютного ( $p=0,002$ ), так и относительного ( $p=0,001$ ) числа палочкоядерных нейтрофилов, однако общее абсолютное ( $p=0,001$ ) и относительное ( $p=0,001$ ) содержание нейтрофилов в крови у них увеличилось за счёт повышения абсолютного и относительного числа сегментоядерных форм ( $p=0,001$ ). Вместе с тем, общее относительное содержание нейтрофилов в крови у облучённых лиц основной группы было статистически значимо выше ( $p=0,031$ ), чем в группе сравнения. В латентном периоде, непосредственно предшествовавшем манифестации ОЛ, в основной группе вновь регистрировались признаки «омоложения» популяции нейтрофилов – у них отмечалась большая доля палочкоядерных нейтрофилов в крови относительно группы сравнения ( $p=0,002$ ), при этом доля сегментоядерных нейтрофилов была ниже, чем в группе сравнения ( $p=0,025$ ).

На основании проведённого исследования можно констатировать, что у облучённых людей, заболевших впоследствии ОЛ, регистрировался иной характер динамики числа нейтрофилов крови по сравнению с облучёнными лицами без ОЛ. Особенности этой динамики были: 1. более выраженное «омоложение» популяции нейтрофилов в периоде максимального радиационного воздействия (свидетельствовало о более интенсивной регенерации гранулоцитарного роста кроветворения в основной группе относительно группы сравнения) и в латентном периоде ОЛ; 2. большее содержание зрелых (сегментоядерных) нейтрофилов в крови в периоде восстановления гемопоза; 3. более высокое общее относительное число нейтрофилов



в крови в периоде отдалённых последствий. Таким образом, указанные выше изменения в динамике числа нейтрофилов в крови можно рассматривать в качестве предикторов предрасположенности облучённых людей к ОЛ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Nikkila A., Erme S., Arvela H., Holmgren O., Raitanen J., Lohi O., Auvinen A. Background radiation and childhood leukemia: A nationwide register-based

case-control study. *International Journal of Cancer*. 2016, 139 (9), 1975–1982.

2. Аклеев А. В., Варфоломеева Т. А. Состояние гемопоэза в условиях многолетнего облучения костного мозга у жителей прибрежных сёл р. Теча. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2007, Т. 47 (3), 307–321. [Akleyev A. V., Varfolomeyeva T. A. The state of hemopoiesis under conditions of long-term bone marrow exposure in residents of the Techa riverside villages. *Radiation Biology. Radioecology*. 2007, 47 (3), 307–321].

### STUDY OF NEUTROPHIL COUNT DYNAMICS IN EXPOSED PERSONS DURING THE PERIOD PRIOR TO ACUTE LEUKEMIAS DEVELOPMENT

© 2019 A. A. Akleyev<sup>1,2\*</sup>, I. I. Dolgushin<sup>2</sup>, E. A. Blinova<sup>1,3</sup>

\*E-mail: andrey.akleev@yandex.ru

<sup>1</sup>Urals Research Center for Radiation Medicine of the FMBA of Russia, Chelyabinsk, Russia;

<sup>2</sup>Southern-Urals State Medical University of the RF Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia;

<sup>3</sup>Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Received: 17.07.2019. Accepted: 21.08.2019

A retrospective analysis of neutrophil count dynamics in the blood of the exposed residents of the Techa riverside settlements, who subsequently developed acute leukemias, was carried out. The peculiarities in the reaction of granulocyte lineage to radiation in these individuals were found out in comparison with exposed individuals without leukemias.

*Key words:* radiation, neutrophils, acute leukemias

#### Authors:

**Akleyev A. A.**, ✉ M.D., PhD, Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia; Senior researcher of Molecular-cell Radiobiology Laboratory, Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia. **E-mail:** andrey.akleev@yandex.ru;

**Dolgushin I. I.**, M.D., Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics Department, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

**Blinova E. A.**, PhD, Head of Molecular-cell Radiobiology Laboratory, Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia; Associate Professor of the Department of Radiation Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia.

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩИХ АНТИТЕЛ КЛАССА IgE ПРИ АЛЛЕРГИИ К МЕСТНЫМ АНЕСТЕТИКАМ

© 2019 г. А. Д. Алымкулова<sup>1\*</sup>, К. А. Айтбаев<sup>1</sup>, Б. Т. Орозбекова<sup>2</sup>

\*E-mail: alymkulova70@mail.ru

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины,  
Бишкек, Кыргызская Республика;

<sup>2</sup>ГОУВПО Кыргызско-Российский Славянский университет, Бишкек, Кыргызская Республика

Поступила: 24.07.2019. Принята: 27.08.2019

В статье приводятся данные выявления антител класса IgE при аллергии к местным анестетикам (МА). Отмечено высокая частота встречаемости микст и лекарственной аллергии с высоким показателем IgE и псевдоаллергических реакций с показателями IgE от 6,4 до 97,0 МЕ/мл.

**Ключевые слова:** лекарственная гиперчувствительность, IgE-антитела, местные анестетики

DOI: 10.31857/S102872210007046-5

Адрес: 720040 Кыргызская Республика, г. Бишкек, ул. Т. Молдо 3, НИИМБиМ, лаборатория иммунологии, Алымкулова Акылбубу Джамаловна. Тел.: 996–0555782216;

E-mail: alymkulova70@mail.ru

**Авторы:**

Алымкулова А. Д., н.с. НИИМБиМ, Бишкек, Кыргызская Республика;

Айтбаев К. А., д.м.н., профессор, зав. лаб. иммунологии, НИИМБиМ, Бишкек, Кыргызская Республика;

Орозбекова Б. Т., д.м.н., профессор, зав. каф. эпидемиологии и иммунологии, КРСУ, Бишкек, Кыргызская Республика.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время приобретают особую значимость вопросы повышения эффективности обезболивания. Однако, аллергические реакции (АР) на местные анестетики (МА) являются серьезной проблемой практического здравоохранения, в том числе в стоматологической практике. Исследования многих авторов демонстрируют рост частоты встречаемости АР на МА среди пациентов. По данным ВОЗ (WAO, 2012), побочные реакции на лекарства возникают у 10% жителей планеты и 20% пациентов находящихся в стационаре, из которых 10% являются непрогнозируемыми и протекают в тяжелой форме, создавая угрозу жизни [1]. В РФ распространенность аллергических заболеваний колеблется от 15 до 35% [2]. По данным Б. М. Пухлик с соавторами (2008), на Украине

частота лекарственной аллергии (ЛА) среди 1637 лиц, подвергшихся оперативному вмешательству, составляет – 5,13% [3]. В республике Казахстан распространенность аллергопатологии растет и выявляется у 3–8% среди сельского населения и до 15% среди городского населения [4]. В Кыргызстане С. Б. Шабыкеева и соавт. (2014) отмечают рост распространенности и количества больных с ЛА. Если, в 2008 г. зарегистрировано 3,3% больных, то, в 2010 г. – 4,7%, а в 2012 г. – 5,2% пациентов [5].

Диагностика ЛА остается актуальной и не до конца изученной, нет ни одного научно обоснованного метода, который позволил бы достоверно выявлять сенсibilизацию к лекарственному препарату и их метаболитам. Для достоверной диагностики необходимо тщательно и подробно проанализировать аллергологический и фармакологический анамнез [6]. Согласно классификации WAO, иммунологическая анафилаксия может быть вызвана IgE-опосредованными или не IgE-опосредованными механизмами, которые включают в себя непосредственную активацию тучной клетки и эта активация вызывает внеклеточное высвобождение воспалительных медиаторов таких как гистамин, лейкотриены простагландины, гепарин и цитокины [7]. Прежде чем назначить лекарственное средство, требуется внимательно изучить химический состав

и свойства препарата, наличие перекрестных реакций с другими медикаментами и пищевыми продуктами. В связи с этим возникла необходимость изучения значения IgE в формировании ЛА у больных с непереносимостью к МА. Цель исследования: определение общего IgE у больных с лекарственной аллергией к местным анестетикам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования получен от 42 пациентов из стоматологических поликлиник города Бишкек, в возрасте от 18 до 72 лет (средний возраст  $40,6 \pm 0,3$ ), страдающих ЛА. По возрастам пациенты были распределены следующим образом: до 20 лет – 2,4%, 20–29 лет 23,8%, 30–39 лет – 31%, 40–49 и старше – 23,8%. Из них 16,7% составляли мужчины и 83,3% – женщины (35 женщин и 7 мужчин). Допускалось наличие других сопутствующих видов аллергии, таких как пыльцевая, пищевая. Для предварительной оценки наличия ЛА проводился опрос пациентов по анкете, учитывающей наличие лекарственной непереносимости. Контрольную группу составили 26 практически здоровых пациентов (23 мужчины и 3 женщины), средний возраст  $28,2 \pm 0,2$  лет без аллергопатологии. По структуре контрольная группа обследованных была: до 20–29 лет – 57,6%, 30–39 лет – 42,3%.

Для определения общего IgE в сыворотке крови пациентов использовался метод иммуноферментного анализа (ИФА) с набором реактивов общий IgE ИФА ВЕКТОР-БЕСТ (Россия). Набор предназначен для количественного определения концентрации общего Ig класса E в сыворотке крови и является важным вспомогательным средством для диагностики аллергических заболеваний в том числе, и ЛА (по стандарту). Статистическая обработка проведенных исследований проводилась по Стьюденту. Различия с редкими величинами считались достоверными при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным анамнеза, у пациентов уже были аллергические реакции на лекарственные препараты. Среди пациентов с ЛА, проходивших обследование в нашем центре, у 59,5% пациентов отмечена реакция на пищу, у 28,7% случаев реакция к пыльце растений, и у 21,4% пациентов отмечена гиперчувствительность к пище и к пыльце растений. В опытной группе средние

показатели IgE составляли  $306,65 \pm 10,53$  МЕ/мл, однако у 45,2% больных отмечалась псевдоаллергическая реакция, то есть показатели IgE выявлялись в пределах нормы. Показатели общего IgE в контрольной группе были в 6,8 раза меньше чем в опытной группе,  $44,7 \pm 2,9$  МЕ/мл,  $P \geq 0,01$ .

Таким образом, даже анализ структуры обращаемости по поводу ЛА показывает неоднородность этой патологии. Особо следует отметить рост числа микст и ЛА. Половозрастной спектр пациентов, тоже составляет определенный интерес: 83,3% составляют женщины, более половины это люди в возрасте до 40 лет. Однако, наши данные не подтверждают высокий процент микст аллергических реакций в данных других исследователей которые показывают наличие ЛА в более старшем возрасте. Высокая частота реакций на препарат, может говорить, как и о высокой фоновой сенсibilизации более молодого поколения, так и наличием поведенческих факторов риска (употребление «фаст-фуд», многочисленных пищевых добавок, красителей, бытовой химии, пестицидов в пищевых продуктах) при формировании риска микст аллергических реакций. Для практического здравоохранения необходимо совершенствования лабораторных технологий и повышение эффективности диагностики ЛА. Своевременная диагностика ЛА возможна при интеграции лечащего врача и врача аллерголога с иммунологом. Большое значение имеет правильно собранный анамнез жизни, подробный разбор клинического случая, фармакопейный разбор применяемых препаратов, а использование элиминационных проб являются важными составляющими в постановке диагноза. Для практического здравоохранения необходимо разработать методические рекомендации по алгоритму диагностики с использованием методов доказательной медицины, которые позволят лечащему врачу общего профиля предупредить аллергической реакцией на медикаменты.

## ВЫВОДЫ

1. Отмечена высокая частота встречаемости микст и ЛА в опытной группе: у 54,7% с высоким показателем IgE от 140,0 до 1890,5 МЕ/мл, а 45,2% пациентов имели псевдоаллергические реакции с показателями IgE от 6,4 до 97,0 МЕ/мл. Из общего числа обследованных 21,4% обратившихся имели в анамнезе аллергические реакции на 2 и более лекарственных препарата.

2. По нашим данным, среди обследованных женщин наблюдается омоложение формирования лекарственной устойчивости, что не согласуется с данными других авторов, которые отмечают наличие аллергических реакций на местные анестетики у лиц, более старшего возраста.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Белая книга WAO по аллергии 2011–2012: Резюме / под ред. акад. Р. И. Сепиашвили, Т. А. Славянской. М.: Медицина–Здоровье, 2011. 12 с. [WAO white book on Allergy 2011–2012: Executive Summary / ed. R. I. Sepiashvili, T. A. Slavic. M.: Medicine–Health, 2011. 12PP].
2. Silva D. Acute and long-term management of drug allergy: systematic review / D. Silva, M. Geromi, S. Panesar, A. Murano, T. Werfel, Hoffmann-Sommergruber K et al. // Allergy.— 2014.— № 69.— P. 159–167.
3. Пухлик Б. М. Лекарственная аллергия и побочные эффекты лекарственных средств в аллергологии / Б. М. Пухлик, А. П. Викторов, С. В. Зайцев. Львов, 2008. с. 108. [Puhlik B. M. Drug Allergy and side effects of drugs in Allergology / B. M. Puhlik, A. P. Viktorov, S. V. Zaitsev. Lviv, 2008. P. 108.
4. Ахмалдинова Л. Л. Клинико-эпидемиологические особенности лекарственной аллергии / Л. Л. Ахмалдинова, С. Ю. Старикова // Иммунопатология, аллергология, инфектология.— 2011.— № 4.— С. 24–26. [Akmaldinova L. L. Clinical and epidemiological features of drug Allergy / Akmaldinova L. L., S. Y. Starikov // Immunopathology, Allergology, Infectology. 2011.—№ 4.— P. 24–26].
5. Шабыкеева С. Б. Лекарственная аллергия / С. Б. Шабыкеева, А. Т. Алтымшыева, С. И. Калужный, Н. А. Токтогулова, Т. М. Сооронбаев // Вестник КРСУ.— 2014. Том 14. № 12.— С. 126–129. [Shabykeeva S. B. Drug Allergy / Shabykeeva S. B., A. T. Altymysheva, S. I. Kaluzhnyi, N. A. Toktogulova, T. M. Sooronbaev // Vestnik KRSU.—2014. Volume 14. No. 12.— P. 126–129].
6. Победенная Г. П. Значение ресурсов современной лабораторной диагностики в практике клинициста-аллерголога / Г. П. Победенная, Ф. Т. Соляник, П. К. Бойченко и др. // Клиническая аллергология и иммунология. 2010. № 2. С. 70–75. [Pobedina G. P. The value of the resources of modern laboratory diagnostics in the practice of the clinical allergist / G. P. Pobedina, F. T. Solyanik, P. K. Boichenko // Clinical Allergy and immunology. 2010. No. 2. P. 70–75.
7. Montanes M. I., Mayorga C., Bogas G. Epidemiology, mechanisms, and diagnosis of drug – induced anaphylaxis. Frontiers in Immunology 2017; 8: 614.

## DETECTION OF IgE-ANTIBODIES TO LOCAL ANAESTHETICS AND ITS DIAGNOSTIC VALUE

© 2019 A. D. Alymkulova<sup>1\*</sup>, K. A. Aitbaev<sup>1</sup>, B. T. Orosbekova<sup>2</sup>

\*E-mail: alymkulova70@mail.ru

<sup>1</sup>Scientific Research Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, Kyrgyz Republic;

<sup>2</sup>Kyrgyz-Russian Slavic University, Bishkek, Kyrgyz Republic

Received: 24.07.2019. Accepted: 27.08.2019

The article presents data on the detection of IgE-antibodies in allergy to local anesthetics. There was a high incidence of mixed and drug allergy with a high rate of IgE and pseudoallergic reactions with indicators of IgE from 6.4 to 97.0 IU/ml.

*Key words:* drug hypersensitivity, immunoglobulin E antibody, local anaesthetics

#### Authors:

**Alymkulova A. D.**, ☐ Researcher of the Laboratory of Immunology Scientific Research Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: alymkulova70@mail.ru;

**Aitbaev K. A.**, Head of the Laboratory of Immunology Scientific Research Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, Kyrgyz Republic;

**Orosbekova B. T.**, professor, Kyrgyz-Russian Slavic University, Bishkek, Kyrgyz Republic.

## ГУМОРАЛЬНЫЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ У ЛЮДЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ И РЕВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2019 г. М. С. Бляхер, И. М. Федорова, С. И. Котелева, З. К. Рамазанова, С. Ю. Комбарова, И. Г. Мартыненко, Е. А. Тульская\*

\*E-mail: etul@mail.ru

ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Поступила: 12.07.2019. Принята: 14.08.2019

T-лимфоциты привитых людей вовлекаются в поствакцинальный иммунный ответ на полисахаридную вакцину против А, С, Y и W серогрупп *N.meningitidis* даже, если вакцина не является гликопротеиновым конъюгатом, однако функциональная активность T-лимфоцитов, продуцирующих IFN $\gamma$  и IL-4 различна при первичном и вторичном ответе на вакцину. В случаях, когда при ревакцинации гуморальный иммунный ответ на А-полисахарид *Neisseria meningitidis* развивается слабо, в их крови регистрируется недостаточная активность T-лимфоцитов, продуцирующих IFN $\gamma$ , а изменение баланса между активностью Th1 и Th2 более сходно с динамикой у первично привитых людей, а не у успешно ревакцинированных.

**Ключевые слова:** T-лимфоциты, IFN $\gamma$ , IL-4, антитела против *N. meningitidis*

DOI: 10.31857/S102872210007047-6

**Адрес:** 125512 Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, лаборатория по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета, Бляхер Мария Сергеевна. Тел./факс: +7 (495) 452-18-30, 8 903 295 58 51 (моб.).

**E-mail:** etul@mail.ru

**Авторы:**

**Бляхер М. С.**, д.м.н., профессор, руководитель отдела иммунологии ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского, Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Федорова И. М.**, к.м.н., в.н.с. отдела иммунологии ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского, Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Котелева С. И.**, к.м.н., в.н.с. отдела иммунологии ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского, Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Рамазанова З. К.**, к.м.н., с.н.с. отдела иммунологии ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского, Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Комбарова С. Ю.**, д.б.н., руководитель лаборатории кокковых инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Мартыненко И. Г.**, н.с. лаборатории кокковых инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Тульская Е. А.**, к.б.н., с.н.с. отдела иммунологии ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского, Роспотребнадзора, Москва, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Вакцины из полисахаридов наружных мембран широко используются для защиты от инфекций, вызываемых пневмококком, менингококком и др. Эти вакцины обеспечивают защиту в течение 1–2 лет, но не вызывают формирование долгосрочной иммунологической памяти. Среди иммунологических нарушений, способствующих этому обстоятельству, особо выделяется дефицитность в системе комплемента [1, 2], низкая активность T-клеток, возможно, вследствие активации T-регуляторных клеток [3].

Отдельно стоит вопрос эффективной защиты лабораторных работников, регулярно контактирующих с менингококком, от инфицирования этим микроорганизмом. В настоящее время ВОЗ рекомендует прививать таких людей 1 раз в 1–2 года. Однако, исследование, проведенное в Германии, показало, что время полужизни антител против серогрупп А, С, W135, и Y после вакцинации таких лиц вакциной Mencevax® ACWY, Glaxo Smith Kline составляет 27.4, 21.9, 18.8 и 28.0 месяцев соответственно. Имеется

значительная межиндивидуальная вариабельность. Доля работников с протективными SBA титрами против W135 (65.0%) была значительно ниже, чем доля людей с защитными титрами А (95.0%), С (94.7%) и Y (95.0%) [4].

**Цель исследования:** изучение формирования специфического гуморального иммунитета и динамики изменений в цитокиновой сети при первичном и вторичном введении вакцины Menacevax® лабораторным работникам, регулярно контактирующих с менингококком.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследована цельная венозная кровь и сыворотка 32 взрослых доноров в возрасте от 30 до 65 лет с различным прививочным анамнезом в отношении менингококковой инфекции (из них 10 обследованы однократно, 22 – трехкратно: перед вакцинацией, через 1 и 4 недели после вакцинации). Первичная вакцинация была проведена 8 людям, ревакцинация – 14. Титры антител к *N.meningitidis* были определены в сыворотках методом РНГА перед вакцинацией и через 1 месяц после нее. Иммунный статус доноров оценивали методом проточной цитометрии (проточный цитометр Cytomics FC500, оборудование и реагенты – Beckman Coulter (США)). Функциональную активность лейкоцитов оценивали по их способности продуцировать IFN $\gamma$  и IL-4, в надосадках, снятых с культуры клеток цельной крови, после стимуляции ФГА или ФМА с иономицином. Концентрацию цитокинов определяли на ИФА-тест-системах фирм ЗАО «Вектор-Бест» и ООО «Цитокин» (Россия). Статистическая обработка проведена с использованием программ MSExcel и StatSoft STATISTICA 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов характеризовались увеличением абсолютного количества клеток во всех основных субпопуляциях лимфоцитов крови через 1 неделю после первичной вакцинации вакциной Menacevax® (на 10–20% по сравнению с исходным уровнем) и возвращением показателей к исходному уровню или даже некоторым снижением относительно него через 4 недели. Оба процесса при динамическом наблюдении более выражены при ревакцинации, чем при первичной вакцинации – на 20–30% (значимо при  $p < 0,05$ ).

Первичная вакцинация прошла успешно: через 4 недели сероконверсия регистрировалась в сыворотках всех людей этой группы, кроме одного. Ревакцинированные люди были разделены на тех, у кого после вакцинации титры антител к А-полисахариду *N.meningitidis* увеличились не менее, чем в 4 раза (подгруппа 1), и тех, у кого этот прирост был не более, чем в 1,5 раза (подгруппа 2).

Одной из характеристик функциональной активности лимфоцитов является их способность продуцировать цитокины при стимуляции стандартными митогенами. Величина продукции IFN $\gamma$ , индуцированная ФГА, может служить характеристикой активности Th1, а продукции, IL-4 – характеристикой активности Th2. У ревакцинированных подгруппы 2 способность лимфоцитов крови продуцировать IFN $\gamma$  на всех сроках обследования характеризуется наименьшими значениями среди всех подгрупп ( $p < 0,05$ ).

У ревакцинированных из подгруппы 1, активность Th1 преобладает во всем поствакцинальном периоде (соотношение IFN $\gamma$ /IL-4 через 1 неделю составляет 226, через 4 недели – 207), а у ревакцинированных из подгруппы 2 на первой неделе соотношение IFN $\gamma$ /IL-4 равно 38 и более сходно с таковым у первично привитых (41), а не с подгруппой 1, но к 4 неделе во всех трех группах соотношение IFN $\gamma$ /IL-4 практически одинаково – 145, 207 и 243, соответственно.

Таким образом, в случаях, когда при ревакцинации гуморальный иммунный ответ на А-полисахарид *N.meningitidis* развивается слабо, регистрируется недостаточная функциональная активность Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN $\gamma$ , а изменение баланса между активностью Th1 и Th2 более сходно с динамикой у первично привитых людей, а не у успешно ревакцинированных. Вероятно, при повторных вакцинациях на это обстоятельство надо обращать особое внимание.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Drogari-Apiranthitou M., Fijen C.A., van de Beek D., Hensen E.F., Dankert J., Kuijper E.J. Development of antibodies against tetravalent meningococcal polysaccharides in revaccinated complement-deficient patients. // Clin. Exp. Immunol. 2000; 119 (2): 311–316.
2. Keiser P.B., Broderick M. Meningococcal polysaccharide vaccine failure in a patient with C7 deficiency and a decreased anti-capsular antibody response. // Hum. Vaccin. Immunother. 2012; 8 (5): 582–586.

3. Milagres L. G., Costa P. R., Santos B. A., Silva G. P., Cruz A. C., Perejra-Manfro W. F., Ferreira B., Barreto D. M. CD4<sup>+</sup> T-cell activation impairs serogroup C *Neisseria meningitidis* vaccine response in HIV-infected children. // AIDS. 2013; 27 (17): 2697–2705.
4. Elias J., Findlow J., Borrow R., Tremmel A., Frosch M., Vogel U. Persistence of antibodies in laboratory staff immunized with quadrivalent meningococcal polysaccharide vaccine. // J. Occup. Med. Toxicol. 2013; 4 (1): 4.

## HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY IN HUMANS VACCINATED AND REVACCINATED AGAINST MENINGOCOCCAL INFECTION

© 2019 M. S. Blyakher, I. M. Fedorova, S. I. Koteleva, Z. K. Ramazanova, S. Yu. Kombarova, I. G. Martynenko, E. A. Tulskeya\*

\*E-mail: etul@mail.ru

G. N. Gabrichevsky Research Institute of epidemiology and microbiology, Moscow, Russia

Received: 12.07.2019. Accepted: 14.08.2019

T-lymphocytes of vaccinated people are involved in the post-vaccination immune response to the polysaccharide vaccine against the A, C, Y and W serogroups of *N. meningitidis* even if the vaccine is not a glycoprotein conjugate, but the functional activity of T-lymphocytes producing IFN $\gamma$  and IL-4 is different in the primary and secondary response to the vaccine. If in revaccinated people the humoral immune response to the A-polysaccharide of *N. meningitidis* is poorly developed, there is the lack of activity of T-lymphocytes that produce IFN $\gamma$  in their blood and the change in the balance between the activity of Th1 and Th2 is more similar to the dynamics of the primary vaccinated people, rather than successfully revaccinated.

*Key words:* T-lymphocytes, IFN $\gamma$ , IL-4, antibodies against *N. meningitidis*

### Authors:

**Blyakher M. S.**, DSci (Medicine), Professor, Head of the Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

**Fedorova I. M.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology, G. N. Gabrichevsky, G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

**Koteleva S. I.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology, G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

**Ramazanova Z. K.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Immunology, G. N. Gabrichevsky, G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

**Kombarova S. Yu.**, D. Sci (Biology), Head of Laboratory of Coccoid Infections of G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

**Martynenko I. G.**, Researcher, Laboratory of Coccoid Infections of G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

**Tulskeya E. A.**, ☒ PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Immunology, G. N. Gabrichevsky, G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. **E-mail:** etul@mail.ru

## ТИПЫ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ ПРИ ПРОЛЕЖНЯХ

© 2019 г. С. А. Борисов<sup>1\*</sup>, А. А. Савченко<sup>1</sup>, Э. В. Каспаров<sup>1</sup>,  
М. В. Маценко<sup>1</sup>, И. В. Кудрявцев<sup>2</sup>

\*E-mail: 2410454@mail.ru

<sup>1</sup>НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 10.07.2019. Принята: 12.08.2019

Целью исследования явилось выделение на основании клинико-иммунологических исследований типов реагирования иммунной системы у больных с пролежнями. Обследовано 67 больных с острыми хирургическими заболеваниями, осложнившимися пролежнями. Исследование фенотипа лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии. Для типирования больных пролежнями применялся метод кластерного анализа. При иммунологическом обследовании больных с пролежнями установлено, что иммунологические показатели характеризуются значительным разнообразием. Использование кластерного анализа позволило выделить у больных с пролежнями 4 иммунотипа, которые определяются как различные патогенетические варианты течения заболевания.

**Ключевые слова:** пролежни, иммунитет, иммунотипы, кластеры

DOI: 10.31857/S102872210007048-7

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3Г.  
НИИ медицинских проблем Севера. Борисов Сергей Александрович. Тел./факс: +7(391)2280683.

E-mail: 2410454@mail.ru

**Авторы:**

**Борисов С. А.**, аспирант лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия;

**Савченко А. А.**, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия;

**Каспаров Э. В.**, д.м.н., профессор, директор НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия;

**Маценко М. В.**, аспирант лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия;

**Кудрявцев И. В.**, к.б.н., лаборатория общей иммунологии ФГБНУ «НИИ экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия.

организма. Проведенные многочисленные работы при гнойной хирургической патологии показали ведущее значение иммунитета в развитии исхода этой группы заболеваний [1, 2, 4]. С клинической точки зрения необходимо отметить, что иммунитет у больных с инфекционно-воспалительными заболеваниями у различных пациентов реагирует неодинаково, поэтому для успешного лечения пациентов необходимо классифицировать иммунные нарушения с выделением различных иммунотипов [1, 3, 4].

**Целью исследования** явилось выделение на основании клинико-иммунологических исследований типов реагирования иммунной системы у больных с пролежнями.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 67 больных с острыми хирургическими заболеваниями, осложнившимися пролежнями (33 мужчины и 34 женщины). Больные проходили лечение на базе КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 им И. С. Берзона». Средний возраст больных составил 62 года (54–70 лет). Оценку развития пролежневого процесса проводили согласно ГОСТ

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на применение новых современных медицинских технологий, выбор тактики лечения пролежней, в связи с увеличением числа этих больных и недостаточной эффективностью терапии, остается актуальным [2]. Это связано с тем, что у длительно лежащих больных нарушено функционирование органов и систем



Р 56819-2015, с определением стадий пролежней согласно международным рекомендациям NPUAP/EPUAP. В качестве контроля обследовано 53 здоровых человека (26 мужчин и 27 женщин) аналогичного возрастного диапазона.

Клиническая оценка иммунной системы проведена с выявлением синдромов иммунной дисфункции с формированием иммунологического диагноза [1]. Исследование фенотипа лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием четырехцветных панелей: CD3/CD4/CD8/CD45 и CD3/CD19/CD16<sup>+</sup>56/CD45. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, USA) Центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН. Основные фенотипы лимфоцитов определены следующим образом: Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD16/56<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>), Т-хелперы (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>), Т-цитотоксические (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>), NK-клетки (CD3<sup>-</sup>CD16/56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>), В-лимфоциты (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>). Абсолютные значения были получены по двухплатформенной технологии с использованием результатов гематологического анализа. Статистический анализ осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007) и Microsoft Excel 10 (Microsoft, 2010). Кластеризацию осуществляли методом одиночной связи (Single linkage). Число кластеров определяли на основании вычисления величин Евклидовых расстояний между среднегрупповыми величинами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинически у всех больных пролежнями выявлены различные синдромы иммунных нарушений. В основном это были стойкие, гиперактивные иммунные нарушения макрофагально-фагоцитарного звена иммунитета средней степени тяжести (более 68% случаев). При исследовании иммунологических показателей обнаружено, что у больных спроежнями в периферической крови наблюдается резкое повышение числа лейкоцитов, прежде всего за счет палочкоядерных нейтрофилов. Этот показатель выше контрольных цифр более чем в 2,5 раза. В 2 раза увеличено число моноцитов. Увеличение числа лимфоцитов не выражено. Однако у больных с большой площадью (более 5 кв. см.) пролежней, тяжелой степенью (3 и выше) и с неблагоприятным исходом общее количество лимфоцитов резко снижено (до  $0,99 \times 10^9/\text{л}$ ), за счет популяции В-лимфоцитов и NK-клеток.

При кластерном анализе 1 кластер характеризовался увеличением общего количества нейтрофилов и NK-клеток. 2 кластер – увеличение Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. В третьем кластере не выявлены существенные изменения, он занимает переходное значение между кластером 1 и 3. Для 4 кластера характерно снижение практически всех иммунологических показателей. Наибольшее число неблагоприятных исходов встречаются в группе 4 кластера (более 45%). При этом площадь пролежней чаще всего небольшая, крайняя степень тяжести регистрировалась чуть более четверти больных (27,27%). Наоборот, в группе больных, отнесенных к 1 кластеру иммунного реагирования, неблагоприятный исход зарегистрирован у 2 из 35 больных (5,71%). При этом в половине случаев это больные с пролежнями большой площади и крайней степени тяжести. У больных 2 и 3 кластера не отмечалось смертельных исходов. Больные 2 кластера имели пролежни небольшой площади, но тяжелой степени (41,67%). В 3 кластере больные в 55,56% случаев имели пролежни площадью более 5 кв.см. с третьей-четвертой степени тяжести.

С помощью кластерного анализа нами выявлены 4 кластера иммунного реагирования у больных с пролежнями. Для 1 кластера характерно повышение показателей врожденного иммунитета. Во 2 кластере наблюдается повышение показателей адаптивного иммунитета. 3 кластер характеризуется отсутствием реакций иммунной системы. У больных 4 кластера определяется снижение показателей как адаптивного, так и врожденного иммунитета. Схожее распределение иммунологических показателей получено и ранее при других иммунопатологических состояниях [3, 4]. Важным является то, что течение заболевания у больных с данными иммунотипами отличается. Развитие пролежней с активацией врожденного иммунитета (кластер 1) характеризуется большой площадью поражения и тяжелой степенью тяжести с возможностью летального исхода. При активации адаптивного иммунитета (кластер 2) – небольшая площадь, но тяжелая степень пролежней, обычно без благоприятного исхода. 3 кластер с ареактивностью иммунной системы характеризуется большой площадью без тяжелой степени тяжести, обычно с благоприятным исходом. Особый интерес вызывает то, что при иммунодефицитных состояниях (4 кластер), несмотря на небольшую степень тяжести и площади поражения, фор-

мируется неблагоприятный исход практически в половине случаев. Таким образом, при иммунологических обследованиях больных с пролежнями установлено, что иммунологические показатели характеризуются значительным разнообразием. Использование кластерного анализа позволило выделить у больных с пролежнями 4 иммунотипа, которые определяются как различные патогенетические варианты течения пролежней.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Борисов А. Г. Клиническая характеристика нарушения функции иммунной системы. Медицинская иммунология, 2013, 15(1), 45–50. [Borisov A. G. Clinical characteristics of the dysfunction of the immune system. Medical immunology, 2013, 15(1), 45–50.]
2. Борисов А. Г., Савченко А. А., Соколовская В. К. Заболеваемость, связанная с нарушениями функции иммунной системы (на примере Красноярского края). Здравоохранение Российской Федерации, 2014, 58(6), 38–41. [Borisov A. G., Savchenko A. A., Sokolovskaya V. K. The incidence associated with impaired function of the immune system (for example, the Krasnoyarsk Territory). Healthcare of the Russian Federation, 2014, 58(6), 38–41.]
3. Борисов А. Г. Кластерный анализ типов иммунных нарушений при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Российский иммунологический журнал, 2014, 8(4), 1002–1011. [Borisov A. G. Cluster analysis of types of immune disorders in infectious and inflammatory diseases. Russian immunological journal, 2014, 8(4), 1002–1011.]
4. Борисов А. Г., Савченко А. А., Черданцев Д. В., Здзитовецкий Д. Э., Первова О. В., Кудрявцев И. В., Беленюк В. Д., Шапкина В. А. Типы иммунного реагирования при распространенном гнойном перитоните. Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова, 2016, 9, 28–34. [Borisov A. G., Savchenko A. A., Cherdantsev D. V., Zdzitovetsky D. E., Pervova O. V., Kudryavtsev I. V., Belenyuk V. D., Shapkina V. A. Types of immune response in case of widespread purulent peritonitis. Surgery. Journal them. N. I. Pirogov, 2016, 9, 28–34.]

## TYPES OF IMMUNE RESPONSE DURING BEDSORES

© 2019 S. A. Borisov<sup>1\*</sup>, A. A. Savchenko<sup>1</sup>, E. V. Kasparov<sup>1</sup>,  
M. V. Matsenko<sup>1</sup>, I. V. Kudryavtsev<sup>2</sup>

\*E-mail: 2410454@mail.ru

<sup>1</sup>Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine»,  
St. Petersburg, Russia

Received: 10.07.2019. Accepted: 12.08.2019

The aim of the study was the selection on the basis of clinical and immunological studies of the types of immune system response in patients with bedsores. 67 patients with acute surgical diseases complicated by bedsores were examined. The study of the phenotype of blood lymphocytes was performed by flow cytometry. For typing of patients with bedsores the cluster analysis method was used. An immunological examination of patients with bedsores found that immunological indicators are characterized by a significant variety. The use of cluster analysis allowed us to isolate immunotype 4 in patients with bedsores which are defined as different pathogenetic variants of the course of the disease.

*Key words:* bedsores, immunity, immunotypes, clusters

### Authors:

**Borisov S. A.**, ☒ Post-Graduate Student, Laboratory of Cell Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia. **E-mail:** 2410454@mail.ru;

**Savchenko A. A.**, MD, Professor, Head of the Laboratory of Cell Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

**Kasparov E. V.**, MD, Professor, Director of the Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

**Matsenko M. V.**, Post-Graduate Student, Laboratory of Cell Molecular Physiology and Pathology, Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

**Kudryavtsev I. V.**, Ph.D., Laboratory of General Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia.

## ВИТАМИН Д – СТАТУС ДЕТЕЙ С РЕКУРРЕНТНЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

© 2019 г. Е. Г. Бугаенко<sup>1</sup>, Н. Л. Потапова<sup>2\*</sup>, И. Н. Гаймоленко<sup>2</sup>,  
А. Н. Власова<sup>2</sup>

\*E-mail: nataliapotap@yandex.ru

<sup>1</sup>ООО «ЭталонМед», Чита, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»  
Минздрава РФ, Чита, Россия

Поступила: 29.06.2019. Принята: 09.08.2019

Исследован уровень 25(ОН) гидроксиколекальциферола у здоровых, детей с рекуррентными респираторными заболеваниями и пациентов с бронхиальной астмой легкой степени тяжести. Установлено, что у детей с повторными респираторными инфекциями отмечается значимое снижение концентрации витамина Д на фоне нарастания общего сывороточного иммуноглобулина Е в сравнении с группой здоровых лиц. Пациенты с бронхиальной астмой легкой степени тяжести демонстрируют более низкие значения витамина Д.

**Ключевые слова:** витамин Д, дети, бронхиальная астма

DOI: 10.31857/S102872210007049-8

Адрес: 672090 Чита, ул. Горького, 39а, ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, кафедра поликлинической педиатрии.  
Тел./факс: +7(3022) 354324.

E-mail: nataliapotap@yandex.ru

**Авторы:**

**Бугаенко Е. Г.**, врач-педиатр высшей категории, ООО «ЭталонМед», Чита, Россия;

**Потапова Н. Л.**, к. м. н., доцент, заведующая кафедрой поликлинической педиатрии с курсом медицинской реабилитации ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Чита, Россия;

**Гаймоленко И. Н.**, д. м. н., профессор, заведующая кафедрой педиатрии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Чита, Россия;

**Власова А. Н.**, ассистент кафедры поликлинической педиатрии с курсом медицинской реабилитации ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Чита, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Острые респираторные заболевания являются наиболее частой патологией в детском возрасте. Рекуррентные респираторные инфекции часто наблюдаются у детей с аллергической предрасположенностью, что приводит к высокому риску развития бронхиальной астмы (БА) [1, 2]. Основными причинами сложности

наблюдения инфекционно нестабильных детей являются возрастные особенности иммунной системы, неблагоприятные экологические факторы, аллергические заболевания, персистирующие вирусные инфекции [3].

В течение последнего десятилетия в контексте возможного влияния на заболеваемость респираторными инфекциями посредством регуляции синтеза антимикробных пептидов рассматривается витамин Д и его активные формы. Анализ уровня витамина Д у лиц группы риска развития аллергических заболеваний и детей, сформировавших БА, позволит уточнить его роль в реализации аллергических заболеваний.

**Цель исследования:** сравнительный анализ уровня гидроксиколекальциферола у здоровых, лиц с рекуррентными респираторными инфекциями и больных БА легкой степени тяжести.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе ГУЗ ДКМЦ г. Читы (главный врач – И. В. Нардина), поликлиническое подразделение № 5, ГУЗ Краевой детской клинической больницы г. Читы (главный врач – В. В. Комаров) в период 2015–

2016 г. Обследовано 256 детей в возрасте от 3 до 10 лет. Дети распределены на следующие группы: с рекуррентными инфекциями респираторного тракта (n=118, первая группа) и относительно здоровые дети (n=65, вторая группа), дети с atopической бронхиальной астмой легкой степени тяжести (n=73, третья группа). Частота ОРЗ оценивалась за 12 месяцев до начала исследования.

Критерии включения в исследование: здоровые и дети из групп риска (имеющие повторные респираторные заболевания более 6 раз в год или индекс резистентности которых составил более 0,5, что соответствует низкой резистентности), дети с установленным диагнозом БА. Критерии исключения: нежелание пациента и (или) его родителей принимать участие в исследовании; наличие острого заболевания у пациента.

Первую группу составили дети в возрасте от 3 до 8 лет ( $6,4 \pm 1,1$  лет), из них мальчиков – 62 (52,5%), девочек – 56 (47,5%). Частота острых респираторных заболеваний в данной группе составила более 6 раз в год (в среднем  $9,3 \pm 1,9$ ). Четверть детей данной группы имели в анамнезе 2 и более обструктивных бронхита. Во вторую группу вошли дети в возрасте от 3 до 8 лет ( $6,3 \pm 1,2$  лет). Из них мальчиков – 34 (52%), девочек – 31 (48%). Острые респираторные заболевания в данной группе наблюдались не более 1–2 раз в год ( $1,6 \pm 1,0$ ). Третья группа представлена детьми в возрасте 3–10 лет, возраст ( $6,5 \pm 1,2$ ), соотношение мальчиков 50 (68,5%), девочек – 23 (31,5%). Наиболее частыми триггерами обострения бронхиальной астмы являлись: изолированно ОРВИ – 27 (37%), физическая нагрузка в сочетании с ОРВИ – 11 (15%).

У 183 детей проведено определение содержания 25 (ОН) гидроксивитамина Д в сыворотке крови с помощью тест-системы IDS OSTEIA, методом иммуноферментного анализа; определение концентрации IgE в сыворотке крови выполняли методом ИФА (анализатор «Expert 96») на диагностическом наборе «IgE общий – ИФА – БЕСТ» («Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием прикладных программ Microsoft Office, применялась компьютерная программа «STATISTICA 6.0». Количественные данные представлены в виде Me, 25 и 75 перцентилей. Значимость различий абсолютных величин между несвязанными группами определялась по

критерию Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование уровня общего сывороточного иммуноглобулина Е показало, что дети 1 группы имели концентрацию Ig E в 4,5 раза выше по сравнению со 2 группой, что составило 28,5 [1,85–1309] МЕ/мл и 7,40 [0,5–135,20] МЕ/мл соответственно,  $p = 0,04$ . Полученные данные подтверждают тенденцию к развитию аллергических заболеваний у детей данной группы. Третья группа пациентов характеризовалась значимым повышением уровня IgE – 156,5 [25,5–758,5] МЕ/мл.

У детей первой группы с повторными ОРЗ концентрация 25(ОН)D<sub>3</sub> в 2 раза ниже, чем у здоровых детей (34,7 [10,4–68,5] нмоль/л и 63,2 [32,4–191,1] нмоль/л соответственно,  $p = 0,05$ ), при этом у 2/3 детей отмечен недостаточный уровень 25-гидроксивитамина D. Во 2 группе у 3/4 детей зафиксировано недостаточное содержание 25-гидроксивитамина, у остальных детей (25,8%) наблюдалась нормальная концентрация 25(ОН)D<sub>3</sub>. В обеих группах не выявлено детей с выраженным дефицитом 25(ОН)D<sub>3</sub>. При легком течении бронхиальной астмы параметры обеспеченности витамином Д находились в зоне умеренного дефицита и составили 59,3 [28,5–73,75] нмоль/л.

## ВЫВОДЫ

- 1) Дети с рекуррентными инфекциями респираторного тракта имеют высокий уровень общего сывороточного иммуноглобулина Е.
- 2) Концентрация гидроксиколекальциферола в группе относительно здоровых детей соответствует референсным значениям, при увеличении частоты респираторных инфекций более 6 раз в год дефицит витамина Д наблюдается в 40% случаев.
- 3) БА легкой степени тяжести сопровождается недостаточностью 25 (ОН) гидроксивитамина Д в 78,8% случаев.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Древалъ А. В., Крюкова И. В., Барсуков И. А. и соавт. Внекостные эффекты витамина Д (обзор литературы). Русский медицинский журнал 2017; 1:53–56. [Dreval A. V., Kryukova I. V., Barsukov I. A. et al. Někotrye effects of vitamin D (review of literature). Russian medical journal 2017; 1:53–56.]

2. *Peçanha M. B., Freitas R. B., Moreira T. R., Silva L. S., Oliveira L. L., Cardoso S. A.* Prevalence of vitamin D deficiency and its relationship with factors associated with recurrent wheezing. *J Bras Pneumol.* 2019 Feb 11;45(1): e20170431.
3. *Hejazi M. E., Modarresi-Ghazani F., Entezari-Maleki T.* A review of Vitamin D effects on common respiratory diseases: Asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and tuberculosis. *J Res Pharm Pract.* 2016 Jan-Mar; 5(1): 7–15.

## VITAMIN D STATUS OF CHILDREN WITH RECURRENT INFECTIONS AND ASTHMA

© 2019 E. G. Bugaenko<sup>1</sup>, N. L. Potapova<sup>2\*</sup>, I. N. Gaymolenko<sup>2</sup>, A. N. Vlasova<sup>2</sup>

\*E-mail: nataliapotap@yandex.ru

<sup>1</sup>OOO “EtalonMed”, Chita, Russia;

<sup>2</sup>Chita State Medical Academy, Chita, Russia

Received: 29.06.2019. Accepted: 09.08.2019

The level of 25(OH) hydroxycholecalciferol in healthy children with recurrent respiratory diseases and patients with mild bronchial asthma was studied. It was found that in children with repeated respiratory infections there was a significant decrease in the concentration of vitamin D against the background of an increase in total serum immunoglobulin E in comparison with a group of healthy individuals. Patients with bronchial asthma of mild severity demonstrate lower values of vitamin D.

*Key words:* vitamin D, children, asthma

### Authors:

**Bugaenko E. G.**, pediatrician OOO “EtalonMed”, Chita, Russia;

**Potapova N. L.**, ✉ PhD, Head of the Department of Outpatient Pediatrics with a course of medical rehabilitation Chita State Medical Academy, Chita, Russia;

**Gaymolenko I. N.**, Dr. Sc., professor, Head of the Department of Pediatrics Chita State Medical Academy, Chita, Russia;

**Vlasova A. N.**, assistant of the Department of Outpatient Pediatrics with a course of medical rehabilitation Chita State Medical Academy, Chita, Russia.

## ГИСТАМИНЛИБЕРАЦИЯ И ДИНАМИКА CD45 ЛЕЙКОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ НЕПЕРЕНОСИМОСТЬЮ (ЛН)

© 2019 г. Ж. П. Васнева\*, М. В. Мокеева

\*E-mail: [vasneva@list.ru](mailto:vasneva@list.ru)

АО «Самарский диагностический центр», Самара, Россия

Поступила: 16.07.2019. Принята: 23.08.2019

У пациентов с непереносимостью местных анестетиков (МА) исследовали специфическую активацию лейкоцитов методом цитометрии по динамике экспрессии CD45 (CD45-тест) и гистаминлиберацию лейкоцитов. В CD45-тесте активация лейкоцитов отмечалась в 80%. Повышенная спонтанная гистаминлиберация лейкоцитов отмечалась у 36,4%, стимулированная – 67,7%, в тест-системе с МА – 27,3% пациентов.  $K_{CD45}$  коррелировал со спонтанной гистаминлиберацией ( $r = -0,46$ ,  $p = 0,002$ ), стимул. ( $r = -0,43$ ,  $p = 0,013$ ) и МА – стимул. ( $r = -0,28$ ,  $p = 0,07$ ).

**Ключевые слова:** CD45-тест, лекарственная непереносимость, местные анестетики, гистаминлиберация

DOI: 10.31857/S102872210007050-0

Адрес: 443093, г. Самара, ул. Мяги, д. 12, кв. 59, Васнева Ж. П.  
Тел.: 8 9033 085 869. E-mail: [vasneva@list.ru](mailto:vasneva@list.ru)

### Авторы:

**Васнева Ж. П.**, к.б.н., врач-лаборант высшей категории отдела лабораторной диагностики АО «Самарский диагностический центр», Самара, Россия; e-Library SPIN: 3019–7502;  
**Мокеева М. В.**, к.м.н., врач высшей категории консультативно-поликлинического отдела АО «Самарский диагностический центр», Самара, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Появление новых малотоксичных МА, увеличение разнообразия форм выпуска препаратов привело к увеличению встречаемости ЛН. Такие реакции на стоматологическом приеме регистрируются в 3,2–7%, среди госпитализированных пациентов – в 1,75–3%, среди которых неотложные состояния составляют 12,8% случаев [1, 2]. Отмечено, что МА оказывают разностороннее действие на компоненты системы иммунитета в системе *in vitro*. Получены доказательства противовоспалительного действия МА за счет блокирования выброса медиаторов воспаления нейтрофилами и моноцитами. Отмечается и антигистаминное действие МА на тучные клетки, носящее дозозависимый характер [3]. Доказана и аллергическая реактивность

на МА, в ряде случаев, обусловленная тем, что МА активируют Т-клетки в качестве гаптенов (гаптенная концепция). Так, по данным Лебедева К. А. (2005), среди компрометированных пациентов таковая варьирует от 9,84% до 37,0%. По другим данным, аллергический характер реакций на МА подтверждается только в 3,2–5,3% случаев либо не подтверждается вовсе [2, 3]. В клинической практике все более возрастает потребность в лабораторных методах, позволяющих оценить безопасность МА у компрометированных пациентов. По нашим данным, возрастает и доля детей, нуждающихся в такого рода обследовании. Однако, единого протокола обследования пациентов с ЛН не существует ни в России, ни за рубежом. Так, в Европе и на Украине рекомендуются прик и внутрикожные тесты [2]. В ряде европейских стран используют триптазу в сыворотке крови в качестве маркера анафилаксии [4]. В России же отдают предпочтение лабораторной диагностике *in vitro*. Так, использование методов клеточной диагностики показало, что в тест-системе с МА отмечается реакция дегрануляции тучных клеток в 2,1% случаев, лейкоцитоз в 43,2%, снижение уровня CD45-лейкоцитов в 54,5% случаев пациентов с непереносимостью МА [1, 5]. Что

касается использования гистаминлибераторных тестов, то ранее нами было показано, что гистаминлиберация лейкоцитами периферической крови в тест-системе с МА отмечалась в 45,75% пациентов с ЛН. Однако, здесь необходимо принимать во внимание тот факт, что разброс индивидуальных показателей уровня сывороточного гистамина достаточно широк. Кроме того, у пациентов с аллергическими заболеваниями может наблюдаться повышенный уровень как спонтанной, так и стимулированной либерации гистамина клетками иммунной системы. В связи с этим **целью** данной работы явилось исследование сопряженности динамики экспрессии антигена CD45 и гистаминлибераторной способности у пациентов с непереносимостью МА.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовали 44 человека (22 взрослых, средний возраст 46,8 лет и 22 ребенка 3–7 лет) за 2018 год с непереносимостью МА в анамнезе. В периферической крови определяли КС<sub>CD45</sub> к МА (микст: лидокаин, новокаин, скандонест и артикаин) с помощью CD45-теста с использованием меченых ФИТЦ МКАТ к антигену CD45 (серия LT, Россия) и цитофлюориметра FacsCaliburBD (США) [патент № 2295726 РФ], плазменную, спонтанную (Гист<sub>сп</sub>), неспецифически (Гист<sub>стим</sub>) и МА-стимулированную либерацию гистамина (Гист<sub>МА</sub>), коэффициент либерации гистамина (Кгист) с использованием ИФТС (Германия). Математическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS11.5. Корреляционную зависимость оценивали по Спирману ( $r$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение экспрессии CD45 на лейкоцитах ( $КС_{CD45} > 0,3$ ) в тест-системе с МА у всех обследованных отмечалось в 80% случаев. Во всех случаях уровень гистамина в плазме крови не превышал 1,0 нг/мл. Повышенная Гист<sub>сп</sub> ( $> 1,0$  нг/мл) наблюдалась у 36,4% пациентов, уровень гистамина во всех случаях не превышал 10,0 нг/мл и, в среднем, составил  $1,16 \pm 1,55$ . Отмечалась обратная корреляционная зависимость средней силы между  $КС_{CD45}$  и Гист<sub>сп</sub> ( $r = -0,46, p = 0,002$ ). В группе детей повышенная Гист<sub>сп</sub> наблюдалась в 45,5% случаев (10 чел.). Во всех случаях таковая не превышала 10,0 нг/мл, средний уровень гистамина —  $1,6 \pm 1,9$  нг/мл.

В группе взрослых повышенная Гист<sub>сп</sub> наблюдалась в 18,2% случаев (6 чел.). Во всех случаях таковая не превышала 10,0 нг/мл, средний уровень гистамина,  $0,72 \pm 0,96$  нг/мл. Повышенный Гист<sub>стим</sub> отмечался в 67,7% (21 чел.) (средний уровень гистамина —  $8,6 \pm 9,2$  нг/мл), среди которых у 52,4% (11 чел.) уровень гистамина в пределах 1–10 нг/мл, 28,6% (6 чел.) — 10–20 нг/мл, 19% (4 чел.) — более 20 нг/мл. Отмечалась обратная корреляционная зависимость средней силы между  $КС_{CD45}$  и Гист<sub>стим</sub> ( $r = -0,43, p = 0,013$ ). В группе детей повышенный Гист<sub>стим</sub> отмечался в 86,7% случаев (13 чел.) (средний уровень гистамина —  $12,1 \pm 9,7$  нг/мл), среди которых в 46% таковой находился в пределах 1,0–10,0 нг/мл, в 23% — 10–20 нг/мл и в 31% — более 20 нг/мл. У взрослых повышенный Гист<sub>стим</sub> отмечался в 41,2% случаев (9 чел.) (средний уровень гистамина —  $5,6 \pm 8,1$  нг/мл) и во всех случаях не превышал 10 нг/мл.

Повышенная либерация Гист<sub>МА</sub> наблюдалась в 27,3% (12 чел.), среди которых в 91,7% не превышала 10 нг/мл (средний уровень гистамина —  $1,46 \pm 2,7$  нг/мл). Отмечалась слабая обратная корреляция между Гист<sub>МА</sub> и  $КС_{CD45}$  ( $r = -0,28, p = 0,07$ ). У детей повышенная Гист<sub>МА</sub> наблюдалась в 22,7% (5 чел.), среди которых в 80% не превышала 10 нг/мл (средний уровень гистамина —  $1,85 \pm 3,5$  нг/мл). Повышенный Кгист (более 1,05) отмечался в 36,4% детей. В группе взрослых повышенная Гист<sub>МА</sub> отмечалась в 27,3% случаев (6 чел.) и во всех случаях не превышала 10 нг/мл (средний уровень гистамина —  $1,1 \pm 1,55$  нг/мл). Повышенный Кгист отмечался в 54,5%. В совокупной группе пациентов в 93,2% (41 чел.) повышенный Гист<sub>МА</sub> сопровождался снижением экспрессии CD45 на лейкоцитах ( $КС_{CD45} > 0,3$ ). На фоне снижения экспрессии CD45 на лейкоцитах в пробе с МА ( $КС_{CD45} > 0,3$ ) в 16% случаев (7 человек) отмечалась как повышенная либерация Гист<sub>стим</sub>, так и Гист<sub>МА</sub>, в 15,6% случаев (5 человек) только Гист<sub>МА</sub>.

Таким образом, можно заключить, что спонтанная и неспецифически стимулированная либерация гистамина лейкоцитами у детей выражена в большей степени, чем у взрослых. Тогда как степень либерации гистамина в тест-системе *in vitro* с МА у взрослых превышает таковую детей. Выявлена статистически достоверная сопряженность динамики экспрессии антигена CD45 и гистаминлиберации лейкоцитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бровка Д. К., Юдина Н. А. Сравнительная информативность методов диагностики сенсibilизации к местным анестетикам. Медицинские новости 2015, № 11, 50–53. [Brovka D. K., Uydina N. A. Comparative informativity of diagnostic methods of local anesthetics sensibilisation. Medicine news 2015, No. 11, 50–53].
2. Зайков С. В. Современные подходы к диагностике и оказанию неотложной помощи при анафилаксии. Новости медицины и фармации 2013, № 17, 50–52. [Zaikov S. V. Modern approach to the diagnostic and emergency care on the anaphylaxia. News of medicine and farmacia 2013, No. 17, 50–52]
3. Librowski T., Pytka K., Rapacz A. Antihistaminic activity of lidocaine derivatives in the isolated guinea pig ileum. Acta biologica Cracoviencia Series Zoologia 2012, 54, 25–28.
4. Lukawska J., Caballero M. R., Tsabouri S., Dugue P. Hypersensitivity to local an aesthetics—6 facts and 7 myths. Current Allergy & Clinical Immunology 2009, 22(3), 117–120.
5. Nurpeissov T., Avdugalieva A. Features of hypersensitivity to local anesthetics based on articainum in tests in vitro. Clinical and Translational Allergy 2014, 130.

## HISTAMINLIBERATION AND CD45 DYNAMIC IN DRUG HYPERSENSITIVITY (DHS) PATIENTS

© 2019 Zh. P. Vasneva\*, M. V. Mokeeva

\*E-mail: vasneva@list.ru

Samara Diagnostic Centre, Samara, Russia

Received: 16.07.2019. Accepted: 23.08.2019

The leucocyte specific activations on the dynamic expression of CD45-antigen (CD45-test) by the flow cytometry, the leucocyte histaminliberation nonspecific and specific (to the local anaesthetics (LA)) in the DHS patients were assessed *in vitro*. The leucocyte activation in the DHS patients was revealed in 80% by CD45-test. Increased spontaneous leucocyte histaminliberation – in 36,4%, nonspecific stimulated – 67,7%, LA-stimulated – 27,3% pts.  $КC_{CD45}$  were correlated with spontaneous histaminliberation ( $r = -0,46$ ,  $p=0,002$ ), stimulated histaminliberation ( $r = -0,43$ ,  $p=0,013$ ) и LA-stimulated histamine-liberation ( $r = -0,28$ ,  $p = 0,07$ ).

*Key words:* CD45-test, drug hypersensitivity, local anaesthetics, histaminliberation

### Authors:

Vasneva Zh. P., ☒ PhD, laborant doctor of the Samara Diagnostic Centre, Samara, Russia. E-mail: vasneva@list.ru;

Mokeeva M. V., PhD, doctor of the Samara Diagnostic Centre, Samara, Russia.



## ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРА СЕНСИБИЛИЗАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (АЗ)

© 2019 г. Ж. П. Васнева\*, М. В. Мокеева

\*E-mail: [vasneva@list.ru](mailto:vasneva@list.ru)

АО «Самарский диагностический центр», Самара, Россия

Поступила: 16.07.2019. Принята: 19.08.2019

Исследовали уровни специфических IgE-антител (IgE-АТ) к бытовым, пищевым, пылевым и лекарственным аллергенам, динамику CD45 в тест-системе с лекарственными препаратами (ЛП) у пациентов с АЗ. Наиболее часто повышенные уровни IgE-АТ отмечаются к пылевым (30,8%) аллергенам, к эпидермальным – 24,6%, пищевым – 25,5% случаев. При лекарственной непереносимости (ЛН) наиболее востребованным является CD45-тест (КС<sub>CD45</sub>) с анестезирующими средствами (76%), среди которых 61,8% составляют исследования с местными анестетиками (МАН). Повышенные КС<sub>CD45</sub> наиболее часто отмечались в тест-системе с лидокаином (30%) и ультракаином (21,4%), среди препаратов для предоперативного скрининга – к кетамину (20%) и диазепаму (17%).

**Ключевые слова:** IgE-АТ, CD45-тест, аллергены

DOI: 10.31857/S102872210007051-1

Адрес: 443093, г. Самара, ул. Мяги, д. 12, кв. 59, Васнева Ж. П.  
Тел.: 8 9033 085 869. E-mail: [vasneva@list.ru](mailto:vasneva@list.ru)

**Авторы:**

**Васнева Ж. П.**, к.б.н., врач-лаборант высшей категории отдела лабораторной диагностики АО «Самарский диагностический центр», Самара, Россия; e-Library SPIN: 3019–7502;

**Мокеева М. В.**, к.м.н., врач высшей категории консультативно-поликлинического отдела АО «Самарский диагностический центр», Самара, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе отмечается неуклонный рост распространенности АЗ, что является не только медицинской, но и социальной проблемой. По данным статистики, за последние два десятилетия частота АЗ увеличилась в 3–4 раза и составила в странах Европы и в России от 15 до 35% населения, в экологически неблагоприятных районах – до 60%. Кроме того, отмечается тенденция к омоложению и утяжелению течения АЗ, в частности дыхательных путей [1, 2, 3]. Многими исследователями отмечается «Феномен айсберга», при котором симптомы аллергии отмечаются чаще, чем диагностируются сами заболевания [3]. Известно, что патогенез АЗ может быть представлен 4 иммунологическими механизмами, по отдельности или сочетано [2]. Основным этапом при обследовании таких пациентов является выявление причинного аллер-

гена. Здесь, лабораторная диагностика, в основном, исчерпывается определением свободно циркулирующих в периферической крови аллергенспецифических антител. Так, наиболее часто повышенные уровни IgE-АТ у пациентов с АЗ регистрируются к респираторным аллергенам: в 58% – к пылевым аллергенам, 22% – эпидермальным, 18% – бытовым [4]. Лекарственная непереносимость (ЛН) наблюдается в 10–30% случаев пациентов с АЗ. По нашим данным, уровни IgE-АТ более 200 КЕ/л к антибиотикам отмечались в 11,8%, местным анестетикам (МАН) – 27%, витаминам – 7,3%, гормональным препаратам – 5,5%, НПВС – 4,4% случаев [5].

В связи с тем, что показатели сенсibilизации к одному и тому же аллергену могут сильно варьировать в зависимости от состояния организма пациента и возможностей используемых лабораторных методов мы задались целью оценить доминирующий спектр сенсibilизации и востребованность методов клеточной диагностики ЛН у пациентов с АЗ Поволжского региона.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовали взрослых Поволжского региона за 2016–2018 гг. с АЗ в анамнезе. В периферической крови определяли коэффициент сенсibilизации (КС<sub>CD45</sub>) к ЛП (антибиотики,

анестезирующие и анальгезирующие средства, витамины) с помощью CD45-теста с использованием меченых ФИТЦ МКАТ к антигену CD45 (серия LT, Россия) и цитофлюориметра FacsCaliburBD (США) [патент № 2295726 РФ], уровни специфических IgE-АТ к бытовым, пищевым и пыльцевым аллергенам с использованием RIDA SCREEN Panel 1 (Германия), к ЛП (антибиотики, местные анестетики (МА), витамины, анальгезирующие, гормональные и антигистаминные средства, НПВС) с использованием ИФТС (Ставрополь).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов аллергологического обследования показал, что при использовании RIDA SCREEN Panel 1 повышенные уровни IgE-АТ (более 0,35 МЕ/мл), в среднем, регистрируются у 11,6% пациентов с АЗ. Наиболее часто (30,8%) отмечаются повышенные уровни IgE-АТ к пыльцевым аллергенам (смесь трав, береза, дуб, подорожник, полынь), к эпидермальным (кошка, лошадь, собака) и пищевым (яйцо, молоко, арахис, фундук, морковь, мука пшеничная, соя) в 24,6% и 25,5% случаев, соответственно, к бытовым (домашняя пыль, *Dermatophagoides pteronissinus* и *farinae*) и грибковым (Альтернария) – в 10,1% и 9,0% случаев, соответственно. Отмечается сезонная ритмичность показателей уровней IgE-АТ в зависимости от групповой принадлежности аллергена. Так, в зимний период повышенные уровни IgE-АТ к пыльцевым, пищевым, эпидермальным, бытовым и грибковым аллергенам составили 39%, 24,7%, 17%, 8,8% и 10,4%, соответственно. В летний период – 25%, 28%, 27,3%, 10,6% и 9%, соответственно. Можно отметить, что в зимний период (декабрь, январь, февраль) повышенные уровни IgE-АТ к пыльцевым аллергенам встречаются чаще, чем в летний. Тогда как в летний период (июнь, июль, август) таковые к эпидермальным аллергенам наблюдаются чаще, чем в зимний. Среди пыльцевых аллергенов наиболее часто сопровождаются повышенными уровнями IgE-АТ такие, как рожь (зима – 20%, лето – 18%), смесь трав (зима – 18,3%, лето – 21,2%) и береза (зима – 14%, лето – 21% случаев). Среди эпидермальных – шерсть кошки и собаки (37,6% и 42%, соответственно), среди пищевых – молоко (лето – 51%, зима – 29% случаев).

Повышенные уровни IgE-АТ к ЛП отмечались в 8,3% случаев (2016 г. – 5,7%, 2017 г. – 8,35%, 2018 г. – 10,8%). Наиболее часто (56,3% случаев)

повышенные IgE-АТ регистрировались к антибиотикам, к препаратам остальных групп – менее 10% случаев. Анализ результатов обследования пациентов с АЗ с использованием CD45-теста показал, что наиболее востребованными оказались исследования на анестезирующие средства (76% случаев), анальгезирующие средства – 6%, йодконтрастные вещества – 5%, антибиотики – 4%, витамины – 1,5% и прочие – 11% случаев. К 2018 году отмечается рост количества исследований с использованием CD45-теста на 18%. Можно отметить, что количество исследований на МА также ежегодно устойчиво возрастает: в 2017 году – на 21,8%, в 2018 году – на 18,5% относительно предыдущего года. В структуре потока пациентов на CD45-тест доля исследований к анестезирующим средствам (для предоперативного скрининга и МА) в течение 3-х лет была постоянной и составила 73,5%, доля исследований с МА незначительно колебалась (58,5%, 67% и 60% в 2016 г., 2017 г. и 2018 г., соответственно). Количество исследований к МА ежегодно устойчиво нарастает: 2017 г. – на 39,3%, 2018 г. – на 6,3%. Количество исследований к препаратам для предоперативного скрининга в 2018 г. возросло в 1,9 раз относительно предыдущих годов.

Повышенные  $КС_{CD45}$  ( $> 0,3$ ) к МА у обследованных пациентов отмечались в 35% случаев, к препаратам для предоперативного скрининга – в 33%. Анализ индивидуальной аллергенности ЛП показал, что среди МА наиболее часто повышенные КС отмечались в тест-системе с лидокаином и ультракаином (30% и 21,4% случаев, соответственно), среди препаратов для предоперативного скрининга – к кетамину (20% случаев) и диазепаму (17% случаев). Повышенные уровни IgE-АТ к МА у обследованных пациентов отмечались менее, чем в 5% случаев.

Таким образом, можно заключить, что у пациентов с АЗ превалирует пыльцевая сенсibilизация сезонного характера. У пациентов с ЛН повышенные значения  $КС_{CD45}$  в тест-системе с ЛП регистрируются значительно чаще по сравнению с показателями уровня специфических IgE-АТ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Brozek J. L., Bousquet J., Baena-Cagnati C. E., et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 126, 466–476.
2. Хаитов Р. М., Ильина Н. И. Аллергология и иммунология. Национальное руководство: краткое издание. Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2012, 634 с.

- [Chaitov R. M., Iina N. I. Allergy and immunology. National rucovodstvo: kratkoe izdanie. Moscow: GEOTAR-Media. 2012, 634 p.].
3. Шумная Т. Е. Эпидемиология аллергических заболеваний у детей – жителей промышленного региона. Педиатрия. 2015, т. 94, № 4, 189–192. [Shumnaya T. E. Epidemiology of allergy diseases in children – habitants of industrial region. *Pediatrya*. 2015, V.94, No4, 189–192].
  4. Симакова Н. Ю., Григорян М. С., Аникина А. Н. с соавт. Лабораторная диагностика аллергических заболеваний. Медицинская иммунология. 2017, Т. 19, Специальный выпуск, 98. [Simakova N. U., Grigoryan M. S., Anikina A. N. et al. Laboratory diagnostic of allergy diseases. *Medicine immunology*. 2017, V.19, Special edition, 98].
  5. Васнева Ж. П. Уровни специфических антител к лекарственным препаратам. Российский иммунологический журнал. 2012, т. 6(4), № 3(1), 53–54. [Vasneva Zh. P. The level of specific antibody to the drug. *Russian immunology journal*. 2012, V.6(4), No3(1), 53–54].

## CHARACTERISTIC OF SENSIBILISATION SPECTRUM IN ATOPIC

© 2019 Zh. P. Vasneva\*, M. V. Mokeeva

\*E-mail: vasneva@list.ru

Samara Diagnostic Centre, Samara, Russia

Received: 16.07.2019. Accepted: 19.08.2019

The spIgE to the different allergens and CD45 antigen dynamic ( $K_{CD45}$ ) to the drug *in vitro* were assessed in atopic. The increased spIgE levels to the plant (30,8%), epidermal (24,6%) and food (25,5%) allergens were revealed. The CD45-test with the anaesthetics were most popular (76%), among the local anaesthetics were 61,8% cases. The increased value  $K_{CD45}$  to the lidocain (30%) and ultracaine (21,4%) among local anaesthetics and to the ketamine (20%) and diazepam (17%) among preoperative screening drug were revealed.

*Key words:* specific IgE, CD45-test, allergens

### Authors:

Vasneva Zh. P., ✉ PhD, laborant doctor of the Samara Diagnostic Centre, Samara, Russia. E-mail: vasneva@list.ru;  
Mokeeva M. V., PhD, doctor of the Samara Diagnostic Centre, Samara, Russia.

## РОЛЬ ВИСФАТИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

© 2019 г. М. А. Вульф\*, Д. А. Скуратовская, А. Р. Соболева, С. А. Степанян,  
Е. В. Кириенкова, Л. С. Литвинова

\*E-mail: mary-jean@yandex.ru

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»  
Калининград, Россия

Поступила: 18.07.2019. Принята: 26.08.2019

В работе проведено исследование тканеспецифических особенностей экспрессии гена *NAMPT*, кодирующего висфатин. У больных ожирением с СД 2 типа регистрируются нарушение инсулин-протекторного механизма действия висфатина на ткани, что подтверждается положительными взаимосвязями уровня висфатина с лептином и инсулином в циркуляции.

**Ключевые слова:** адипокины, ожирение, инсулин, висфатин

DOI: 10.31857/S102872210007052-2

**Адрес:** 236029 Калининград, ул. Гайдара, 6, «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, Вульф Мария Александровна. Тел.: 595–595 доб. 6634;

**E-mail:** mary-jean@yandex.ru

**Авторы:**

**Вульф М. А.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «БФУ имени Им. Канта» Калининград, Россия;

**Скуратовская Д. А.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «БФУ имени Им. Канта» Калининград, Россия;

**Соболева А. Р.**, студент медицинского института ФГАОУ ВО «БФУ имени Им. Канта» Калининград, Россия;

**Степанян С. А.**, студент медицинского института ФГАОУ ВО «БФУ имени Им. Канта» Калининград, Россия;

**Кириенкова Е. В.**, к.б.н. научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «БФУ имени Им. Канта» Калининград, Россия;

**Литвинова Л. С.**, д.м.н. заведующая лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «БФУ имени Им. Канта» Калининград, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Висфатин (Никотинамидфосфорибозил-трансфераза) — адипокин, колониестимулирующий фактор прекурсоров В-клеток. В отношении прогрессии сахарного диабета 2 типа (СД 2 типа), висфатин оказывает разнонаправленное действие [1] — провоспалительное, стимулируя продукцию воспалительных цитокинов [3], и нейро-, ангиопротекторное [2]. Кроме

того, адипокин обладает инсулиномиметическим эффектом и стимулирует продукцию инсулина [1]. В связи с этим, целью данной работы явилось исследование роли висфатина в развитии СД 2 типа у больных ожирением.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании задействовано две группы пациентов: 89 пациентов с ожирением без СД 2 типа (47 мужчин, 42 женщины, ИМТ=22,6±2,7 кг/м<sup>2</sup>, 39,5±7,6 лет), 77 пациентов с ожирением с СД 2 типа (31 мужчин, 46 женщин, ИМТ=33,149±4,79 кг/м<sup>2</sup>, 43,5±8,2 лет). В контрольную группу вошло 64 здоровых донора (35 мужчин, 29 женщин, ИМТ=22,6±2,7 кг/м<sup>2</sup>, 39,5±7,6 лет) имеющие нормальные антропометрические характеристики и биохимические показатели углеводного и липидного обменов. Со всеми пациентами было подписано информированное добровольное согласие на исследование, разрешение на проведение исследования ЛЭК № 4 от 23 ноября 2013 г.

Материалом исследования служила периферическая венозная кровь и биоптаты жировой ткани трёх разных локализаций: большой сальник, брыжейка тонкого кишечника и подкожная жировая ткань. Содержание уровня глюкозы в сыворотке крови определяли на биохимическом анализаторе Furuno CA-180 «Dia Sys Diagnostic

Systems» (Германия). Методом проточной флюориметрии (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) определяли содержание висфатина, инсулина и лептина в плазме крови с использованием коммерческих тест-систем (Bio-Plex Pro Human Diabetes 10-Plex Assay, США).

Выделение РНК из жировой ткани осуществлялось с использованием реагента Extract RNA kit (Евроген, Россия). Обратную транскрипцию образцов РНК проводили с использованием набора реагентов MMLV RT kit (Евроген, Россия). Для определения уровня экспрессии генов, проводили количественную ПЦР в режиме реального времени с использованием реагентов qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве нормировочного гена использовали  $\beta$ -microglobulin. Статистический анализ был осуществлен с использованием программы SPSS Statistics 21. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе больных ожирением с СД 2 типа содержание лептина, инсулина и глюкозы в плазме крови ожидаемо было выше, чем у больных без СД 2 типа и контрольных величин ( $p < 0,05$ ). В данной группе уровень висфатина в плазме крови был выше, чем у пациентов с ожирением без СД 2 типа (802,10 (101,0–1145,12) пг/мл против 371,81 (40,83–513,58) пг/мл), однако ниже контрольных значений ( $p < 0,05$ ). В группе больных ожирением с СД 2 типа уровень висфатина положительно коррелировал с уровнем лептина ( $r = 0,513$ ) и отрицательно с уровнем инсулина ( $r = -0,435$ ) ( $p < 0,05$ ). Однако у больных без СД 2 типа уровень висфатина имел положительные взаимосвязи с содержанием инсулина ( $r = 0,812$ ) и лептина ( $r = 0,767$ ) в плазме крови ( $p < 0,05$ ). Данные взаимосвязи могут указывать на нарушение механизма действия висфатина у больных ожирением с СД 2 типа.

Уровень экспрессии гена *NAMPT*, кодирующего висфатин был повышен у всех пациентов с ожирением с СД 2 типа во всех жировых депо, по сравнению с больными ожирением без него. У больных ожирением с СД 2 типа уровень экспрессии гена *NAMPT* в подкожной жировой ткани был выше в 15 раз относительно контрольной группы ( $p < 0,05$ ), тогда как у больных без СД 2 типа таковой не отличался от контроля, что может указывать на формирование плазменного уровня адипокина, главным образом,

за счет его продукции в подкожном жировом депо. Уровень экспрессии гена *NAMPT* не отличался от контроля в висцеральной жировой ткани (большом сальнике и брыжейке тонкого кишечника) ( $p > 0,05$ ).

Уровень экспрессии гена *NAMPT* в большом сальнике положительно коррелировал с уровнем висфатина в плазме крови в группе больных ожирением с СД 2 типа ( $r = 0,750$   $p < 0,05$ ). Уровень экспрессии гена *NAMPT* в брыжейке тонкого кишечника отрицательно коррелировал с ИМТ в группе больных ожирением с СД 2 типа ( $r = 0,805$   $p < 0,05$ ). Данные взаимосвязи позволяют предположить наличие тканеспецифических эффектов висфатина.

Таким образом, висфатин может оказывать разнонаправленные эффекты в отношении развития СД 2 типа у больных ожирением, опосредованные тканеспецифическими особенностями его секреции, на что указывает (1) формирование плазменного уровня адипокина за счет подкожного жирового депо у больных СД 2 типа; (2) выявленные протекторные эффекты висфатина у больных ожирением без СД 2 типа, опосредованные положительной взаимосвязью этого адипокина с продукцией инсулина в плазме крови.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18-015-00084-а (сбор биоматериала); при финансовой поддержке РФФИ и КО в рамках научного проекта № 19-415-393004\_p\_мол\_a (биохимический анализ) и 19-44-390005\_p\_a (проточная флюориметрия) и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2019/ВУ» Балтийского федерального университета им. И. Канта

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Chang YH, Chang DM, Lin KC, Shin SJ, Lee YJ. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011 Sep;27(6):515–27. doi: 10.1002/dmrr.1201.
2. Wang SN, Miao CY. Targeting NAMPT as a therapeutic strategy against stroke. *Stroke Vasc Neurol*. 2019 Apr 5;4(2):83–89. doi: 10.1136/svn-2018-000199.
3. Lin YT, Chen LK, Jian DY, Hsu TC, Huang WC, Kuan TT, Wu SY, Kwok CF, Ho LT, Juan CC. Visfatin Promotes Monocyte Adhesion by Upregulating ICAM-1 and VCAM-1 Expression in Endothelial Cells via Activation of p38-PI3K-Akt Signaling and Subsequent ROS Production and IKK/NF- $\kappa$ B Activation. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(6):1398–1411. doi: 10.33594/000000098.

**ROLE OF VISFATIN IN THE PATHOGENESIS OF INSULIN RESISTANCE**

© 2019 M. A. Vulf \*, D. A. Skuratovskaya, A. R. Soboleva, S. A. Stepanian,  
E. V. Kirienkova, L. S. Litvinova

\*E-mail: mary-jean@yandex.ru

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received: 18.07.2019. Accepted: 26.08.2019

We have studied the tissue-specific features of the expression of the *NAMPT* gene encoding visfatin. In patients with obesity with type 2 diabetes, a violation of the insulin-protective mechanism of the effect of visfatin on tissue is recorded, which is confirmed by the positive correlations of the level of visfatin with leptin and insulin in the circulation.

*Key words:* adipokines, obesity, insulin, visfatin

**Authors:**

**Vulf M. A.**, ✉ PhD, researcher of Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia. **E-mail:** mary-jean@yandex.ru;

**Skuratovskaya D. A.**, PhD, researcher of Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies Immanuel Kant Baltic Federal University Kaliningrad, Russia;

**Sobolev A. R.**, student at the Medical Institute Immanuel Kant Baltic Federal University Kaliningrad, Russia;

**Stepanyan S. A.**, student at the Medical Institute Immanuel Kant Baltic Federal University Kaliningrad, Russia;

**Kirienkova E. V.**, PhD, researcher of Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies Immanuel Kant Baltic Federal University Kaliningrad, Russia;

**Litvinova L. S.**, MD, PhD Head of the Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University Kaliningrad, Russia.

## МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ ОБСТРУКЦИИ У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

© 2019 г. И. Н. Гаймоленко\*, А. И. Петрова, Н. Л. Потапова

\*E-mail: [ingaim@mail.ru](mailto:ingaim@mail.ru)

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»  
Минздрава РФ, Чита, Россия

Поступила: 20.06.2019. Принята: 29.07.2019

Исследованы сывороточные концентрации IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TFN- $\alpha$ , MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  у детей с острыми бронхитами. Установлено, что у детей с острым бронхитом в целом (n = 87) отмечается статистически значимо высокий уровень IL-8, IFN- $\beta$ , MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  в сравнении с группой контроля. Обнаружено, что концентрация MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  в группе детей с острым простым бронхитом в два раза выше, чем у детей с острым обструктивным бронхитом, что свидетельствует о преобладании клеточной фазы иммунного ответа над гуморальной. Иммунологическими маркерами острого обструктивного бронхита являются более низкие концентрации MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  в сыворотке крови, при высоких значениях IL-10, что подтверждает значимость Th2-пути в патогенезе бронхиальной обструкции.

**Ключевые слова:** острый бронхит, дети раннего возраста, цитокины, хемокины

DOI: 10.31857/S102872210007053-3

Адрес: 672090 Чита, ул. Горького, 39а, ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, кафедра педиатрии. Тел./факс: +7(3022) 354324.

E-mail: [ingaim@mail.ru](mailto:ingaim@mail.ru)

**Авторы:**

**Гаймоленко И. Н.**, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой педиатрии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Чита, Россия;

**Потапова Н. Л.**, к.м.н., заведующая кафедрой поликлинической педиатрии с курсом медицинской реабилитации ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Чита, Россия;

**Петрова А. И.**, аспирант кафедры педиатрии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Чита, Россия.

токинов и их влияния на иммунорегуляторные и эффекторные иммунные механизмы [3, 4]. Наличие синдрома бронхиальной обструкции у детей дошкольного возраста является фактором риска развития бронхиальной астмы [5]. Выявление маркеров воспаления при различных вариантах бронхитов у детей позволяет уточнить иммунологические механизмы формирования бронхиальной обструкции.

**Цель исследования:** изучение сывороточных концентраций IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TFN- $\alpha$ , MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  у детей с острыми бронхитами.

### ВВЕДЕНИЕ

Заболевания органов дыхания являются самой распространенной патологией детского дошкольного возраста. Частота острых бронхитов среди детей данной возрастной группы составляет от 70 до 220 случаев на 1000 [1, 2]. В этиологической структуре острых бронхитов у детей лидируют вирусные бронхиты, которые диагностируются в 80–90% случаев. Клиническая картина и особенности течения инфекционных заболеваний зависят от уровней продукции ци-

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе ГУЗ Краевой детской клинической больницы г. Читы с сентября 2017 по март 2018 гг. Под наблюдением находилось 87 детей, получавших стационарное лечение в отделении пульмонологии, в возрасте от 1 года до 5 лет. Диагноз острого бронхита установлен в соответствии с критериями общепринятой Классификации клинических форм бронхолегочных заболеваний у детей (2009). Острый обструктивный бронхит (ООБ) диа-

гностирован у 53 (60,9%) пациентов – 1 группа, средний возраст  $2,8 \pm 1,1$  лет. Диагноз острый простой бронхит (ОБ) установлен у 34 (39,1%) детей – 2 группа, средний возраст  $2,7 \pm 1,1$  лет. На условиях добровольного информированного согласия родителей осуществлялся забор крови из локтевой вены в остром периоде заболевания (1–2 день госпитализации). Уровень цитокинов определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа набором серии Multiplex (BioLegend, США). Группу контроля составили 13 практически здоровых детей, сопоставимых по возрасту и полу (средний возраст  $3,4 \pm 0,9$  лет).

Статистическая обработка данных проведена с использованием программы Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианы и 25–75 процентилей. Достоверные различия между группами рассчитывали, используя непараметрический критерий Манна-Уитни. Достоверными считались различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование уровней концентраций цитокинов позволило установить, что в сыворотке крови детей с острыми бронхитами ( $n=87$ ) в сравнении со здоровыми детьми значительно повышено содержание IL-8 – в 13 раз (1791,6 (632,1; 3467,7) и 137,7 (23,5; 193,4) пг/мл,  $p < 0,05$ ), IFN- $\beta$  – в 2 раза (39,5 (20,9; 151,6) и 22,1 (17,01; 29,3) пг/мл,  $p < 0,05$ ), MCP-1 – в 14 раз (858,4 (474,8; 1856,2) и 62,7 (30,9; 84,4) пг/мл,  $p < 0,05$ ), RANTES – в 1,3 раза (4325,7 (3796,4; 4481,3) и 3208,9 (1219,1; 3494,8) пг/мл,  $p < 0,05$ ), MIP-1 $\alpha$  – в 40 раз (183,5 (104,5; 556,1) и 4,6 (3,8; 10,4) пг/мл,  $p < 0,05$ ) и MIP-1 $\beta$  – в 8 раз (39,6 (25,2; 73,7) и 4,9 (2,8; 8,2) пг/мл,  $p < 0,05$ ). Концентрация IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$  у детей первой и второй групп соответствует контрольному диапазону.

Известно, что IL-10 является противовоспалительным медиатором и выполняет иммунорегуляторную роль баланса Th2 и Th1 клеток, подавляя продукцию последних. В результате проведенного исследования установлено, что в крови детей с ООБ уровень IL-10 в 2 раза выше в сравнении со здоровыми детьми (13,3 (7,1; 25,1) и 6,7 (5,2; 15,9) пг/мл,  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о значительной активации Th2 клеток.

Цистеин-цистеин лиганд-хемокины служат хемоаттрактантами преимущественно для моноцитов и макрофагов, а также Т-лимфоцитов. Макрофагальный белок воспаления-1 $\alpha$

(MIP-1 $\alpha$ ) и MIP-1 $\beta$  обладают хемотаксическим и дегранулярным действием на НК-клетки. Нами установлено, что в группе детей с ОБ содержание данных белков в сыворотке крови в два раза выше, чем у детей с ООБ (335,1 (131,9; 926,5) и 159,9 (102,1; 373,2), пг/мл; 60,6 (28,6; 141,7) и 35,9 (24,6; 59,6) пг/мл, соответственно,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, воспаление при острых бронхитах носит иммунный характер с вовлечением в патофизиологический процесс различных цитокинов. Для детей с острым простым бронхитом характерно статистически значимое повышение уровня хемокинов, что свидетельствует о преобладании клеточной фазы иммунного ответа над гуморальной. Иммунологическими маркерами острого обструктивного бронхита являются более низкие концентрации MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  в сыворотке крови, при высоких значениях IL-10, что подтверждает значимость Th2-пути в патогенезе бронхиальной обструкции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Иванова Н. А.* Рецидивирующая обструкция бронхов и бронхиальная астма у детей первых пяти лет жизни. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2016, 61(5), 64–69. [*Ivanova N. A.* Recurrent bronchial obstruction and asthma in children during the first five years of life. Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii. 2016, 61(5), 64–69].
2. *Закиров И. И., Сафина А. И., Шагуахметова Д. С.* Дифференциальная диагностика рецидивирующего бронхита у детей. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2016, 61(5), 141–148. [*Zakirov I. I., Safina A. I., Shagiahmetova D. S.* Differential diagnosis of recurrent bronchitis in children. Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii. 2016, 61(5), 141–148].
3. *Hagau N., Slavcovici A., Gonganau D., Oltean S., Dirzu D., Brezozski E., Maxim M., Ciuce C., Mlesnite M., Gavrus R., Laslo C., Hagau R., Petrescu M., Studnicska D.* Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. Crit. Care. 2010, 14(6), 203.
4. *Krishnamoorthy N., Burkett P. R., Dalli J., Abdounour R. E., Colas R., Ramon S., Phipps R. P., Peta-sis N. A., Kuchroo V. K., Serhan C. N., Levy B. D.* Cutting edge: maresin-1 engages regulatory T cells to limit type 2 innate lymphoid cell activation and promote resolution of lung inflammation. J Immunol. 2015, 194, 863–867.
5. *Петрова А. И., Гаймоленко И. Н.* Факторы риска развития острой бронхиальной обструкции у детей дошкольного возраста. Забайкальский медицинский вестник. 2019, 1, 70–75. [*Petrova A. I., Gaymo-lenko I. N.* Risk factors of acute bronchial obstruction in children of preschool age. Zabajkal'skij medicinskij vestnik. 2019, 1, 70–75].



## MECHANISMS OF FORMATION OF BRONCHIAL OBSTRUCTION IN CHILDREN OF PRESCHOOL AGE

© 2019 I. N. Gaymolenko\*, N. L. Potapova, A. I. Petrova

\*E-mail [ingaim@mail.ru](mailto:ingaim@mail.ru)

Chita State Medical Academy, Chita, Russia

Received: 20.06.2019. Accepted: 29.07.2019

Investigated the indices of some cytokines and chemokines in peripheral blood serum (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) in children with acute bronchitis. When evaluating concentrations of cytokines in peripheral blood serum of the patients with acute bronchitis in general (n = 87 people) we revealed significantly higher levels of IL-8, IFN- $\beta$ , MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , as compared to control group. It was established that MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  concentration in the group of children with acute simple bronchitis is twice as high as in children with acute obstructive bronchitis. Immunological markers of acute obstructive bronchitis are lower serum concentrations of MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ , with high IL-10 values, which confirms the significance of the Th2 pathway in the pathogenesis of bronchial obstruction.

*Key words:* acute bronchitis, young children, cytokines, chemokines

### Authors:

**Gaymolenko I. N.**, ✉ Dr. Sc., professor, Head of the Department of Pediatrics Chita State Medical Academy, Chita, Russia.

**E-mail:** [ingaim@mail.ru](mailto:ingaim@mail.ru);

**Petrova A. I.**, postgraduate student of the Department of Pediatrics Chita State Medical Academy, Chita, Russia;

**Potapova N. L.**, PhD, Head of the Department of Outpatient Pediatrics with a course of medical rehabilitation Chita State Medical Academy, Chita, Russia.

## СУПРЕССИЯ Т-КЛЕТОЧНЫХ ОТВЕТОВ ГМКСФ-ИНДУЦИРОВАННЫМИ ГРАНУЛОЦИТАРНЫМИ МИЕЛОИДНЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ, АКТИВИРОВАННЫМИ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ

© 2019 г. А. М. Гапонов<sup>1,2,3\*</sup>, В. М. Писарев<sup>2,3</sup>, А. В. Тутьельян<sup>1,3,4</sup>

\*E-mail: zorba@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» Минобрнауки России, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Поступила: 25.07.2019. Принята: 29.08.2019

Клетки-супрессоры миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells, MDSC), первоначально обнаруженные при злокачественных заболеваниях, способствующие развитию и/или течению рака, аутоиммунных расстройств, генерализации инфекций вплоть до развития сепсиса, представляют собой функционально и фенотипически гетерогенные популяции – моноцитарные и гранулоцитарные MDSC. Показано, что гранулоцитарные MDSC, или гранулоцитарные регуляторные клетки (granulocytic regulatory cells, Gregs), индуцированные GM-CSF, по-разному ингибировали пролиферативную реакцию аллогенных лимфоцитов в присутствии липополисахарида (ЛПС) или флагеллина. Так, в ситуации, когда в культурах аллогенных смешанных лимфоцитов присутствовал ЛПС, но не флагеллин, внесение Gregs, индуцированных GM-CSF, значительно ингибировало двустороннюю пролиферативную реакцию аллогенных лимфоцитов. При этом в присутствии флагеллина Gregs скорее усиливали пролиферацию отвечающих клеток-респондеров (ОКР), а в отсутствии Gregs ни ЛПС, ни флагеллин не изменяли пролиферативной реакции ОКР. Определение профиля экспрессии генов в Gregs, индуцированных GM-CSF или ЛПС, выявили значительное увеличение (в 7–10 раз) транскриптов генов, кодирующих PTEN и ARG1 ( $P < 0,05$ ), но не IL1B или TNF-альфа. Предполагается, что микроорганизмы могут использовать собственный ЛПС в целях обеспечения контролируемой PTEN энергетической безопасности иммуносупрессорных Gregs и усиления их специфической активности, осуществляемой аргиназой – продуктом ARG1. Подобный механизм иммунного избегания позволяет бактериальной популяции выжить вследствие ослабления антибактериального иммунитета.

**Ключевые слова:** клетки-супрессоры миелоидного происхождения, гранулоцитарные регуляторные клетки, липополисахарид, флагеллин, смешанная культура аллогенных лимфоцитов

DOI: 10.31857/S102872210007054-4

**Адрес:** 117198 Москва, ул. Саморы Машела 1, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Гапонов Андрей Михалович.  
**E-mail:** zorba@yandex.ru

**Авторы:**

**Гапонов А. М.**, к.м.н., зав. лабораторией инфекционной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Писарев В. М.**, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов развития критических состояний ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» Минобрнауки России, Москва, Россия;

**Тутьельян А. В.**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2706-6689>

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что миелоидные регуляторные клетки, первоначально обнаруженные при злокачественных заболеваниях, способствуют развитию и/или течению рака, осложнений беременности и патологии новорожденных, развитию диабета, аутоиммунных расстройств, реакций трансплантат против хозяина, бактериальных и вирусных заболеваний, жизнеугрожающих критических состояний (сепсис) [1]. Эти клетки, способные подавлять активность других клеток иммунной системы, представляют собой функционально и фенотипически гетерогенные популяции клеток-супрессоров миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) – моноцитарные MDSC и гранулоцитарные MDSC [2]. Исследования роли цитокинов, факторов роста, гормонов в генерации и активации MDSC относятся к быстро расширяющейся области знаний. Гораздо меньше известно о вкладе микробных продуктов в накопление в организме активных MDSC. В отношении гранулоцитарных MDSC, или гранулоцитарных регуляторных клеток (Gregs), локализующихся при разделении в градиенте плотности фикола ( $d=1,077$ ), подобно мононуклеарам крови человека, во фракции низкой плотности, показано, что их генерация или размножение находится под влиянием GM-CSF и других цитокинов *in vitro* [3,4].

Цель исследования состояла в (а) оптимизации индукции Gregs человека цитокинами *in vitro*, (б) сравнении иммуномодулирующей активности GM-CSF-индуцированных Gregs в присутствии бактериальных продуктов, липополисахарида или флагеллина, и (в) определении ассоциированных с Greg фенотипа клеток и профиля экспрессии генов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали препараты липополисахарида (ЛПС) (*E.coli*) и флагеллина (*S.thyphimurium*), приобретенные в компании Merck/Sigma-Aldrich, моноклональные антитела производства eBioscience (США). Нейтрофилы выделяли центрифугированием, с использованием двух градиентов фикола, с плотностью 1,095 и 1,077. Выделенные гранулоциты (чистота 90%, по данным проточной цитометрии) инкубировали в блуночных планшетах, в присутствии рекомбинантных человеческих цитокинов – GM-CSF, IL-1 и IL-6, в концентрациях 10 нг/мл. В часть клеточных культур гранулоцитов добавляли

ЛПС в концентрациях 100 и 1000 нг/мл. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, антибиотиков – пенициллин-стрептомицина и 2 мМ L-глутамин в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 2–3 дней. После окончания культивирования, клетки собирали и повторно подвергали разделению в градиенте плотности фикола ( $d = 1,077$ ) – для отбора жизнеспособных гранулоцитов низкой плотности; содержание гранулоцитов верифицировали проточной цитометрией. Собранные клетки подсчитывали и добавляли в различных концентрациях от 5% до 50% в культуры отвечающих клеток-респондеров (ОКР). В опытах использовали ОКР двух типов: (1) аутологичные мононуклеарные клетки периферической крови, стимулированные конконавалином А (Con A), и (2) аллогенные культуры смешанных лимфоцитов. Иммуносупрессорный эффект Gregs в отношении ОКР определяли по включению 3H-тимидина на 3 и 6 день при использовании ОКР типов 1 и 2, соответственно. Клеточный фенотип определяли проточной цитометрией с использованием антител к CD14, CD15, CD3, CD19, CD56, HLA-DR, CD33, конъюгированных с флуоресцентными метками. Профили экспрессии генов определяли с помощью ПЦР-ОТ в реальном времени, используя праймеры, специфичные для провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и других генных продуктов, способствующих выживанию клеток и подавлению иммунитета. Результаты оценивали статистически, используя критерий t Стьюдента или критерий Манна-Уитни в зависимости от характера распределения переменных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Двух-дневное и трех-дневное культивирование клеток, обогащенных гранулоцитами, в присутствии GM-CSF приводило к сохранению жизнеспособности и некоторому накоплению гранулоцитарных клеток, 85%–95% из которых характеризовались фенотипом CD33<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup> и HLA-DR<sup>low</sup>, что соответствовало общепринятому фенотипу Gregs/G-MDSC [1, 2]. После обогащения в градиенте плотности фикола клеточной фракции Gregs гранулоцитами низкой плотности, ассоциируемыми с иммуносупрессорной активностью, клетки добавляли в культуры ОКР. Показано, что в трехдневной клеточной культуре (ОКР типа 1) 10–40% клеток гранулоцитов, культивированных с GM-CSF или IL-6, но не с IL-1, вызывали 1,5-крат-

ное подавление реакции на митоген ( $P < 0,05$ ). Интересно, что гранулоциты, инкубированные с 100–1000 нг/мл ЛПС, наиболее значительно (более чем в 3 раза,  $P < 0,05$ ) ингибировали реакцию лимфоцитов на митоген Т-клеток. В опытах по использованию ОКР типа 2 было показано, что когда в культурах клеток присутствовал ЛПС, но не флагеллин, внесение Gregs, индуцированных GM-CSF, значительно ингибировали двустороннюю пролиферативную реакцию аллогенных лимфоцитов ( $P < 0,05$ ). Интересно, что в присутствии флагеллина Greg скорее усиливал пролиферацию ОКР ( $P < 0,05$ ). При этом в отсутствие Gregs ни ЛПС, ни флагеллин не изменяли пролиферативной реакции ОКР. Определение профиля экспрессии генов в Greg, индуцированных GM-CSF или ЛПС, выявили значительное увеличение (в 7–10 раз,  $P < 0,05$ ) транскриптов генов, кодирующих PTEN и ARG1 ( $P < 0,05$ ), но не IL1B или TNF-альфа.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что PTEN индуцирует усиление митофагии в клетках, подвергающихся стрессу, устраняя тем самым поврежденные митохондрии, улучшая физиологическое состояние клеток и препятствуя их гибели [5]. Предполагается, что бактериальные популяции могут ис-

пользовать собственный продукт, ЛПС, в целях обеспечения контролируемой PTEN энергетической безопасности иммуносупрессорных Gregs и усиления их специфической активности, осуществляемой аргиназой – продуктом ARG1. Такой механизм иммунного избегания позволяет бактериальной популяции выжить вследствие ослабления антибактериального иммунитета.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Veglia F., Perego M., Gabrilovich D.* Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* 2018, 19(2), 108–119.
2. *Tamada R. S. E., Hoerauf A., Layland L. E.* Immunomodulatory effects of myeloid-derived suppressor cells in diseases: Role in cancer and infections. *Immunobiology* 2018, 223(4–5), 432–442.
3. *Kamp V. M., Leentjens J., Pillay J., Langereis J. D., de Kleijn S., Kox M., Netea M. G., Pickkers P., Koenderman L.* Modulation of granulocyte kinetics by GM-CSF/IFN- $\gamma$  in a human LPS rechallenge model. *J. Leukoc. Biol.* 2013, 94(3), 513–520.
4. *Dolcetti L., Peranzoni E., Ugel S., Marigo I., Fernandez Gomez A., Mesa C., Geilich M., Winkels G., Traggiai E., Casati A., Grassi F., Bronte V.* Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* 2010, 40(1), 22–35.
5. *Hattori N., Saiki S., Imai Y.* Regulation by mitophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2014, 53, 147–150.

## GM-CSF-INDUCED GRANULOCYTIC MYELOID REGULATORY CELLS ARE ACTIVATED BY BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE TO SUPPRESS HUMAN T-CELL RESPONSES

© 2019 A. M. Gaponov<sup>1,2,3\*</sup>, V. M. Pisarev<sup>2,3</sup>, A. V. Tutelyan<sup>1,3,4</sup>

\*E-mail: zorba@yandex.ru

<sup>1</sup>Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Central Research Institute of Epidemiology, of The Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Department of Epidemiology of I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

Received: 25.07.2019. Accepted: 29.08.2019

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC), initially found in malignant diseases, contributing to the development and / or course of cancer, autoimmune disorders, generalization of infections up to the development of sepsis, are functionally and phenotypically heterogeneous populations – monocytic and granulocytic MDSC. Granulocyte MDSC, or granulocytic regulatory cells (Gregs) induced by GM-CSF, has been shown to inhibit the proliferative response of allogeneic lymphocytes in the presence of lipopolysaccharide (LPS) or flagellin in various ways. Thus, in a situation where LPS, but not flagellin, was present in cultures of allogeneic mixed lymphocytes, the introduction of Gregs induced by GM-CSF significantly inhibited the proliferative responses of allogeneic lymphocytes. To the contrary, in the presence of flagellin, Gregs rather increased the proliferation of responding responder cells, whereas in the absence of Gregs neither LPS nor flagellin affected the proliferative response of responder cells. Determination of the gene expression profile in Gregs induced by GM-CSF or LPS revealed significantly (7–10-fold) increased transcription of genes encoding PTEN and ARG1 ( $P < 0.05$ ), but not IL1B or TNF-alpha. It is assumed that microorganisms can use their own LPS in order to ensure PTEN-controlled energetic safety of immunosuppressive Gregs and enhance specific activity of the latter mediated by an ARG1 product, the secreted arginase enzyme that limits the availability of arginine for the immune cells. Such a mechanism of immune escape allows the bacterial populations to survive better due to the weakening of antibacterial immunity.

*Key words:* myeloid-derived suppressor cells, granulocyte regulatory cells, lipopolysaccharide, flagellin, mixed culture of allogeneic lymphocytes

### Authors:

**Gaponov A. M.**, MD, Head of the Laboratory of Infectious Immunology, Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia.

117198 Moscow, Samora Mashela, 1. E-mail: zorba@yandex.ru;

**Pisarev V. M.**, MD, Prof., Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms the Development of Critical States, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russia;

**Tutelyan A. V.**, MD, Prof., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; Head, Laboratory of Healthcare-Associated Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Russian Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being, Moscow, Russia. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2706-6689>

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВАКЦИН ПРОТИВ ВПЧ: МИРОВОЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2019 г. Д. В. Горенков\*, Т. Н. Никитина, А. Р. Волгин,  
В. И. Климов

\*E-mail: gorenkov@expmed.ru

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Минздрава РФ, Москва, Россия

Поступила: 12.07.2019. Принята: 16.08.2019

Персистенция высокоонкогенных вирусов папилломы человека является причиной рака шейки матки и играет значительную роль в развитии рака ротоглотки и аногенитальной области. В статье приведен анализ накопленного опыта применения вакцин против вируса папилломы человека с учетом введения рутинной вакцинации во многих странах мира. Вакцины против папиллома-вирусов являются эффективными, иммуногенными и безопасными при массовом применении. Самую частую группу нежелательных явлений составляют реакции в месте введения.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, рак аногенитальной области, вирус папилломы человека, иммунизация, эффективность, иммуногенность, безопасность ВПЧ-вакцин

DOI: 10.31857/S102872210007055-5

**Адрес:** 127051 Москва, Петровский б-р, д.8, стр. 2, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, Горенков Дмитрий Витальевич. Тел.: +7 (977) 811-57-56 (моб.)

**E-mail:** gorenkov@expmed.ru

**Авторы:**

**Горенков Д. В.**, эксперт 1 категории ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Никитина Т. Н.**, к.м.н., главный эксперт ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Волгин А. Р.**, к.м.н., заместитель директора Центра экспертизы и контроля средств медицинского применения ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва, Россия.

**Климов В. И.**, к.м.н., заместитель директора Центра планирования и координации научно исследовательских работ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва, Россия.

Инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) широко распространено в человеческой популяции. Заражение высокоонкогенными типами ВПЧ с длительной персистенцией вируса является обязательным условием развития рака шейки матки (РШМ), а также связано с выявляемыми случаями рака ротоглотки и аногенитальной области. Согласно данным

ВОЗ в 2018 году от РШМ умерли примерно 311 тысяч женщин [1].

В настоящее время в мире применяются три профилактические ВПЧ-вакцины (Гардасил, Церварикс и Гардасил-9), защищающие от папилломавирусной инфекции. Типы ВПЧ 16 и 18, входящие в состав вакцин, ответственны примерно за 70% всех случаев возникновения РШМ. При этом Гардасил-9 защищает от дополнительных пяти онкогенных типов ВПЧ (31, 33, 45, 52, 58), которые вызывают возникновение РШМ еще в 20% случаев. Кроме того, вакцины Гардасил и Гардасил-9 обладают протективной активностью в отношении низкоонкогенных типов ВПЧ 6 и 11, вызывающих развитие аногенитальных кондилом.

**Цель исследований** состояла в анализе накопленного опыта применения вакцин против ВПЧ за период с 2006 по 2018 годы с учетом введения массовой иммунизации в разных странах мира (США, Австралия, Дания, Швеция, Великобритания и др.) с широким охватом населения вакцинацией. Для решения поставленной задачи были проанализированы результаты многочисленных клинических исследований (КИ), данные ВОЗ и ведущих зарубежных медицинских агентств.

Вакцины против ВПЧ способны вызывать образование высоких титров антител с показателями сероконверсии 93–100% у женщин и 99–100% у мужчин. При этом титры после естественного инфицирования на порядок ниже поствакцинальных. Среднегеометрические титры (СГТ) поствакцинальных антител среди подростков женского пола 9–15 лет в 2 раза выше, чем у женщин 16–26 лет для всех включенных в вакцины типов ВПЧ. У лиц мужского пола 9–26 лет эти показатели сравнимы с показателями у женщин 16–26 лет. Хотя в настоящее время защитный титр антител к ВПЧ не определен, в различных серологических исследованиях было установлено, что предыдущее инфицирование значительно снижает риск повторного заражения ВПЧ того же типа [2–3]. По результатам клинических исследований проведенных в США, Австралии, странах Европы и др. и исходя из данных рутинного применения, была установлена высокая эффективность применения вакцин против ВПЧ в предотвращении заболеваний, вызываемых папилломавирусами. Вакцины показали профилактическую эффективность в отношении возникновения аногенитальных кондилом и заболеваний шейки матки, включая интраэпителиальную неоплазию и аденокарциному *in situ*. Вакцинация оказалась наиболее эффективна у лиц в возрасте от 9 до 15 лет, ранее не инфицированных ВПЧ, что особенно указывает на целесообразность проведения иммунизации до начала половой жизни. Также было продемонстрировано снижение заболеваемости, связанной с папилломавирусами, в странах, внедривших массовую вакцинацию против ВПЧ [3]. Данные по влиянию ВПЧ-вакцинации на частоту возникновения анальной интраэпителиальной неоплазии и злокачественных новообразований заднего прохода более ограничены, тем не менее, была установлена эффективность в снижении заболеваемости анальной области у мужчин. Также продемонстрировано снижение частоты ВПЧ-поражений анальной области типами вируса 16 и 18 у женщин. Инфицирование ВПЧ в анамнезе снижает эффективность вакцинации в предотвращении ВПЧ-ассоциированных анаректальных заболеваний. Данные о злокачественных заболеваниях полости рта, вызванных папилломавирусами, ограничиваются только КИ. Эффективность вакцин в предотвращении орофарингеальных ВПЧ-поражений составила 93% [4].

Данные пострегистрационных исследований показали, что все вакцины против ВПЧ являются

безопасными и хорошо переносятся. Самую частую группу нежелательных явлений составляли реакции в месте введения. Описаны случаи поствакцинальных обмороков, которые могут возникнуть и при введении любых вакцин подросткам. Среди других побочных реакций отмечались головная боль, тошнота, рвота, головокружение, слабость. Нет данных об увеличении риска нежелательных явлений, представляющих особый интерес. Система фармаконадзора и данные обсервационных наблюдений подтвердили благоприятный профиль безопасности вакцин против ВПЧ [5].

Проведенный анализ показал, что применяемые в настоящее время во всем мире профилактические вакцины против ВПЧ являются безопасными, обладают достаточной иммуногенностью и эффективностью в предотвращении инфицирования ВПЧ независимо от пола вакцинируемых. При этом вакцинация особенно эффективна у лиц в возрасте от 9 до 15 лет, ранее не имевших контакта с ВПЧ, поэтому подростки в период до начала половой жизни являются главной целевой группой для проведения массовой иммунизации против ВПЧ.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCE

1. Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Picerot M., Znaor A., Soerjomataram I., Bray F. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: IARC. <https://gco.iarc.fr/today>
2. Lin S. W., Ghosh A., Porras C., Markt S. C., Rodriguez A. C., Schiffman M., Wacholder S., Kemp T. J., Pinto L. A., Gonzalez P., Wentzensen N., Esser M. T., Matys K., Meuree A., Quint W., van Doorn L. J., Herretero R., Hildesheim A., Safaeian M. HPV16 seropositivity and subsequent HPV16 infection risk in a naturally infected population: comparison of serological assays. PLoS One. 2013;8(1): e53067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053067>
3. Brotherton J. M. L., Bloem P. N., Population-based HPV vaccination programmes are safe and effective: 2017 update and the impetus for..., Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.010>
4. Chaturvedi A. K., Graubard B. I., Broutian T., Pickard R. K. L., Tong Z. Y., Xiao W., Kahle L., Gillison M. L. Effect of Prophylactic Human Papillomavirus (HPV) Vaccination on Oral HPV Infections Among Young Adults in the United States. J Clin Oncol. 2018;36(3):262. Epub 2017 Nov 28.

5. Phillips A., Patel C., Pillsbury A. et al. Safety of Human Papillomavirus Vaccines: An Updated Review.

Drug Saf. 2018;41:329. <https://doi.org/10.1007/s40264-017-0625-z>

## CHARACTERIZATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS VACCINES: THE WORLD EXPERIENCE

© 2019 D. V. Gorenkov\*, T. N. Nikitina, A. R. Volgin, V. I. Klimov

\*E-mail: [gorenkov@expmed.ru](mailto:gorenkov@expmed.ru)

*The Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

**Received:** 12.07.2019. **Accepted:** 16.08.2019

Persistence of high-risk human papillomavirus (HPV) genotypes is the leading cause of cervical cancer, as well as anogenital and oropharyngeal cancers. This article focuses on analysis of the global use of the licensed HPV vaccines, given the introduction of HPV vaccination into national immunization programs of many countries. All vaccines are safe, immunogenic and effective in population usage, with the most frequent adverse event being injection-site reactions.

*Key words:* cervical cancer, anogenital cancer, human papillomavirus, immunisation, efficacy, immunogenicity, HPV vaccines safety

### Authors:

**Gorenkov D. V.**, ✉ Category 1 Expert, FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, Russia.

**E-mail:** [gorenkov@expmed.ru](mailto:gorenkov@expmed.ru);

**Nikitina T. N.**, PhD, Main Expert, FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, Russia;

**Volgin A. R.**, PhD, Deputy Director of Centre for Evaluation and Control of MIBPs of FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, Russia;

**Klimov V. I.**, PhD, Deputy Director of Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities of FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, Russia.



## ИЗМЕНЕНИЕ ХАРАКТЕРА СВЯЗИ МЕЖДУ ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ У ПАЦИЕНТОВ С КОКСАРТРОЗОМ ДО И ПОСЛЕ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ

© 2019 г. Л. А. Дмитриева<sup>1\*</sup>, Ю. И. Пивоваров<sup>1</sup>, В. Ф. Лебедев<sup>2</sup>

\*E-mail: [viclud2009@mail.ru](mailto:viclud2009@mail.ru)

<sup>1</sup>ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»,  
ФАНО России, Иркутск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет»  
Минздрава РФ, Иркутск, Россия

Поступила: 04.07.2019. Принята: 12.08.2019

В результате проведенного анализа канонической корреляции между показателями клеточно-го звена и уровнем продукции гуморальных факторов установлен определенный характер взаимосвязи между ними и выявлены наиболее важные факторы, определяющие своеобразие функционального состояния иммунной системы у разных групп пациентов с коксартрозом до и после эндопротезирования тазобедренного сустава.

**Ключевые слова:** коксартроз, эндопротезирование

DOI: 10.31857/S102872210007056-6

Адрес: 664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, д. 1, а/я 12, ФГБНУ «Иркутский НЦ хирургии и травматологии», Дмитриева Л. А., Тел.: +7 (908) 666-94-37;  
E-mail: [viclud2009@mail.ru](mailto:viclud2009@mail.ru)

### Авторы:

**Дмитриева Л. А.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной патофизиологии и биохимии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, Россия; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6725-3377>;

**Пивоваров Ю. И.**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной патофизиологии и биохимии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, Россия; ORCID: <http://0000-0002-6094-3583>;

**Лебедев В. Ф.**, к.м.н., доцент кафедры травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Иркутск, Россия; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0296-1342>.

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным литературы важную роль на разных этапах развития патологического процесса при дегенеративно-дистрофических заболеваниях (ДДЗ) тазобедренного сустава играет иммунная система [1]. Именно, участие иммунных реакций в патогенезе данных заболеваний определяет целесообразность использования более рациональных подходов к оценке иммунного статуса. Известно, что в основе функциони-

рования иммунной системы лежит межклеточная кооперация, которая осуществляется как через прямые контактные взаимодействия клеток-участников, так и опосредуется действием различных цитокинов [2]. Нарушение этих взаимодействий является одним из важных механизмов дисфункции иммунной системы. Вместе с тем, несмотря на проводимые иммунологические исследования у пациентов с ДДЗ тазобедренного сустава, многие аспекты функционирования иммунной системы, как единого целого, остаются недостаточно изученными, что и определяет актуальность данного исследования.

**Цель исследования:** установить характер множественной связи между иммунологическими факторами у пациентов с коксартрозом до и после эндопротезирования тазобедренного сустава.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено клинко-иммунологическое обследование 73 пациентов с диспластическим коксартрозом (ДКА) III стадии. Все пациенты по абсолютным ортопедическим показаниям были прооперированы методом тотального эндопротезирования тазобедренного сустава (ТЭТС). Фенотипический состав лимфоидных

клеток оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови и уровень продукции цитокинов в спонтанном и стимулированном вариантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Исследования проводили до операции и на 7-е, 10-е и 21 сутки после ТЭТС. Контрольную группу составили 28 клинически здоровых лиц. Для нахождения меры корреляционной связи использовали канонический анализ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные ранее нами данные показали, что в зависимости от степени выраженности иммунологических расстройств пациенты с ДКА на его поздних стадиях не однородны и с помощью кластерного анализа разделяются на две группы [3]. Основные отличия, характеризующие исследуемые группы и определяющие характер и выраженность иммунных нарушений у пациентов 1-й группы заключались в снижении клеток Т-ряда и концентрации сывороточного иммуноглобулина А (IgA). У пациентов 2-й группы, напротив, отмечалось увеличение различных субпопуляций Т-лимфоцитов и уровня IgA, а также разнообразные комбинации нарушений функциональной активности клеток иммунной системы.

В результате проведенного канонического анализа у трех групп, включая контрольную, было установлено, что в контрольной группе наиболее тесную корреляционную связь имели содержание CD4<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> клеток с уровнем продукции IgG, IgA и IL-1β спонт. (R=0,81, p=0,002). В первой группе пациентов в исходном состоянии эти же показатели клеточного звена тесно коррелировали с уровнем продукции IL-1β, IL-4 и INF-γ интактными клетками (R=0,72, p=0,0003). Данная зависимость между двумя множествами в контрольной группе и 1-й группе пациентов отражает взаимосвязь между количественным содержанием регуляторных и эффекторных клеток и способностью к синтезу гуморальных факторов. Важно, что наибольший вклад в эту зависимость в 1-й группе вносили CD4<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> лимфоциты. Поскольку CD4<sup>+</sup> являются доминирующей субпопуляцией циркулирующих Т-лимфоцитов и дифференцируются на Tх1- и Tх2-клетки, синтезирующие определенный спектр цитокинов и участвующие в регуляции различных типов иммунных

реакций, данные взаимосвязи могут свидетельствовать об адекватной регуляторной функции клеток Т-ряда.

У пациентов 2-й группы характер корреляционной зависимости между взвешенными суммами лимфоидных клеток и другими показателями значительно отличался. Выявлена тесная корреляционная связь CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> клеток с концентрацией IgM и продукцией IL-1β и IL-2 (R=0,74, p=0,018). При этом наибольший вклад в эту зависимость вносили клетки с фенотипом CD16<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>, а также уровень продукции IL-1β. В отличие от контрольной и 1-й группы пациентов прослеживается отсутствие корреляционной зависимости между регуляторными и эффекторными клетками, что уже в исходном состоянии отражает процессы дисрегуляции и дисфункции компонентов иммунной системы.

В послеоперационном периоде характер канонической корреляции изменялся следующим образом. Так, у пациентов 1-й группы на 3-и сутки наиболее тесно коррелировали уровни продукции TNF-α, IL-4 и INF-γ с содержанием CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> клеток и синтезом IgG, IgA (R=0,70, p=0,049). На 10 сутки IL-2, IL-4 и INF-γ коррелировали с общей лимфоидной популяцией Т-лимфоцитов, их основными субпопуляциями, а также содержанием В-клеток (R=0,73, p=0,011). Наибольший вклад в эту зависимость вносили уровни продукции IL-2, IL-4 и содержание CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. К концу периода наблюдения (21 сутки) прослеживалась взаимосвязь между продукцией IL-2, INF-γ и содержанием CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> клеток (R=0,81, p=0,0002). Характер выявленной корреляции между двумя множествами переменных в 1-й группе пациентов в разные сроки после операции отражает адекватную взаимосвязь между количественным содержанием регуляторных и эффекторных лимфоидных клеток и способностью их к синтезу гуморальных факторов.

У пациентов 2-й группы в раннем послеоперационном периоде наиболее тесно коррелировали уровни продукции IL-1β и IL-4 с содержанием CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> клеток (R=0,87, p=0,005). На 10-е сутки прослеживалась взаимосвязь между содержанием CD4<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> клеток и синтезом IL-4 и INF-γ (R=0,90, p=0,0002). К концу периода наблюдения отмечалась взаимосвязь между уровнем продукции провоспалительных цитокинов, IL-2, INF-γ и клетками с фенотипом CD21<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> (R=0,95, p=0,015). При этом наибольший вклад в корре-

ляционную зависимость в разные после операции вносили IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  и содержание клеток с фенотипом CD95<sup>+</sup>, поскольку вес этих переменных в каждом из множеств имел наибольшее значение. Появление в корреляционной зависимости проапоптотического фактора CD95<sup>+</sup> как до операции, так и в послеоперационном периоде можно рассматривать как маркер негативной активации иммунологических процессов у пациентов данной группы.

Таким образом, анализ канонической корреляции между двумя множествами иммунологических факторов позволил установить определенный характер взаимосвязи между ними и выявить наиболее важные факторы, определяющие своеобразие функционального состояния иммунной системы у разных групп пациентов с коксартрозом, что важно в плане прогноза течения восстановительного периода после ТЭТС.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCE

1. Чепелева М. В., Швед Н. С. Иммунологические особенности остеоартроза крупных суставов различной этиологии. *Гений ортопедии*. 2012; 2: 107–111. [Chepeleva M. V., Shved N. S. Immunological peculiarities of large joints osteoarthritis of different etiology. *Geniy ortopedii*. 2012; (2): 107–111].
2. Симбирцев А. С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант; 2018. [Simbirsev A. S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. Folio, St. Petersburg 2018, 512 с.].
3. Дмитриева Л. А., Пивоваров Ю. И., Лебедев В. Ф., Арсентьева М. Л. Иммунологические факторы в формировании измененной реактивности организма у пациентов с коксартрозом. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11(20), № 4.—С. 701–703. [Dmitrieva L. A., Pivovarov Yu. I., Lebedev V. F., Arsentieva M. L. Immunologic factors in formation of changed reactivity in patients with coxarthrosis. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2017; (4): 701–703].

## CHANGES IN THE INTERRELATIONS BETWEEN IMMUNOLOGICAL FACTORS IN PATIENTS WITH COXARTHROSIS BEFORE AND AFTER ENDOPROTESIS

© 2019 L. A. Dmitrieva<sup>1</sup>, Yu. I. Pivovarov<sup>1</sup>, V. F. Lebedev<sup>2</sup>

\*E-mail: [viclud2009@mail.ru](mailto:viclud2009@mail.ru)

<sup>1</sup>Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia;

<sup>2</sup>Department of Traumatology and Orthopedics, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

Received: 04.07.2019. Accepted: 12.08.2019

As a result of the analysis of the canonical correlation between the indicators of the cellular link and the level of humoral factors, characteristic interrelations between them were established and the most important factors determining the functional state of the immune system in different groups of patients with coxarthrosis and hip arthroplasty were identified.

*Key words:* coxarthrosis, endoprosthesis

### Authors:

**Dmitrieva L. A.**, ✉ PhD (Medicine), Senior Research Associate Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia. **E-mail:** [viclud2009@mail.ru](mailto:viclud2009@mail.ru);

**Pivovarov Yu. I.**, PhD, M D (Medicine), Professor, Leading Research Associate Laboratory of Cell Pathophysiology and Biochemistry, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia;

**Lebedev V. F.**, PhD (Medicine), Associate Professor Department of Traumatology and Orthopedics, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia.

## КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS» В КАЧЕСТВЕ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ

© 2019 г. В. Г. Дробышевская<sup>1,2\*</sup>, О. А. Кривцун<sup>2</sup>

\*E-mail: v.g.drobyshevskaja@yandex.ru

<sup>1</sup>ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 19.07.2019. Принята: 27.08.2019

Впервые публикуется ценная в практическом отношении информация о применении препарата «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS» в качестве патогенетического лечения пациентов с дефектом антителообразования. В статье представлены данные исследования препарата на соответствие критериям, предъявляемым к ВВИГ Всемирной Организацией Здравоохранения, сравнительная характеристика входящих в состав препарата антител по спектрам и титрам с Российскими, данные о клинической и лабораторной эффективности препарата.

**Ключевые слова:** «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS», ВВИГ, ПИД, заместительная терапия первичных иммунодефицитов, эффективность патогенетической терапии ПИД, безопасность патогенетической терапии ПИД

DOI: 10.31857/S102872210007057-7

**Адрес:** 197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; ЦКДЛ. Дробышевская Виктория Георгиевна. E-mail: v.g.drobyshevskaja@yandex.ru

**Авторы:**

**Дробышевская В. Г.**, врач аллерголог-иммунолог медицинского центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия; преподаватель кафедры иммунологии ФГБОУ «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия;

**Кривцун О. А.**, студент 5 курса ФГБОУ «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Первичные иммунодефициты (ПИД) являются актуальной проблемой современной ме-

дицины ввиду тяжести течения, высокого процента инвалидизации и летальности, сложности диагностики и лечения. В структуре российской популяции больных ПИД старше 18 лет 61% составляют пациенты, страдающие нарушением синтеза антител. В качестве патогенетического лечения пациентов этой группы используется пожизненная заместительная терапия препаратами внутривенных иммуноглобулинов (ВВИГ). При этом ВОЗ особо отмечено то, что ВВИГ различных производителей не могут считаться эквивалентными, и залогом эффективности и безопасности проводимой терапии является не только расчет достаточной дозы и определение оптимальной схемы введения, но и соблюдение ряда условий по выбору конкретного препарата.

В 2018 году на Российском рынке появился новый препарат из группы ВВИГ — IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS. Препарат производится в Китае, и информации о нём на данный момент не опубликовано ни в русской,

ни в англоязычной литературе, вследствие чего использование препарата у пациентов с ПИД вызывает настороженность у иммунологов и самих пациентов.

**Целью исследования** была оценка эффективности (клинической и лабораторной) и безопасности препарата «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS» в качестве заместительной терапии у пациентов с первичным иммунодефицитом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были проанализированы данные историй болезни 2 пациентов дневного стационара ФБУН НИИ имени Пастера с диагнозом «Общий вариабельный иммунодефицит», получавших терапию препаратом «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS» на протяжении 3х месяцев. Иммунологический мониторинг выполнен на основании исследования претрансфузионных сывороток крови с использованием стандартных диагностических методов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ лабораторных данных показывает, что у обоих пациентов после характерного снижения титров IgG в связи с заменой ВВИГ на препарат «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS», титр постепенно начал нарастать, однако так и не достиг значений, которые можно считать удовлетворительным. Распределение подклассов IgG соответствует физиологическому, что отвечает условиям обеспечения оптимального терапевтического эффекта. Содержание IgA в препарате не превышает 0.03 г/л, что не должно спровоцировать у пациентов развитие анафилактических реакций. Циркулирующие иммунные комплексы, образующиеся в крови пациентов во время терапии не выходят за границы референтного интервала (0–120 у.е.).

Определение титров антител к кори, НВс антигену, к ЦМВ, к ВЭБ и к вирусу краснухи показало достаточно высокий уровень в самом препарате. В крови же пациентов присутствовали минимальные защитные титры к этим инфекциям. К вирусу полиомиелита (серотипы Р1 и Р2) в некоторые месяцы терапии титр антител

в крови пациентов опускался ниже защитного уровня, а антитела к серотипу Р3 отсутствовал вовсе. Антител к HIV, HBsAg, HCV в препарате не обнаружено.

Во время заместительной терапии препаратом «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS» новых эпизодов клинически значимых инфекционных заболеваний у пациентов не наблюдалось, потребности в применении антибактериальной и противовирусной терапии не возникало. В то же время у обоих пациентов отмечено возникновение симптомов, трактованных лечащими врачами, как побочные эффекты (покраснение кожи, пульсирующая головная боль). Описанные симптомы соответствуют возможным побочным эффектам изложенным в официальной инструкции к препарату.

Препарат «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS» на рынке появился относительно недавно. И еще не был накоплен достаточный клинический опыт применения препарата, как за рубежом, так и в России. Данные, полученные в результате терапии препаратом «IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS», весьма неоднозначны. Препарат соответствует изученной части критериев предъявляемых ВОЗ, однако недостаточная эффективность насыщения IgG и индивидуальная переносимость препарата по-прежнему вызывает настороженность иммунологов и их пациентов. В результате запланированного продолжения данной исследовательской работы планируется получение более объективных данных, что улучшит качество оказания медицинской помощи данной группе пациентов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Латышева Е. А.* «Первичные иммунодефициты у взрослых. Особенности диагностики и лечения.», Москва, 2018 г. [*Latysheva E. A.* “Primary immunodeficiency in adults. Features of diagnosis and treatment. “, Moscow, 2018.]
2. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению больных первичными иммунодефицитами с нарушением гуморального звена. РААКИ, Москва 2014 год. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of patients with primary immunodeficiencies in violation of the humoral link. RAACI, Moscow 2014.]

## CLINICAL EXPERIENCE WITH IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS AS REPLACEMENT THERAPY IN PATIENTS WITH PRIMARY IMMUNODEFICIENCY

© 2019 V. G. Drobyshevskaya<sup>1,2\*</sup>, O. A. Krivtsun<sup>2</sup>

\*E-mail: v.g.drobyshevskaja@yandex.ru

<sup>1</sup>St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology,  
St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russia

**Received:** 19.07.2019. **Accepted:** 27.08.2019

Practically valuable information on the use of the IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS drug as a pathogenetic treatment of patients with a defect in antibody production. The article presents data from the study of the drug for compliance with the criteria, presented to the Intravenous immunoglobulin by the World Health Organization, the comparative characteristics of the antibodies that make up the drug according to the spectra and titers with the Russian, the data on the clinical and laboratory efficacy of the drug.

*Key words:* “IMMUNOGLOBULIN SIGARDIS”, Intravenous immunoglobulin, primary immunodeficiency, replacement therapy of primary immunodeficiency, the efficacy of pathogenetic therapy of Immunodeficiency, the safety of pathogenetic therapy of Immunodeficiency

### Authors:

**Drobyshevskaya V. G.**, ✉ allergist-immunologist, Medical Center of the St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation; high school teacher, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russia. **E-mail:** v.g.drobyshevskaja@yandex.ru;

**Krivtsun O. A.**, student of the First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russia.

## ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПОВ-КЛАСТЕРОВ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ НА ЭТАПЕ РЕАБИЛИТАЦИИ

© 2019 г. Л. Ш. Дудченко

*E-mail: vistur@mail.ru*

*ГБУЗ РК «Академический НИИ физических методов лечения, медицинской климатологии и реабилитации им. И. М. Сеченова» МЗ Республики Крым, Ялта, Россия*

Поступила: 10.07.2019. Принята: 14.08.2019

Цель: с помощью кластерного анализа выделить фенотипы бронхиальной астмы при поступлении пациентов на санаторно-курортный этап медицинской реабилитации и проанализировать их патогенетические особенности. Под наблюдением было 518 больных БА, поступивших на реабилитацию. Комплекс обследования включал клиническое, функциональное, лабораторное исследование. Изучались иммунологические показатели: IgE, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, EGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ . Статистическая обработка материала с помощью программного продукта SPSS25. На основании результатов первичного обследования пациентов с БА применен кластерный анализ и разработана модель из трех кластеров. Определены диагностические параметры для отнесения пациентов к кластерам и описаны особенности иммунологического обследования. Выделение однородных групп на этапе реабилитации имеет значение для разработки персонализированных программ реабилитации.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, фенотипы, кластерный анализ

**DOI:** 10.31857/S102872210007058-8

**Адрес:** 298603, Россия, Республика Крым, г. Ялта, ул. Мухина 10/3, ГБУЗРК «Академический НИИ физических методов лечения, медицинской климатологии и реабилитации им. И. М. Сеченова», научно-исследовательский отдел пульмонологии, Дудченко Лейла Шамилевна.

Тел +73654328667, +79780071349 (моб.)

**E-mail:** vistur@mail.ru

**Авторы:**

Дудченко Л. Ш., к. м. н., заведующая научно-исследовательским отделом пульмонологии ГБУЗРК «Академический НИИ физических методов лечения, медицинской климатологии и реабилитации им. И. М. Сеченова», Ялта, Россия.

Настоящий период научных исследований в отношении бронхиальной астмы (БА) связан с изучением фенотипов заболевания [1, 2]. Существуют различные подходы для определения фенотипов БА: клинический, биологический, иммунологический, статистический [2, 3, 4]. Используя возможности искусственного интеллекта с помощью кластерного анализа возможно выделить однородные группы пациентов по принципу наиболее тесного сходства внутри группы и существенных различий между ними. Такой метод является наиболее объективным и позволяет избежать многих субъективных ошибок при клиническом фенотипировании [5].

**Цель исследования:** с помощью кластерного анализа выделить фенотипы бронхиальной астмы при поступлении пациентов на санаторно-курортный этап медицинской реабилитации и проанализировать их патогенетические особенности.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 518 больных БА, поступивших на санаторно-курортную реабилитацию в отделении пульмонологии ГБУЗ РК «АНИИ им. И. М. Сеченова», г. Ялта. Комплекс обследования включал клиническое, лабораторное и функциональное обследование. Иммунологические показатели: IgE, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, EGF, TGF- $\beta$ , TNF определяли методом иммуноферментного анализа. Для статистической обработки материала использовался программный продукт SPSS25.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализированы 92 параметра обследования 518 больных БА поступивших на санаторно-курортную реабилитацию в специализирован-

ное пульмонологическое отделение на Южном берегу Крыма. В результате кластерного анализа выделены 3 фенотипа-кластера: А, В и С. Проведен анализ выделенных групп пациентов, определены отличительные характеристики для каждого.

Для кластера А, в который вошли 49,42% пациентов были характерны ежедневные приступы затрудненного дыхания, частые обострения, атопия в анамнезе, склонность к ожирению, умеренное снижение функции внешнего дыхания, фиксированная обструкция бронхов, снижение толерантности к физической нагрузке, высокая приверженность базисной терапии, которая состояла из ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС) средними дозами, чаще в комбинации с бета-2-агонистами длительного действия. Характерна была средняя степень тяжести, неконтролируемое течение БА.

Для кластера В, в который вошло 28,76% пациентов, были характерны редкие маловыраженные симптомы БА, редкие непродолжительные обострения в анамнезе, поздний дебют заболевания, функция внешнего дыхания — сохранена, толерантность к физической нагрузке — сохранена, невысокая приверженность базисной терапии низкими и средними дозами ИГКС. Характерна легкая степень тяжести, контролируемая или частично контролируемая БА.

Для кластера С, в который вошло 21,81% пациентов, был характерен ранний дебют, частые и выраженные симптомы БА, частые и длительные обострения БА, функция внешнего дыхания резко снижена, фиксированная обструкция дыхательных путей, толерантность к физической нагрузке резко снижена, сатурация кислорода снижена, низкая приверженность базисной терапии, которая состояла из ИГКС высокими дозами в сочетании с бронхолитиками длительного действия. Характерна тяжелая и средняя степень тяжести, неконтролируемое течение БА.

Результаты иммунологического исследования выявили, что самый низкий показатель ИЛ-4 был в кластере А ( $2,43 \pm 1,47$  пг/мл) и наиболее высокий в кластере С ( $4,95 \pm 3,14$  пг/мл). Так как ИЛ-4 является основным медиатором для Th2 типа иммунного ответа с формированием соответствующего эндотипа БА, следует предположить, что в кластер С вошли пациенты с преобладанием Th2-эндотипа БА. Самый высокий уровень IgE у пациентов этого же кластера ( $786,51 \pm 1484$  МЕ/мл), что подтверждало отношение пациентов с аллергической БА к кластеру С. Антагонистом Th2-пути и антаго-

нистом ИЛ-4 является IFN- $\gamma$ , он и предопределяет развитие патогенетических механизмов по альтернативному пути, T2-low, или Th1-пути, являясь ключевым цитокином Th1 иммунного ответа. Данный цитокин способствует переключению иммунного ответа с Th2 на Th1 механизм, тем самым уменьшая проявления атопии. Повышенная экспрессия IFN- $\gamma$  на слизистой респираторного тракта коррелирует с бронхиальной гиперреактивностью и тяжелым течением БА. Высокие значения IFN- $\gamma$  свидетельствовали об антигенной нагрузке на организм и определяли выраженность и активность инфекционного процесса. Уровень IFN- $\gamma$  был значительно повышен у всех пациентов, максимальные значения у пациентов кластера С ( $22,57 \pm 16,07$  пг/мл).

Аналогичную, но второстепенную роль играют такие цитокины, как TNF, TGF- $\beta$  и IFN- $\alpha$ . IFN- $\alpha$  имел низкий уровень во всех фенотипах-кластерах, самый низкий у пациентов кластера С ( $1,87 \pm 0,73$  пг/мл), что могло свидетельствовать о низкой активности противовирусной защиты и возможной хронизации внутриклеточных инфекций у данной категории больных. Проведенный корреляционный анализ выявил достоверную обратную связь средней силы между IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,008$ ). С повышением IFN- $\gamma$  понижается IFN- $\alpha$ . TNF был снижен у пациентов всех трех кластеров.

Определение цитокинов TGF- $\beta$  и EGF у больных с БА имело важное значение для оценки состояния пациентов, так как данные цитокины являются основными профибротическими факторами и оказывают определяющее влияние на формирование необратимых изменений у больных БА с длительным стажем болезни в виде ремоделирования дыхательных путей и необратимой обструкции. Уровень TGF- $\beta$  был повышенным у пациентов всех трех кластеров, но наибольшим у пациентов кластера А, что соответствовало самому большому возрасту в этой группе  $56,66 \pm 9,62$  лет и выраженному снижению показателей функции дыхания ОФВ1  $62,41 \pm 21,74\%$  и ОФВ1/ФЖЕЛ  $0,68 \pm 0,11$ , подтверждающему произошедшие процессы ремоделирования в дыхательных путях. Не меньшую значимость в ремоделировании дыхательных путей имеет и EGF. Значительно повышенный уровень EGF был выявлен у всех пациентов с БА при поступлении, но максимальный у пациентов кластера А —  $624,63 \pm 337,57$  пг/мл.

Выделение фенотипов-кластеров на этапе реабилитации имело значение для определения реабилитационного потенциала больных БА



и выработки в дальнейшем персонализированных программ реабилитации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Update 2017. <http://www.ginasthma.org> Accessed December, 2018.
2. *Ненашева Н. М.* Бронхиальная астма. Современный взгляд на проблему. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018. [*Nenasheva N. M.* Bronhial'naja astma. Sovremennyj vzgljad na problemu. M.: GJeOTAR-Media; 2018. (InRuss.)]
3. *Wenzel S.* Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine*. 2012; 18: 716–725. DOI: 10.1038/nm.2678
4. *Moore W. C., Meyers D. A., Wenzel S. E. et al.* Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181(4): 315–323. DOI: 10.1164/rccm.200906–0896OC.
5. *Haldar P., Pavord I. D., Shaw D. E. et al.* Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 178: 218–224. DOI:10.1164/rccm.200711–1754OC.

### PATHOGENETIC FEATURES OF PHENOTYPES CLUSTERS OF BRONCHIAL ASTHMA AT THE REHABILITATION STAGE

© 2019 L. Sh. Dudchenko

*E-mail: vistur@mail.ru*

*State Budgetary Institution of Public Health of the Republic of Crimea «Academic Research Institute of Physical Methods of Treatment, Medical Climatology and Rehabilitation named by I. M. Sechenov», Yalta city, Republic of Crimea, Russia*

**Received:** 10.07.2019. **Accepted:** 14.08.2019

Aims: to identify phenotypes of the bronchial asthma (BA) upon admission of patients for the sanatorium medical rehabilitation (SMR) using cluster analysis and to analyse their pathogenetic features. The research include 518 patients with BA who passed SMR. Survey conducted: clinical, functional, laboratory. Immunological indicators were studied: IGE, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, EGF, TGF- $\beta$ , TNF. Statistical processing of material in the SPSS25 program. On the basis of results of inspection of patients with cluster analysis is BA applied and 3 clusters are selected. Diagnostic parameters for reference of patients to clusters are determined and features of immunological inspection are described. Selection of homogeneous groups at a stage of rehabilitation matters for development of the personalized programs of rehabilitation.

*Key words:* bronchial asthma, phenotypes, cluster analysis

#### Author:

**Dudchenko L. Sh.**, PhD (Medicine), State Budgetary Institution of Public Health of the Republic of Crimea «Academic Research Institute of Physical Methods of Treatment, Medical Climatology and Rehabilitation named by I. M. Sechenov», Yalta city, Republic of Crimea, Russia.

Yalta city, Republic of Crimea, Mukhina street 10/3, State Budgetary Institution of Public Health of the Republic of Crimea «Academic Research Institute of Physical Methods of Treatment, Medical Climatology and Rehabilitation named by I. M. Sechenov».

**E-mail:** vistur@mail.ru

## ЗНАЧИМОСТЬ КОМПОНЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ РЕСПИРАТОРНОЙ ПЫЛЬЦЕВОЙ АЛЛЕРГИИ

© 2019 г. Ю. Н. Емелина\*, И. М. Криволапова

\*E-mail: eyun75@mail.ru

ГАОУ СО «Свердловская областная детская клиническая больница»,  
Екатеринбург, Россия

Поступила: 22.07.2019. Принята: 30.08.2019

Молекулярная диагностика все больше входит в повседневную практику аллергологов-иммунологов. Мы рассмотрели информативность данной методики при обследовании детей с респираторной пыльцевой аллергией в тех случаях, когда проведение кожных тестов было недостаточно эффективным в выявлении причинно-значимого аллергена и выборе препарата для проведения аллерген-специфической иммунотерапии.

**Ключевые слова:** респираторная пыльцевая аллергия, Bet v1, Phl p1, Phl p5 и Art v1

DOI: 10.31857/S102872210007059-9

Адрес: 620149, г. Екатеринбург ул. С. Дерябиной, 32, Емелина Юлия Николаевна. Тел.: +7 963 27-07-616.

E-mail: eyun75@mail.ru

Авторы:

**Емелина Ю. Н.**, к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, консультативно-диагностическая поликлиника, Свердловская областная детская клиническая больница, Екатеринбург, Россия;

**Криволапова И. М.**, биолог, Свердловская областная детская клиническая больница, Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Многие авторы отмечают увеличение роли причинной значимости пыльцы ветроопыляемых растений в обострении аллергического ринита и бронхиальной астмы [1]. Также в последние годы выявлены изменения аэропаллинологической ситуации: смещение сроков начала цветения, удлинение периода палинации и неуклонный рост количества пыльцевых зерен в воздушном бассейне в связи с климатическими изменениями и увеличением количества поллютантов в атмосфере [2]. Наряду с этим увеличивается количество пациентов с респираторной пыльцевой аллергией и отмечается рост числа пациентов с ежегодными обострениями аллергических болезней органов дыхания (АБОД) на протяжении  $\geq 2$  сезонов палинации.

По данным ряда авторов использование методов молекулярной диагностики позволяет установить истинную сенсibilизацию (по повыше-

нию специфических иммуноглобулинов E (IgE к мажорным аллергенам), выявить возможные перекрестные реакции (по повышению специфических IgE к минорным аллергенам), выбрать препарат/препараты и спрогнозировать эффективность иммунотерапии пыльцевыми аллергенами [3–5].

**Цель исследования:** оценить информативность метода компонентной диагностики при различной продолжительности поллиноза у детей.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовал 31 ребенок с ежегодными обострениями респираторной пыльцевой аллергии на протяжении 1–3 сезонов цветения, группу контроля составили 6 детей с круглогодичными проявлениями АБОД. У всех детей в основной и контрольной группе были выявлены сочетанные формы аллергических заболеваний. Группы были сопоставимы по полу, возрасту и тяжести аллергопатологии. В группе с сезонными обострениями у 13 детей проявления аллергического заболевания (АЗ) отмечались в апреле-мае, у 11 – в апреле-июле, у 2 – в июне-июле и у 5 в мае-сентябре; результаты проведенных ранее кожных тестов не совпадали с данными анамнеза и/или не позволяли определиться с причинной значимостью определенного аллергена для начала аллерген-специфической иммунотерапии.

Определение уровня специфических IgE к специфическим аллергенным компонентам пыльцы растений (Bet v1, Phl p1, Phl p5 и Art v1) в сыворотке крови проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов фирмы Dr. Foote (Германия). Статистическая обработка данных проводилась параметрическими и непараметрическими методами с использованием программы «Statistica 6.0» и «Epi Info – 7» и подсчетом показателей разности рисков (Risk difference, RD) и доверительных интервалов (ДИ 95%).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При наличии сезонных проявлений в апреле-мае вероятность повышения специфического IgE к Bet v1 в сыворотке крови составила 100%, в июне-июле – вероятность повышения специфических IgE к Phl p1 и Phl p5 – 100% (RD – 100,0) в сравнении с детьми без сезонных обострений, что совпадает с данными других авторов о преобладании сенсибилизации к мажорным аллергенам у пациентов с обострениями АЗ в периоде цветения деревьев и луговых трав [3, 5].

При проявлениях АБОД в апреле-июле вероятность повышения специфических IgE к мажорному аллергену березы Bet v1 в сыворотке крови составила 90,9% (RD – 90,9 [73,9–107,9]), а к мажорным аллергенам тимopheевки Phl p1 и p5 – 45,5% (RD – 45,5 [16,0–74,9]) в сравнении с группой детей без сезонных обострений аллергического заболевания. Т.е. у большинства детей с проявлениями поллиноза в апреле-июле встречается сенсибилизация к мажорному аллергену пыльцы березы и только у 45,5% к мажорному аллергену тимopheевки, в остальных случаях проявления в периоде цветения луговых и злаковых трав могут быть обусловлены перекрестными реакциями или выраженным обострением АЗ, возникшим при контакте с пылью деревьев и плохо купируемым фармакотерапией.

При проявлениях респираторной аллергии в мае-сентябре вероятность повышения специфических IgE к мажорному аллергену березы Bet v1 и к мажорным аллергенам тимopheевки Phl p1 и p5 составила 80,0% (RD – 80,0 [44,9–115,1]), а к мажорному аллергену полыни Art v1 – 60,0% (RD – 60,0 [17,1–102,9]) в сравнении с группой детей с круглогодичными проявлениями АЗ. Таким образом, при наличии ежегодных обострений АБОД в мае-сентябре у большинства детей встречается полисенсибилизация к мажорным

аллергенам березы Bet v1 и тимopheевки Phl p1 и Phl p5. Также достаточно большая часть детей (60%) была сенсибилизирована и к мажорному аллергену полыни Art v1.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Четкая сезонность клинических проявлений респираторной пылевой аллергии, совпадающая с периодом палинации причинно-значимых растений позволяет ограничиться результатами кожных тестов с цельными аллергенами. В случаях не совпадения сезонности обострений и результатов скарификационных кожных тестов, необходимо проводить дополнительный этап обследования с определением сенсибилизации к мажорным аллергенам с помощью методов молекулярной диагностики для выбора препарата и прогнозирования эффективности АСИТ.

2. При затяжном течении обострений аллергических заболеваний в весенне-летний период и недостаточной информативности рутинного обследования с помощью скарификационных кожных тестов, использование методов молекулярной диагностики может помочь в решении вопроса о тактике лечения и выборе препарата/препаратов для эффективной аллерген-специфической иммунотерапии у полисенсибилизированных пациентов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Горячкина Л. А. Поллиноз: современный взгляд на актуальную проблему / Л. А. Горячкина, Е. П. Терехова // Фарматека. – 2013. – № 1. – С. 49–56.
2. Sapkota A. Associations between alteration in plant phenology and hay fever prevalence among US adults: Implication for changing climate / A. Sapkota, R. Murtugudde, F. C. Curriero, et al. // Published: March 28, 2019 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212010>. Дата доступа на сайт 07.04.2019.
3. Павлова К. С. Современные стратегии АСИТ больших поллинозом с гиперчувствительностью к пыльце луговых трав / К. С. Павлова, О. М. Курбачёва // Рос. аллергол. журн. – 2015. – № 4. – С. 16–26.
4. Ерешко О. А. Аллерген-специфическая иммунотерапия пылевыми аллергенами при перекрестной пищевой аллергии: что нам известно? / О. А. Ерешко, С. Г. Макарова, Л. С. Намазова-Баранова // Рос. аллергол. журн. – 2018. – № 6. – С. 50–54.
5. Mothes N. Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy / Mothes N., Horak F., Valenta R. // Int Arch Allergy Immunol. – 2004. – Vol. 135(4). – P. 357–73.

## SIGNIFICANCE OF COMPONENT DIAGNOSTIC IN PATIONS WITH RESPIRATORY POLLEN ALLERGY

© 2019 Yu. N. Emelina\*, I. M. Krivolapova

\*E-mail: eyun75@mail.ru

GAUZ SO "Sverdlovsk Regional Children's Clinical Hospital",  
Ekaterinburg, Russia

Received: 22.07.2019. Accepted: 30.08.2019

Molecular diagnosis is increasingly included in the daily practice of allergologists-immunologists. We reviewed the information content of this technique in examining children with respiratory pollen allergies in cases where the conduct of skin tests was not sufficiently effective in identifying a causally significant allergen and choosing a drug for conducting allergen-specific immunotherapy.

*Key words:* respiratory pollen allergy, Bet v1, Phl p1, Phl p5 и Art v1

### Authors:

**Emelina Yu.N.**, ✉ Candidate of Medical Sciences, allergologist-immunologist, consultative and diagnostic clinic, Sverdlovsk Regional Children's Hospital, Ekaterinburg, Russia.

620149, Ekaterinburg, S. Deryabina str., 32. Phone: +7 963 27-07-616; **E-mail:** eyun75@mail.ru;

**Krivilapova I. M.**, biologist, Sverdlovsk Regional Children's Hospital, Ekaterinburg, Russia.

## НЕЙТРОФИЛЫ КАК ЦИТОКИНОПРОДУЦИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ

© 2019 г. А. В. Зурочка<sup>1,2\*</sup>, В. А. Зурочка<sup>1,2</sup>, М. А. Добрынина<sup>1</sup>,  
Л. О. Фомина<sup>1</sup>, А. И. Файзуллина<sup>1</sup>, В. А. Гриценко<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>ФБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

<sup>3</sup>ФБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 12.07.2019. Принята: 29.08.2019

В работе изучена секреция нейтрофилами преформированных цитокинов после часовой инкубации в среде RPMI 1640. Секрецию цитокинов определяли с использованием мультиплексных наборов компании БиоРад (США) для определения 17 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, INF- $\gamma$ , IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) на приборе MAGPIX-100 (США). Установлено, что при инкубации нейтрофилов в среде RPMI 1640 в течение 1 часа в среде инкубации (супернатанте) выявляются GM-CSF, IL-12p70, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6 IL-8 и MIP-1 $\beta$ , концентрация которых в супернатанте нейтрофилов превышала контрольный уровень (среда RPMI-1640) в 1,2–7,0 раз ( $p < 0,05$ – $0,001$ ). Таким образом, нейтрофилы способны секретировать преформированные цитокины в среду культивирования в течение 1 часа после начала их инкубации.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210007060-1

**Адрес:** Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Зурочка Александр Владимирович.

Тел.: +79193077598, E-mail: av\_zurochka@mail.ru

**Авторы:**

**Зурочка А. В.**, д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет, Челябинск, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Зурочка В. А.**, д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Добрынина М. А.**, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Фомина Л. О.**, аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Файзуллина А. И.**, аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Гриценко В. А.**, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что нейтрофилы являются клетками, способными к синтезу и секреции ряда цитокинов, получивших в свое время название нейтрофилокины [1]. В последующем было показано, что нейтрофилы способны секретировать широкий спектр цитокинов и отвечать усилением или снижением их продукции при воздействии различных факторов [2, 3].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение спонтанной секреции преформированных цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучена *in vitro* спонтанная секреция нейтрофилов периферической крови 10 здоровых доноров при часовой их инкубации в среде RPMI 1640. Нейтрофилы из периферической крови доноров получали путем градиентного центрифугирования плазмы крови на двойном градиенте фиколл-верографин плотностью 1,093–1,075. Все процедуры осуществлялись в пластиковой посуде. Венозная кровь, отобранная в вакуумные пробирки для взятия венозной крови с литий-гепарином [4, 5], смешивалась с 6% раствором декстрана Т-500 (на изотоническом растворе хлорида натрия) в соотношении 10:1 и отстаивалась при температуре 37 °С в течение 40 минут. Плазма с лейкоцитами осторожно наплаивалась на двухфазный градиент плотности фиколла-верографина (плотность нижнего слоя 1,093–1,095, верхнего – 1,075–1,077; объем – 1,5 мл) и центрифугировалась при 1500 об./мин в течение 40 минут. Между градиентами располагалось клеточное кольцо, на 98–100% состоящее из нейтрофилов. Нижнее кольцо осторожно снималось дозатором и переносилось в другую пробирку. Клеточная взвесь отмывалась от примеси градиентов, для чего в пробирку добавляли 2,0 мл питательной среды RPMI 1640, центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 минут, а надосадочную жидкость сливали. Отмывку повторяли трижды. После отмывки клеток подсчитывали концентрацию нейтрофилов в камере Горяева и доводили ее питательной средой RPMI 1640 до  $5 \cdot 10^6$  кл/мл.

Наличие в супернатантах клеток цитокинов определяли с использованием мультиплексных наборов компании БиоРад (США) для определения 17 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, INF- $\gamma$ , IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) на приборе MAGPIX-100 (США). Контролем служила среда RPMI 1640 без клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные проведенных опытов *in vitro* свидетельствовали, что после часовой инкубации нейтрофилов в культуральной жидкости наблюдалось появление в ней ряда цитокинов, которые эффективно регистрировались использованной тест-системой для определения 17 цитокинов. В частности, выявлено, что нейтрофилы активно секретируют широкий спектр цитокинов, такие как: GM-CSF, IL-12p70, IL-17A, IL-1 $\beta$  и IL-6, концентрация которых в супернатан-

те нейтрофилов превышала контрольный уровень (среда RPMI-1640) в 1,2–7,0 раз ( $p < 0,05$ – $0,001$ ), а к цитокинам-лидерам относились IL-8 и MIP-1 $\beta$ , кратность увеличения концентрации которых против контроля составляла 23,9 и 36,7 раза соответственно ( $p < 0,001$ ).

Эти результаты указывают на то, что в условиях часовой инкубации (явно недостаточной по времени для синтеза клетками цитокинов *de novo*) нейтрофилы активно выделяют в среду культивирования широкий спектр, очевидно преформированных, главным образом, провоспалительных цитокинов – хемокинов и ростовых факторов. Следует подчеркнуть, что эта клеточная модель позволяет изучать механизмы секреции цитокинов на живых фагоцитах, то есть не ушедших в апоптоз или гибнущих клетках, так как в условиях *in vitro* нейтрофилы живут в питательной среде около суток. При этом основные методики оценки продукции клетками цитокинов, разработанные для лимфоцитов и мононуклеаров, требуют не менее 48–72 часов инкубации, что не позволяет использовать их для изучения цитокиновой активности нейтрофилов. Кроме того, необходимо отметить, что данная методика может быть эффективно использована при исследовании цитокиновой реакции нейтрофилов на действие различных факторов, например бактерий, вирусов, лекарственных препаратов и др., в условиях максимальной их жизнеспособности, обеспечивая более глубокое понимание механизмов функционирования и регуляции фагоцитарных клеток.

## ВЫВОДЫ

1. В супернатантах часовых культур нейтрофилов выявляется широкий спектр цитокинов.
2. Созданная методика оценки секреции преформированных цитокинов нейтрофилами открывает перспективы оценки функциональных и регуляторных эффектов этих клеток *in vitro*.

(Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, и теме из Плана НИР ИКВС УрО РАН, № гос. регистрации 116021510075).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Чукичев А.В. Регуляторные пептиды нейтрофилов (нейтрофилокины). Иммунология. 1995, 4, 40–45 [Dolgushin I. I., Zurochka A. V., Chukichev A. V. Regulatory peptides of neutrophils (neutrophilokins). Immunology. 1995, 4, 40–45].
2. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукарт В.В., Черкасов С.В., Гриценко В.А.

- Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 4: 1–9. [Электронный ресурс]. [A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, E. B. Zueva, M. A. Dobrynina, V. V. Dukardt, S. V. Cherkasov, V. A. Gritsenko. The influence of synthetic peptides the active center granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on cytokine production by human peripheral blood neutrophils. Bulletin of the Orenburg scientific center UB RAS. 2015. 4: 1–9. [Electronic resource].
3. Зурочка А. В., Хайдуков С. В., Кудрявцев И. В., Черешнев В. А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018, 720 с. [Zurochka A. V., Haydukov S. V., Kudryavtsev I. V., Chereshev V. A. Flowing cytometry in biomedical researches. Yekaterinburg: RIO URO RASN, 2018. 720 s.]
  4. Хайдуков С. В., Байдун Л. А., Зурочка А. В., Тотолян Арег. А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов». Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17). 4: 974–992. [Haydukov S. V., Baidun L. A., Zurochka A. V., Totolyan Areg. A. The standardized «Research of Subpopulation Structure of Lymphocytes of Peripheral Blood with Use of Flowing Cytofluorimetrov-analyzeters technology». Russian journal of immunology. 2014. T. 8 (17). 4: 974–992].
  5. Wong L., Wilson R. D. The indentification of Fc and C3 receptors on human neutrophils. J. Immunol. Meth. 1975. 7: 69–76.

## NEUTROPHILS AS THE CYTOKINE PRODUCING CELLS

© 2019 A. V. Zurochka<sup>1,2\*</sup>, V. A. Zurochka<sup>1,2</sup>, M. A. Dobrynina<sup>1</sup>, L. O. Fomina<sup>1</sup>, A. I. Fayzullina<sup>1</sup>, V. A. Gritsenko<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

<sup>3</sup>Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia

Received: 12.07.2019. Accepted: 29.08.2019

In work secretion by neutrophils the preforming of cytokins after an hour incubation to the RPMI 1640 environment is studied. Secretion of cytokin was defined with use of multiplex sets of the Bio-Rad company (USA) for definition of 17 cytokin (G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, INF- $\gamma$ , IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) on the MAGPIX-100 device (USA). It is established that at an incubation of neutrophils in the environment of RPMI 1640 within 1 hour in the environment of an incubation (supernatant) come concentration of which in a supernatant of neutrophils exceeded GM-CSF, IL-12p70, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6 IL-8 and MIP-1 $\beta$  reference level (RPMI-1640 environment) by 1.2–7.0 times ( $p < 0.05–0.001$ ). Thus, neutrophils are able to secrete preformed cytokines into the culture medium for 1 hour after the start of their incubation.

*Key words:* neutrophils, cytokins

### Authors:

**Zurochka A. V.**, ✉ MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; leader scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Phone: +79193077598, E-mail: av\_zurochka@mail.ru;

**Zurochka V. A.**, MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; senior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Dobrynina M. A.**, Junior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Fomina L. O.**, post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Fayzullina A. I.**, post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Gritsenko V. A.**, MD, professor, chief researcher of FGBUN Orenburg federal research center of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia.

## РАЗЛИЧНЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ НЕЙТРОФИЛОВ

© 2019 г. А. В. Зурочка<sup>1,2\*</sup>, В. А. Зурочка<sup>1,2</sup>, М. А. Добрынина<sup>1</sup>,  
Л. О. Фомина<sup>1</sup>, А. И. Файзуллина<sup>1</sup>, В. А. Гриценко<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>ФБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

<sup>3</sup>ФБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 12.07.2019. Принята: 29.08.2019

В исследовании предложены подходы к оценке уровней цитокинов нейтрофилов на основе секреции нейтрофилами преформированных цитокинов после часовой инкубации в среде RPMI 1640. Секрецию цитокинов определяли с использованием мультиплексных наборов компании БиоРад (США), Lumiplex (США), для определения различных цитокинов на приборе MAGPIX-100 (США) и иммуноферментным анализом (ИФА). Установлено, что при инкубации нейтрофилов в среде RPMI 1640 в течение 1 часа в среде инкубации (супернатанте) выявляются различные цитокины, концентрация которых в супернатанте нейтрофилов превышала контрольный уровень (среда RPMI-1640). При добавлении к нейтрофилам различных бактерий, супернатантов бактерий, регуляторных молекул, активность секреции изменяется (стимулируется или угнетается) в зависимости от того субстрата который добавлялся в среду инкубации живых нейтрофилов. Таким образом, предложенный методический подход оценки уровней цитокинов нейтрофилов позволяет изучать механизмы регуляции цитокиновой сети этих клеток.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, цитокины, бактерии, пептиды

DOI: 10.31857/S102872210007062-3

**Адрес:** Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Зурочка Александр Владимирович.

Тел.: +79193077598, E-mail: av\_zurochka@mail.ru

**Авторы:**

**Зурочка А. В.**, д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет, Челябинск, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Зурочка В. А.**, д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Добрынина М. А.**, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Фомина Л. О.**, аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Файзуллина А. И.**, аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Гриценко В. А.**, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Существуют различные подходы к оценке уровней цитокинов клеток. Их можно условно разделить на два основных. Первый — оценка внутриклеточных цитокинов методами проточной цитометрии, второй — определение секретируемых нейтрофилов в супернатантах клеток или тканевых субстратах (сыворотка крови, секреты, слизь и другие жидкости. в том числе



воспалительные экссудаты). Важно, что нейтрофилы находясь практически во всех тканях организма человека, способны синтезировать и секретировать широкий спектр цитокинов, получивших название нейтрофилокины [1, 2, 3]. В то же время известно мало подходов к оценке секреции преформированных (уже синтезированных, но находящихся внутри клетки) цитокинов и методов изменения их секреторного потенциала.

**Целью** настоящего исследования явилось обобщение результатов исследования секреции преформированных цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro* и при воздействии на них различных факторов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Была изучена спонтанная секреция цитокинов нейтрофилами здоровых доноров при часовой инкубации клеток в среде RPMI 1640 и воздействии на нее различных факторов. Объектами исследования были нейтрофилы периферической крови, полученные путем градиентного центрифугирования плазмы крови на двойном градиенте фиколл-верографин плотностью 1,093–1,075 [4, 5]. Между градиентами располагается клеточное кольцо на 98–100% состоящее из нейтрофилов. Нижнее кольцо осторожно снимается пастеровской пипеткой или дозатором и переносится в другую пробирку. Клеточная взвесь отмывается от примеси градиентов питательной средой RPMI 1640, добавляя в пробирку с клетками 2,0 мл питательной среды RPMI 1640 и центрифугируя при 1500 об./мин в течение 10 минут, после чего надосадочную жидкость сливают. Отмывку повторяют трижды; в камере Горяева подсчитывается концентрация клеток и доводится питательной средой RPMI 1640 до  $5 \cdot 10^6$  нейтрофилов в 1 мл. Наличие в супернатантах клеток цитокинов определяли с использованием мультиплексных наборов компании БиоРад (США), Luminex (США) для определения концентрации цитокинов на приборе MAGPIX-100 (США) и иммуноферментным анализом (ИФА). Контролем служила среда RPMI 1640 без клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования, при часовой инкубации нейтрофилы способны секретировать в питательную среду относительно широкий спектр цитокинов, преимущественно

провоспалительной направленности. Вместе с тем установлено, что при добавлении к фагоцитам синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ, бактерий или их супернатантов уровень цитокинов в среде инкубации может существенно меняться. Так, контакт нейтрофилов с синтетическим пептидом активного центра ГМ-КСФ, взвесями золотистых стафилококков или их супернатантами приводит к усилению секреции цитокинов эти ми клетками, тогда как при воздействии на фагоциты коагулазоотрицательных стафилококков, кишечной палочки и энтеробактерий других родов/видов и их супернатантов, напротив, наблюдается снижение уровня цитокинов в среде инкубации.

Указанные обстоятельства свидетельствует о том, что при часовой инкубации (критически короткой по времени для синтеза нейтрофилами цитокинов) даже «интактные» нейтрофилы активно выделяют в среду культивирования широкий спектр регуляторных, преимущественно, провоспалительных цитокинов – хемокинов и ростовых факторов. При этом данная функциональная активность нейтрофилов подвержена изменениям, чья направленность (стимуляция/ингибирование) зависит от воздействующих факторов. Важно, что данная клеточная модель позволяет изучать механизмы секреции цитокинов живыми нейтрофилами и их ответ на воздействие различных факторов, в том числе регуляторных молекул, бактерий и их супернатантов, в условиях максимальной жизнеспособности фагоцитов. Эта методика открывает перспективы для накопления новых знаний о характере реакции нейтрофилов при взаимодействии с повреждающими и регуляторными факторами разного генеза, что будет способствовать расшифровке механизмов их участия в развитии патологических процессов.

## ВЫВОДЫ

1. На клеточной модели *in vitro* выявлена способность нейтрофилов при часовой инкубации выделять в питательную среду ряд цитокинов и вариабельно изменять их секрецию при контакте с факторами разного генеза (синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ, золотистый стафилококк, коагулазоотрицательные стафилококки, эшерихии, энтеробактерии других видов и супернатанты микроорганизмов).

2. Разработанная и апробированная методика оценки секреции нейтрофилами цитокинов может быть использована при изучении влия-

ния *in vitro* на живые фагоциты различных регуляторных факторов, в том числе лекарственных препаратов и микроорганизмов (вирусы, бактерии, грибы).

(Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, и теме из Плана НИР ИКВС УрО РАН, № гос. регистрации 116021510075).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Долгушин И. И., Зурочка А. В., Чукичев А. В. Регуляторные пептиды нейтрофилов (нейтрофилокины). Иммунология. 1995, 4, 40–45. [Dolgushin I. I., Zurochka A. V., Chukichev A. V. Regulatory peptides of neutrophils (neutrophilokins). Immunology. 1995, 4, 40–45].
2. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Зуева Е. Б., Добрынина М. А., Дукарт В. В., Черкасов С. В., Гриценко В. А. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 4: 1–9. [Электронный ресурс]. [A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, E. B. Zueva, M. A. Dobrynina, V. V. Dukardt, S. V. Cherkasov, V. A. Gritsenko. The influence of synthetic peptides the active center granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on cytokine production by human peripheral blood neutrophils. Bulletin of the Orenburg scientific center OIRO RAHN. 2015. 4: 1–9. [Electronic resource].
3. Зурочка А. В., Хайдуков С. В., Кудрявцев И. В., Черешнев В. А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018, 720 с. [Zurochka A. V., Haydukov S. V., Kudryavtsev I. V., Chereshev V. A. Flowing cytometry in biomedical researches. Yekaterinburg: RIO URO RAHN, 2018, 720 s.]
4. Хайдуков С. В., Байдун Л. А., Зурочка А. В., Тотолян Арег. А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов». Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17). 4: 974–992. [Haydukov S. V., Baidun L. A., Zurochka A. V., Totolyan Areg. A. The standardized «Research of Subpopulation Structure of Lymphocytes of Peripheral Blood with Use of Flowing Cytofluorimetrov-analyzeters technology». Russian journal of immunology. 2014. T. 8 (17). 4: 974–992].
5. Wong L., Wilson R. D. The identification of Fc and C3 receptors on human neutrophils. J. Immunol. Meth. 1975. 7: 69–76.

## VARIOUS APPLICATIONS OF A METHOD OF A RESEARCH OF LEVELS OF CYTOKIN OF NEUTROPHILS

© 2019 A. V. Zurochka<sup>1,2\*</sup>, V. A. Zurochka<sup>1,2</sup>, M. A. Dobrynina<sup>1</sup>, L. O. Fomina<sup>1</sup>, A. I. Fayzullina<sup>1</sup>, V. A. Gritsenko<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

<sup>3</sup>Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia

Received: 12.07.2019. Accepted: 29.08.2019

In a research approaches to assessment of levels of cytokin of neutrophils on the basis of secretion by neutrophils the preforming of cytokins after an hour incubation are offered the RPMI 1640 environment. Secretion of cytokins was defined with use of multiplex sets of the Biorad company (USA), Luminex (USA), for definition of various cytokins on the MAGPIX-100 device (USA) and the immunoferral analysis (IFA). It is established that at an incubation of neutrophils in the environment of RPMI 1640 within 1 hour in the environment of an incubation (supernatant) various cytokins come to light concentration of which in a supenatant of neutrophils exceeded reference level (RPMI-1640 environment). At addition to neutrophils of various bacteria, supernatant of bacteria, regulatory molecules, the activity of secretion changes (is stimulated or suppressed) depending on that substrate which was added to the environment of an incubation of live neutrophils. Thus, the offered methodical approach of assessment of levels of cytokin of neutrophils allows to study mechanisms of regulation of cytokins network of these cages.

*Key words:* neutrophils, cytokins, bacteria, peptides

**Authors:**

**Zurochka A. V.**, ✉ MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; leader scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia.

Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Phone: +79193077598,  
**E-mail:** av\_zurochka@mail.ru;

**Zurochka V. A.**, MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; senior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Dobrynina M. A.**, Junior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Fomina L. O.**, post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Fayzullina A. I.**, post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Gritsenko V. A.**, MD, professor, chief researcher of FGBUN Orenburg federal research center of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia.

## УРОВЕНЬ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ПРИ ВАРИЦЕЛЛА ЗОСТЕРНОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2019 г. С. В. Кныш<sup>1</sup>, Е. С. Мачгарева<sup>2</sup>, А. И. Симакова<sup>1</sup>, В. Е. Красников<sup>1</sup>

*E-mail: immunolog.vl@gmail.com*

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»  
Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

<sup>2</sup>ГБУЗ Краевая клиническая больница № 2, Владивосток, Россия

Поступила: 09.07.2019. Принята: 21.08.2019

Нет единого мнения о причинах реактивации вируса ветряной оспы и нейробиологической основе патогенеза опоясывающего герпеса. Основным белком миелина (МРВ) — это один из основных биомаркеров нейронального воспаления. Цель: провести сравнительный анализ содержания основного белка миелина в сыворотке крови пациентов с опоясывающим герпесом в зависимости от клинической картины заболевания. Материалы и методы: сыворотка крови пациентов с опоясывающим герпесом, разделенных на 3 группы: 1 группа — пациенты со слабым и умеренным болевым синдромом; 2 группа — пациенты с сильным болевым синдромом; 3 группа — пациенты с опоясывающим герпесом, осложнившимся постгерпетической невралгией. Результаты: зарегистрировано достоверное повышение МРВ во всех исследуемых группах в сравнении с группой контроля ( $p < 0,05$ ). Сывороточное содержание МРВ в группе 2 было значимо выше ( $p < 0,05$ ) чем в группе 1 и группе 3, между которыми различий в содержании исследуемого белка выявлено не было.

**Ключевые слова:** основной белок миелина, опоясывающий герпес, постгерпетическая невралгия

DOI: 10.31857/S102872210007063-4

**Адрес:** 690002, Российская Федерация, Дальневосточный федеральный округ, Приморский край, г. Владивосток, проспект Острякова, дом 2. Телефон: 8 (423) 245–07–00

**E-mail:** immunolog.vl@gmail.com

**Авторы:**

**Кныш С. В.**, ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

**Мачгарева Е. С.**, врач-невролог ГБУЗ Краевая клиническая больница № 2, Владивосток, Россия;

**Симакова А. И.**, д.м.н., доцент, заведующая кафедрой инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

**Красников В. Е.**, к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия.

Проблема опоясывающего герпеса находится на стыке междисциплинарного изучения. Патогенез заболевания и клинические проявления многообразны и затрагивают как кожные покровы, так и нервную систему, обуславливая формирование очага нейро-иммунного воспаления. Единого мнения о причинах по которым

реактивация вируса ветряной оспы вызывает различные клинические состояния у разных пациентов однозначно не сформировано [4]. Нейробиологические проявления реактивации вируса разнообразны и также не имеют достоверных маркеров или предикторов, что обуславливает актуальность исследования данного вопроса. Одним из наиболее интересных биомаркеров нейронального воспаления является основной белок миелина, который обладает, в том числе, и иммунореактивной функцией, обуславливающей развитие иммуноопосредованных заболеваний нервной системы [2,7].

**Цель данной работы** — провести сравнительный анализ содержания основного белка миелина в сыворотке крови пациентов с опоясывающим герпесом в зависимости от клинической картины заболевания.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом послужила сыворотка 106 пациентов, находившихся на лечении в инфекционном отделении ГБУЗ ККБ № 2 г. Владивостока в 2016–2019 гг. У всех пациентов был выстав-

лен диагноз опоясывающий герпес, который был подтвержден лабораторно, путем определения ДНК вируса ветряной оспы в слюне или сыворотке пациентов методом количественной ПЦР. Факт реактивации, а не первичного инфицирования вирусом варицеллы зостер был подтвержден путем определения антител IgG к гликопротеину E (anti-VZV IgG-gE), что является лабораторным маркером реактивации вирусной инфекции. У всех пациентов проводился мониторинг состояния, жалоб, клинических проявлений и уровня МВР в сыворотке крови на 1-е и 10-е сутки госпитализации. Через 3 месяца пациенты были опрошены по вопросу сохранения болевого синдрома, ассоциированного с эпизодом опоясывающего герпеса. Ретроспективно все пациенты были разделены на три группы: 1-я группа пациентов с опоясывающим герпесом, сопровождающимся слабым или умеренным болевым синдромом (по данным цифровой ранговой шкалы – 4 и менее балла); 2-я группа пациентов с опоясывающим герпесом, с сильным болевым синдромом (по данным цифровой ранговой шкалы – 5 и более баллов во время острого периода болезни); 3-я группа пациентов с опоясывающим герпесом, осложнившимся постгерпетической невралгией. Определение концентрации основного белка миелина МВР проводили с использованием специфических реактивов для иммуноферментного анализа, производства R&D Systeminc. (USA). Учет результатов проводили с помощью иммуноферментного анализатора «Multiscan» (Финляндия). Расчет количества медиаторов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пг/мл. Данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Me, Q25, Q75). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%, т.е. нулевые гипотезы отвергались в том случае, когда достигнутый уровень значимости  $P$  используемого статистического критерия принимал значения менее 5%. Статистическая обработка проводилась с использованием программы SPSS Statistics v.16. Внутри и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна-Уитни в рамках прикладной программы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех основных группах было установлено достоверное повышение сывороточного содержания МВР в сравнении с показателями в группе контроля (37,4; 12,6; 57,2 пг/мл) ( $p < 0,05$ ). Сыво-

роточное содержание основного белка миелина в группе 2 (357,6; 286,4; 513,4 пг/мл) у пациентов с сильным болевым синдромом, было выше, как в сравнении с группой контроля, так и в сравнении с группой 1 (138,6; 89,5; 242,3 пг/мл) и группой 3 (154,4; 80,4; 260,3 пг/мл), между которыми достоверных отличий обнаружено не было.

Протеазная активность матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) влияет на высвобождение МВР из миелиновой оболочки нервных волокон при их повреждении [6], что может быть одной из причин повышения уровня данного белка у всех пациентов с опоясывающим герпесом. Учитывая данные о повышенной функциональной активности ММР-9, ассоциированной с сильным болевым синдромом при опоясывающем герпесе [1], достоверное повышение исследуемого показателя у пациентов группы 2 является предполагаемым по причине дисбаланса в системе матриксной металлопротеиназы-9 и ее тканевого ингибитора-1. Однако, отсутствие ожидаемого выраженного повышения сывороточного содержания у пациентов группы 3, в сравнении с группой 1 порождает ряд вопросов.

В исследовании Н. Liu et al (2012) освещается роль МВР в формировании нейропатической боли, в том числе за счет участия ММР-9 в процессе дегенерации миелина. Это явление способствует хронизации нейропатического болевого синдрома, но реализуется через два самостоятельных механизма – Т-зависимый и независимый [5]. Аутоантитела к основному белку миелина, вероятно, способны снижать регистрируемое сывороточное содержание МВР и нельзя исключать обусловленность повышенной заболеваемости постгерпетической невралгией у пациентов с аутоиммунными заболеваниями [3], в том числе и через иммунную реактивность МВР.

Основной белок миелина – один из основных биомаркеров повреждения миелина в центральной и периферической нервной системе. Повышение его уровня является не только индикатором различных нейродегенераторных или нейровоспалительных процессов, но и предиктором развития аутоиммунных состояний. Нами было выявлено достоверное повышение сывороточного содержания МВР у всех пациентов с опоясывающим герпесом, однако наибольшее содержание белка определено у пациентов с сильным болевым синдромом по данным цифровой ранговой шкалы. Мы связываем данное наблюдение с повышенной активностью матриксной металлопротеиназы-9,

которая является одним из основных участников в процессе формирования нейропатической боли. Отсутствие достоверного повышения сывороточного содержания основного белка миелина у пациентов с опоясывающим герпесом, осложнившимся постгерпетической невралгией, может быть связано с существованием аутоантител к МВР и реализацией Т-зависимого механизма формирования стойкого болевого синдрома. Однако, вопрос участия основного белка миелина в развитии постгерпетической невралгии требует дальнейших исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Кныш С. В., Малков В. А., Чагина Е. А., Потепенко А. А., Изменение матриксной металлопротеиназы-9 и ее тканевого ингибитора-1 при опоясывающем герпесе. Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 12(21). № 4. С. 683–685. [Knysh S. V., Malkov V. A., Chagina E. A., Potapenko A. A. Alterations in matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 serum concentrations in patients with herpes zoster. Russian journal of immunology. 2018. 12(21). N.4. P. 683–685]
2. Маркелова Е. В., Зенина А. А., Кадиров Р. В. Нейропептиды как маркеры повреждения головного мозга // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 5. [Markelova E. V., Zenina A. A., Kadyrov R. V. Neuropeptides as markers of traumatic brain injury.// Modern problems of science and education. 2018. N. 5.]; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28099> (дата обращения: 10.07.2019).
3. Forbes H. J., Bhaskaran K., Thomas S. L., Smeeth L., Clayton T., Mansfield K., Minassian C., Langan S. M. Quantification of risk factors for postherpetic neuralgia in herpes zoster patients: A cohort study. *Neurology*. 2016;87(1), 94–102. doi: 10.1212/WNL.0000000000002808.
4. Gilden D., Mahalingam R., Nagel M. A., Pugazhenth S., Cohrs R. J. Review: The neurobiology of varicella zoster virus infection. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011; 37(5): 441–463. doi:10.1111/j.1365-2990.2011.01167.x
5. Liu H., Shiryaev S. A., Chernov A. V., Kim Y., Shubayev I., Remacle A. G., Baranovskaya S., Golubkov V. S., Strongin A. Y., Shubayev V. I. Immunodominant fragments of myelin basic protein initiate T cell-dependent pain. *J Neuroinflammation*. 2012; 9, 119. doi: 10.1186/1742-2094-9-119.
6. Shubayev V. I., Strongin A. Y., Yaksh T. L. Role of myelin auto-antigens in pain: a female connection. / *Neural Regeneration Research*. 2016. Vol. 11(6). P. 890–891.
7. Weil M. T., Möbius W., Winkler A., Ruhwedel T., Wrzos C., Romanelli E., Bennett J. L., Enz L., Goebels N., Nave K. A., Kerschensteiner M., Schaeren-Wiemers N., Stadelmann C., Simons M. Loss of Myelin Basic Protein Function Triggers Myelin Breakdown in Models of Demyelinating Diseases. *Cell Rep*. 2016,16(2), 314–322. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.008.

## THE LEVEL OF MYELIN BASIC PROTEIN IN VARICELLA-ZOSTER INFECTION

© 2019 S. V. Knysh<sup>1</sup>, E. S. Machtareva<sup>2</sup>, A. I. Simakova<sup>1</sup>, V. E. Krasnikov<sup>1</sup>

E-mail: immunolog.vl@gmail.com

<sup>1</sup>FSBEI HE «Pacific state medical university» Ministry of Health Russia, Vladivostok, Russia;

<sup>2</sup>Territorial Clinical Hospital № 2, Vladivostok, Russia

Received: 09.07.2019. Accepted: 21.08.2019

There is no consensus on the causes of reactivation of the varicella zoster virus and the neurobiological fundament of herpes zosterpathogenesis. The myelin basic protein(MBP)—is one of the main biomarkers of neuronal inflammation. Purpose: to conduct a comparative analysis of the content of the myelin basic protein in the serum of patients with herpes zoster depending on the clinical course of the disease. Materials and methods: blood serum of patients with herpes zoster divided into 3 groups: 1 group—patients with mild and moderate pain syndrome; 2 group—patients with severe pain syndrome; Group 3—patients with herpes zoster complicated by postherpetic neuralgia. Results: there was a significant increase in MBP in all study groups compared to the control group ( $p<0.05$ ). The serum MBP content in group 2 was significantly higher ( $p<0.05$ ) than in group 1 and group 3, between which there is found no differences in the protein content.

**Key words:** MBP, shingles, postherpetic neuralgia, PHN

#### Authors:

**Knysh S. V.**, assistant professor of normal and pathological physiology department, FSBEI HE PSMU MOH Russia, Vladivostok, Russia.

**Machtareva E. S.**, neurologist, Territorial Clinical Hospital № 2, Vladivostok, Russia

**Simakova A. I.**, DrSci, associate professor, head of department of infectious diseases, FSBEI HE PSMU MOH Russia, Vladivostok, Russia.

**Krasnikov V. E.**, Phd, associate professor of normal and pathological physiology department, FSBEI HE PSMU MOH Russia, Vladivostok, Russia.

## ХАРАКТЕР ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ПРИ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ

© 2019 г. М. Н. Козлова\*, В. М. Земсков, А. А. Алексеев, Н. С. Шишкина, А. А. Барсуков, В. С. Демидова

\*E-mail: mnkozlova@rambler.ru

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия

Поступила: 18.07.2019. Принята: 26.08.2019

Проведен расширенный анализ иммунного статуса (более 45 показателей) у 120 тяжело обожженных пациентов. Выявленные статистически значимые иммунные нарушения сопряжены с параллельно идущими процессами: иммунной гиперактивацией и иммуносупрессией, тяжесть которых зависит от площади ожогового поражения и периода ожоговой болезни. Ранняя иммунодиагностика по формуле прогноза сепсиса, разработанная нами позволяет выявлять пациентов с высоким риском генерализации инфекции и септическими осложнениями для обеспечения соответствующей комплексной терапии и своевременной иммуннокоррекции.

**Ключевые слова:** иммунный статус, иммуннокоррекция, ожоговая болезнь

DOI: 10.31857/S102872210007064-5

**Адрес:** 117997, Москва, ул. Большая Серпуховская, д.27, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, клиничко-диагностическая лаборатория, группа клинической иммунологии. Козлова Мария Николаевна.

Тел.: 8 903 731 91 57 (моб.); E-mail: mnkozlova@rambler.ru

### Авторы:

**Козлова М. Н.**, к. м. н., старший научный сотрудник группы клинической иммунологии КДЛ ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия;

**Земсков В. М.**, д. м. н., профессор, главный научный сотрудник, руководитель группы клинической иммунологии КДЛ ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия;

**Алексеев А. А.**, д. м. н., профессор, руководитель Ожогового центра ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия;

**Шишкина Н. С.**, младший научный сотрудник клиничко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия;

**Барсуков А. А.**, к. м. н., старший научный сотрудник клиничко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия;

**Демидова В. С.**, д. б. н., заведующий клиничко-диагностической лабораторией ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Сложный комплекс изменений, которые возникают при ожоговой болезни в организме, могут негативно влиять на формирование

полноценного адаптивного иммунного ответа на различные антигены, нередко приводя к инфекционным и септическим осложнениям. В этой связи активная иммунодиагностика с уточнением типа нарушений ключевых звеньев иммунной системы становится актуальной и может служить надежным инструментом в определении тяжести ожоговой болезни, выявлении пациентов с высоким риском септических осложнений для обеспечения соответствующей комплексной терапии и своевременной иммуннокоррекции.

**Цель работы.** Определить характер иммунных нарушений у пациентов с ожоговой болезнью, в зависимости от тяжести и периода ожоговой болезни, оценить эффективность иммуннокоррекции для профилактики и лечения септических осложнений.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Расширенный иммунный статус (более 45 маркеров) в разные периоды ожоговой болезни выполнен у 120 пациентов— 56 женщин и 64 мужчин, средний возраст которых 49 лет. Площадь ожогового поражения составила в среднем (М) 46,3% поверхности тела из них глубоких ожо-

гов – М = 17,8% п.т. Фенотипирование фагоцитарных и лимфоидных клеток выполняли методом проточной цитометрии в цельной венозной крови (антикоагулянт КЗЭДТА) на проточном цитофлуориметре FACS Calibur Becton Dickinson (США) с панелью антител, меченых флуорохромами (PE, FITC) с соответствующими изотипическими маркерами и прописью методики фирмы Becton Dickinson. Уровень иммуноглобулинов (А, М, G) в сыворотке крови измеряли методом турбидиметрии на биохимическом анализаторе Hospitex (Голландия), а кислородного метаболизма фагоцитов – методом хемилюминесценции на мультиплетном анализаторе Synergy 2 SLAD (США). Группу сравнения составили 20 здоровых добровольцев. Результаты обрабатывали двойным статистическим методом по формуле расстройств иммунной системы (ФРИС) с оценкой степени изменений иммунной системы, и по критерию  $\chi^2$ . Для анализа результатов отбирали только статистически различающиеся показатели.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разнонаправленные изменения показателей иммунного статуса возникали при ожогах более 30% п.т. Развивался глубокий дефицит общих лимфоцитов ( $p < 0,05$ ), IgG  $5,3 \pm 0,7$  г/л, CD16<sup>+</sup>  $4,8 \pm 0,9\%$ , CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>  $2,7 \pm 0,3\%$ , HLA-DR<sup>+</sup> моноциты  $43,6 \pm 2,6\%$ . Длительно сохранялись высокие значения CD64<sup>+</sup> гранулоцитов при одновременном возрастании лейкоцитоза, индексов эндогенной интоксикации, кислородного метаболизма фагоцитов. На этом фоне комбинированный дефицит Т-клеточного иммунного звена нередко оказывался фактором неблагоприятного течения ожоговой болезни, особенно при развитии сепсиса. Разработанная нами ранее количественная формула иммунодиагностики и прогноза сепсиса, включает панель иммунных маркеров, которые также позволяют своевременно и эффективно применять иммунотерапию в комплексном лечении тяжелообожженных. Получены положительные клинико-иммунологические результаты при использовании внутривенного иммуноглобулина – Габриглобин

с общей высокой эффективностью в группе профилактики сепсиса – 72% (без габриглобина – 37%), в группе лечения – 79% (без габриглобина – 32%).

Выявленные статистически значимые иммунные нарушения сопряжены с параллельно идущими процессами: иммунной гиперактивацией и иммуносупрессией, тяжесть которых зависит от площади ожогового поражения и сроков ожоговой болезни. При оценке прогностической и диагностической значимости маркеров сепсиса важно использовать именно панель иммунных показателей, а не манипулировать только каким-либо мономаркером. Данный подход требует минимального количества материала и времени и позволяет уже через 1–3 ч. получить объективную информацию о полном состоянии иммунного статуса организма для обеспечения соответствующей комплексной терапии и своевременной иммунокоррекции при ожоговой болезни.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Земсков В. М., Алексеев А. А., Козлова М. Н., Шишкина Н. С., Гнатенко Д. А., Земсков А. М., Бахов Н. И. Иммунная диагностика септических осложнений при ожогах. // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135. № 6. – С. 531–541.
2. Greenhalgh D. G. Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population. // Burns Trauma. 2017; 5: 23.
3. Zemskov V. M., Alekseev A. A., Gnatenko D. A., Kozlova M. N., Shishkina N. S., Zemskov A. M., Zhegalova I. V., Bleykhman D. A., Bahov N. I., Suchkov S. V. Composite Biomarker Panel as a Highly Informative and Reliable Tool for Predicting Septic Complications. // Jacobs Journal of Biomarkers – 2016. – Vol. 2(1): 016, p.1–10.
4. V. M. Zemskov, A. A. Alekseev, M. N. Kozlova, N. S. Shishkina, D. A. Gnatenko, A. M. Zemskov and N. I. Bahov. Immune diagnostics of septic complications in burns. // Biology bulletin reviews. – 2016. – Vol. 6, No. 4, p. 344–354.
5. Zemskov V. M., Alekseev A. A., Kozlova M. N., Shishkina N. S., Bleykhman D. A., Zemskov A. M., Suchkov S. V. Changes in the immune system depending on the stage of burn disease and the area of thermal destruction. Immunoglobulin replacement therapy with gabriglobin. International Journal of Recent Scientific Research. Vol. 8, Issue, 1, pp. 15407–15412, January, 2017.



**NATURE OF IMMUNE DISTURBANCES AND POSSIBILITY  
OF IMMUNOCORRECTION IN BURN DISEASE**

©2019 **M. N. Kozlova\***, **V. M. Zemskov**, **A. A. Alekseev**, **N. S. Shishkina**,  
**A. A. Barsukov**, **V. S. Demidova**

*\*E-mail: mnkozlova@rambler.ru*

*A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia*

**Received:** 18.07.2019. **Accepted:** 26.08.2019

An extended analysis of the immune status (more than 45 indicators) was carried out in 120 patients with a burn injury. The revealed statistically significant immune disorders are associated with parallel processes: immune hyperactivity and immunosuppression, the severity of which depends on the area of the burn injury and the period of the burn disease. Early immunodiagnostics according to the formula for prediction of sepsis developed by us, allows to identify patients with a high risk of generalization of infection and sepsis for the corresponding complex therapy and timely immunocorrection.

*Key words:* immune status, immunocorrection, burn disease

**Authors:**

**Kozlova M. N.**, ✉ PhD, Senior Researcher, Clinical Immunology Group, Clinical Diagnostic Laboratory A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia. **E-mail:** mnkozlova@rambler.ru;

**Zemskov V. M.**, MD, Professor, Chief Researcher, Head of the Clinical Immunology Group of the Clinical Diagnostic Laboratory A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia;

**Alekseev A. A.**, MD, PhD, Head of Burns Center A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia;

**Shishkina N. S.**, Junior Researcher, Clinical Immunology Group, Clinical Diagnostic Laboratory A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia;

**Barsukov A. A.**, PhD, Senior Researcher, Clinical Immunology Group, Clinical Diagnostic Laboratory A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia;

**Demidova V. S.**, Doctor of biological sciences, Head of the clinical diagnostic laboratory A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia.

## ТЕСТ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ В ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ

© 2019 г. Я. И. Козлова\*, Е. В. Бурьгина, А. В. Соболев, Н. Н. Климко

\*E-mail: kozlova510@mail.ru

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 11.07.2019. Принята: 23.08.2019

Хроническая крапивница (ХК) является серьезной медико-социальной проблемой, значительно снижающей качество жизни пациентов. Хроническая аутоиммунная крапивница (ХАК) характеризуется наличием аутоантител к IgE или его высокоаффинному рецептору FcεRI. В исследование было включено 16 больных ХК. Тест с аутологичной сывороткой был положительный у 31% больных. Уровень общего IgE выше нормы выявили у 38% больных. Установлено более высокое число базофилов с активационными маркерами CD203c ( $14,0 \pm 2,7\%$  vs  $9,3 \pm 2,3\%$ ) и повышенные значения индекса стимуляции (ИС) ( $2,0 \pm 0,4$  vs  $1,3 \pm 0,3$ ) у больных с положительным тестом с аутосывороткой по сравнению с больными, у которых тест с аутосывороткой был отрицательный. Результаты внутрикожного тестирования и положительная корреляция со степенью выраженности активации базофилов позволили в 64% случаев диагностировать ХАК. Тест активации базофилов *in vitro* — перспективный метод диагностики хронической аутоиммунной крапивницы, который позволяет определить дальнейшую терапевтическую тактику.

**Ключевые слова:** хроническая крапивница, тест активации базофилов

DOI: 10.31857/S102872210007065-6

**Адрес:** 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба 1/28. Кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии СЗГМУ им. И. И. Мечникова.

Тел./факс +7(812)3035146, 89217530479 (моб.)

**E-mail:** kozlova510@mail.ru

**Авторы:**

**Козлова Я. И.**, к.м.н., доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия;

**Бурьгина Е. В.**, старший лаборант кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия;

**Соболев А. В.**, д.м.н., профессор кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия;

**Климко Н. Н.**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия.

Хроническая крапивница (ХК) является серьезной медико-социальной проблемой. Результаты различных исследований свидетель-

ствуют, что частота хронической спонтанной крапивницы в популяции составляет от 0,1 до 1% [1]. Для ХК характерно длительное рецидивирующее течение, пациенты отмечают симптомы на протяжении 5–10 лет. Дебют хронической крапивницы возможен в любом возрасте, однако заболевание встречается преимущественно у лиц в возрасте 20–40 лет. Выраженный зуд и нарушение сна, длительное течение заболевания приводят к утрате трудоспособности и значительному снижению качества жизни.

Исследования последних лет свидетельствуют, что около 45% случаев хронической спонтанной крапивницы имеют аутоиммунную природу [2]. Тучным клеткам и базофилам принадлежит центральная роль в патогенезе всех форм крапивницы. Патологические механизмы развития хронической аутоиммунной крапивницы (ХАК) связаны с наличием аутоантител к IgE или его высокоаффинному рецептору FcεRI [3], экспрессируемому на тучных клетках и базофилах. В настоящее время у больных ХАК используют внутрикожный тест с аутологичной

сывороткой. Однако проведение теста имеет ряд противопоказаний. Кроме того, выявление аутореактивности не является прямым свидетельством аутоиммунной природы крапивницы, но дает основания предположить присутствие в сыворотке циркулирующих функциональных аутоантител. Для диагностики аутоиммунной природы заболевания перспективным методом *in vitro* является тест активации базофилов [4]. Этот функциональный тест, позволяет оценить дегрануляцию базофилов под воздействием индуцирующих факторов сыворотки. Активация базофилов приводит не только к высвобождению растворимых медиаторов, но и экспрессии на мембране маркеров активации – CD63 и CD203c, которые учитывают с помощью метода проточной цитофлуориметрии [3].

**Цель работы:** определить клинико-иммунологические характеристики больных хронической крапивницей и оценить диагностические возможности теста активации базофилов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили 16 больных хронической крапивницей, в возрасте от 22 до 80 лет (медиана-42), женщины-81%, мужчины-19%. Лабораторное обследование включало общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови (билирубин, функциональные пробы печени, креатинин, мочевины, глюкоза), определение ревматоидного фактора и С-реактивный белок. Выполняли исследование сыворотки крови на ВИЧ, RW и HBsAg. Определяли уровень общего IgE, гормонов щитовидной железы ТТГ, Т3, Т4, антитела к тиреопероксидазе (ТПО) и тиреоглобулину (ТГ). Сыворотки больных ХК инкубировали с донорской цельной кровью. Изучение активации базофилов проводили методом проточной цитометрии с использованием набора Allergenicity kit (BECKMAN-COULTER, США). Идентификацию степени активации базофилов определяли по количеству содержания клеток с высокой экспрессией CD203c. Подсчитывали индекс стимуляции (ИС) как отношение активированных базофилов донора после инкубации с сывороткой крови пациента к числу базофилов, несущие CD203c, после инкубации с сывороткой другого здорового донора.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Продолжительность ХСК варьировала от 6 месяцев до 14 лет (медиана-5 лет). У 44% боль-

ных продолжительность составила от 6 месяцев до 3 лет, у 19% – от 3 до 5 лет, у 37% пациентов более 5 лет. Сочетание уртикарных высыпаний и ангиоотека наблюдали у 44% пациентов. Течение крапивницы у обследованных больных было тяжелым, применение антигистаминных препаратов в стандартных дозировках неэффективно. При поступлении средний балл по шкале UAS7 у больных ХСК составил 34. В результате обследования повышенный уровень С-реактивного белка (более 5 мг/л) определили в 50% случаев. У 25% больных выявили повышенный уровень АТ к ТПО, АТ к ТГ, установили диагноз – аутоиммунный тиреодит. Тест с аутологичной сывороткой был положительный у 31% больных. Уровень общего IgE выше нормы выявили у 38% больных. Установлено более высокое число базофилов с активационными маркерами CD203c ( $14,0 \pm 2,7\%$  vs  $9,3 \pm 2,3\%$ ) и повышенные значения ИС ( $2,0 \pm 0,4$  vs  $1,3 \pm 0,3$ ) у больных с положительным тестом с аутосывороткой по сравнению с пациентами с отрицательной кожной пробой.

Результаты внутрикожного тестирования и положительная корреляция со степенью выраженности активации базофилов позволили у больных в 64% случаев диагностировать аутоиммунную форму хронической крапивницы. Для больных хронической аутоиммунной крапивницей характерны более продолжительные и тяжелые обострения заболевания. Своевременная диагностика аутоиммунного компонента способствует изменению тактики лечения и переходу на третью (омализумаб) и четвертую (циклоспорин А) ступени терапии в соответствии с современными международными и отечественными рекомендациями [1].

## ВЫВОДЫ

Тест активации базофилов *in vitro* – перспективный метод диагностики хронической аутоиммунной крапивницы, который в комплексе с тестом с аутосывороткой позволяет определить дальнейшую терапевтическую тактику.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Zuberbier T., Aberer W., Asero R., et al. The EAACI/GA2LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria. *Allergy*, 2018; 73(7): 1393–1414.
2. Kaplan A. P. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of chronic spontaneous urticaria. *Allergy Asthma Proc.* 2018 May 1; 39(3): 184–190.

3. Kim Z., Choi B. S., Kim J. K., Won D. I. Basophil markers for identification and activation in the indirect basophil activation test by flow cytometry for diagnosis of autoimmune urticaria. *Ann Lab Med.* 2016 Jan; 36(1): 28–35.
4. Curto-Barredo L., Yelamos J., Gimeno R., Mojal S., Pujol Ramon M., Giménez-Arnau A. Basophil activation test identifies the patients with chronic spontaneous Urticaria suffering the most active disease. *Immun Inflamm Dis.* 2016; 4(4): 441–445.

## BASOPHIL ACTIVATION TEST IN THE DIAGNOSIS OF CHRONIC URTICARIA

© 2019 Y. I. Kozlova\*, E. V. Burygina, A. V. Sobolev, N. N. Klimko

\*E-mail: kozlova510@mail.ru

*North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov,  
Saint-Petersburg, Russia*

**Received:** 11.07.2019. **Accepted:** 23.08.2019

Chronic urticaria (CU) is a serious medical and social problem that significantly reduces the quality of patients life. Chronic autoimmune urticaria (CAU) is characterized by the presence of autoantibodies to IgE or its high affinity FcεRI receptor. The study included 16 patients with CU. The autologous serum skin test (ASST) was positive in 31% of patients. The level of elevated total IgE was detected in 38% of patients. A higher number of basophils with activation markers CD203c ( $14.0 \pm 2.7\%$  vs  $9.3 \pm 2.3\%$ ) and increased values of the stimulation index (SI) ( $2.0 \pm 0.4$  vs  $1.3 \pm 0, 3$ ) were identified in patients with positive ASST compared to patients with negative ASST. The results of intracutaneous testing and positive correlation with expression of basophil activation markers made it possible to diagnose CAU in 64% of cases. Basophil activation test in vitro is a promising method for the diagnosis of CAU, which allows to determine further therapeutic tactic.

*Key words:* chronic urticaria, basophil activation test

### Authors:

**Kozlova Y. I.**, ✉ PhD, Associate professor of the Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia. **E-mail:** kozlova510@mail.ru;

**Burygina E. V.**, MD, Senior Lab Assistant of the Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia;

**Sobolev A. V.**, PhD, Professor of the Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, Head Allergologist of the North-Western Federal District and Leningrad Oblast, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia;

**Klimko N. N.**, PhD, Professor, Head Professor of the Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia.

## МЕТАБОЛИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПРОГНОЗЕ РЕЗУЛЬТАТА ПОВТОРНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ РОГОВИЦЫ

© 2019 г. Ю. А. Комах<sup>1\*</sup>, С. А. Борзенок<sup>1</sup>, Т. В. Радыгина<sup>2</sup>,  
С. В. Петричук<sup>2</sup>, Д. Г. Герасимова<sup>2</sup>

\*E-mail: komakh@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова»  
Минздрава РФ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава РФ, Москва, Россия

Поступила: 14.07.2019. Принята: 22.08.2019

В работе проведена оценка информативности соотношения активности митохондриальных дегидрогеназ глицерол-3-фосфата (ГФДГ) и сукцината (СДГ) в основных популяциях лимфоцитов для прогноза отторжения трансплантата у 15 реципиентов группы риска до проведения повторной трансплантации роговицы. У пациентов с неблагоприятным исходом выявлено увеличение отношения активности ГФДГ/СДГ во всех основных популяциях лимфоцитов, наиболее выраженное в В-лимфоцитах и НК-клетках. Отношение активности ГФДГ/СДГ может служить прогностическим показателем отторжения трансплантата при рекератопластике.

**Ключевые слова:** трансплантация роговицы, метаболизм лимфоцитов, иммунофенотипирование

DOI: 10.31857/S102872210007066-7

**Адрес:** 127486 Москва, Бескудниковский бульв., 59А, ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава РФ, лаборатория трансплантологии и клеточной биологии. Комах Юрий Алексеевич.  
Тел./факс: +7 (499) 48889-39, 89035583209 (моб.).

**E-mail:** komakh@yandex.ru

### Авторы:

**Комах Ю. А.**, к.м.н., заведующий лабораторией трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Борзенок С. А.**, д.м.н., профессор, заведующий Центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Радыгина Т. В.**, к.м.н., и.о. заведующей лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Петричук С. В.**, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Научный центр здоровья детей» МЗ РФ, Москва, Россия;

**Герасимова Д. Г.**, м.н.с. лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Научный центр здоровья детей» МЗ РФ, Москва, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Трансплантация роговицы по количеству выполняемых операций в год занимает первое

место среди всех трансплантаций органов и тканей, и в первый год после операции дает высокий процент успеха. К сожалению, в отдаленные сроки наблюдения у реципиентов группы высокого риска отторжения трансплантата процент успеха снижается и через 10 лет составляет всего 35%. Возникает проблема проведения повторных трансплантаций роговицы. При повторной трансплантации роговицы прозрачное приживление наблюдается лишь у 33–75% реципиентов [1].

Ранее нами была показана высокая информативность оценки малых популяций лимфоцитов у реципиентов в прогнозе сроков возникновения послеоперационных осложнений [1]. У реципиентов с неблагоприятным биологическим результатом рекератопластики выявлено достоверное увеличение количества агрессивных Th17-лимфоцитов по сравнению с группой реципиентов с прозрачным приживлением трансплантата.

В последнее время большое внимание уделяется иммунометаболизму лимфоцитов и определению активности внутриклеточных ферментов в них при различных патологиях [2]. Известно, что каждый этап иммунного ответа характеризу-

ется определенным метаболическим профилем лимфоцитов. Так, например, в наивных Т-клетках преобладают процессы окислительного фосфорилирования, в пролиферирующих клетках преобладают процессы гликолиза и глутаминолиза. Дифференцировка Т-лимфоцитов связана с активацией разных метаболических путей. Для Th1, Th2 и Th17 клеток – это гликолиз, а для Т-регуляторных клеток – цикл окисления жирных кислот [3]. Нарушения метаболизма лимфоцитов приводят к развитию аутоиммунных и воспалительных процессов.

**Цель исследования.** Оценить информативность определения функциональной активности различных популяций лимфоцитов для прогноза исхода повторной трансплантации роговицы у реципиентов группы высокого риска.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 15 пациентов (1 группа) с помутнением трансплантата роговицы, которым планировалась повторная трансплантация роговицы. Возраст пациентов варьировал от 49 до 65 лет. Всем пациентам до операции проводилось стандартное офтальмологическое обследование. Кроме того, всем пациентам было проведено определение активности митохондриальных дегидрогеназ в разных популяциях лимфоцитов иммуноцитохимическим методом [4]. Определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) в основных популяциях лимфоцитов (ЛФ) на проточном цитометре с визуализацией (Image Stream ХМКП – Luminex, США). Показатель активности в выделенных популяциях ЛФ определяли по приросту коэффициента бокового светорассеяния в процентах после проведения цитохимической реакции. Статистическая обработка была выполнена с помощью пакета Statistica 6.0. (критерий Манна-Уитни). Данные представлены в виде медианы, нижней и верхней квартили. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологический результат повторной кератопластики оценивали через год после операции: у 3 реципиентов получено прозрачное приживание трансплантата, а у 12 пациентов трансплантат помутнел в сроки от 1 до 8 месяцев после операции. Группу сравнения составили 24 условно-здоровых людей в возрасте 40–67 лет (2 груп-

па). Цитохимический метод появился в офтальмотрансплантологии из общей трансплантологии в виде энзиматического теста Ю. М. Зарецкой. Было установлено, что инверсия ферментного статуса лимфоцитов (депрессия активности СДГ и гиперактивация ГФДГ) с увеличением коэффициента соотношения ГФДГ/СДГ больше 0,6 является доклиническим признаком отторжения трансплантата [1]. Ранее нами был предложен способ определения показаний к сквозной кератопластике, основанный на использовании данного коэффициента и операцию считают показанной при отношении ГФДГ/СДГ от 0,45 до 0,6 [1]. В настоящем исследовании изучалась активность ГФДГ и СДГ и их соотношение в основных популяциях ЛФ. В 1 группе соотношение ГФДГ/СДГ ферментов в популяциях составило: в Т-ЛФ – 0,82 [0,78;0,94], в В-ЛФ – 1,26 [1,11;1,65], в НК-клетках – 1,25 [1,03;1,67]. В группе 2 соотношение ГФДГ/СДГ ферментов в популяциях достоверно отличалось от группы 1 и составило: Т-ЛФ – 0,54 [0,36;0,74]; ( $p=0,0017$ ), В-ЛФ – 0,76 [0,45;1,02]; ( $p=0,0003$ ), НК-клетки – 0,59 [0,46;0,85]; ( $p=0,0001$ ). Соотношение ферментов ГФДГ/СДГ в 1 группе в популяциях Т-ЛФ и В-ЛФ увеличено за счет повышения активности фермента ГФДГ, что косвенно отражает увеличение интенсивности гликолиза. В то же время увеличение соотношения активности ферментов в НК-клетках происходило за счет снижения активности СДГ, что свидетельствует о снижении процессов окислительного фосфорилирования в этих клетках. Таким образом, у пациентов с неблагоприятным исходом выявлено увеличение отношения активности ГФДГ/СДГ во всех основных популяциях ЛФ, наиболее выраженное в В-ЛФ и НК-клетках. Отношение активности ГФДГ/СДГ может служить прогностическим показателем отторжения трансплантата при рекератопластике.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Комах Ю. А., Борзенко С. А., Петричук С. В., Самохина И. В. Реакция отторжения трансплантата роговицы: клинико-anamnestические и иммунологические критерии диагностики. Российский иммунологический журнал 2017, 4; 11 (20), 714–716. [Komakh Y. F., Borzenok S. A., Petrichuk S. V., Samokhina I. V. Corneal graft rejection: clinical-anamnetic and immunological criteria for diagnosis. Russian journal of immunology 2017, 4; 11 (20), 714–716.
2. Angajala A., Lim S., Phillips J. B., Kim J.-H., Yates Cl., You Z., Tan M. Diverse roles of mitochondria in im-

- immune responses: novel insights into immune-metabolism. *Frontiers in immunology*, 2018,9; 1805, 1–19.
3. *Ron-Harel N., Sharpe A. H., Haigis M. C.* Mitochondrial Metabolism in T Cell Activation and Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015; 61,131–138.
  4. Патент 2302635 РФ, МПК G01 № 33/53, G01 № 33/50 Способ измерения митохондриальной активности лимфоцитов / С.В. Петричук, Т.Д. Измайлова, Т.В. Радыгина; заявитель и патентоо-

бладатель Государственное учреждение Научный центр здоровья детей РАМН.— № 2005141145/15; заявл. 28.12.2005; опубл. 10.07.2007. [Patent 2302635 RF, MPK G01 № 33/53, G01 № 33/50 Method of measurement of mitochondrial activity of lymphocytes / S. V. Petrichuk, T. D. Izmailova, T. V. Radygina; applicant and patentee State institution Scientific center for children's health RAMS.— № 2005141145/15; declared. 28.12.2005; publ. 10.07.2007.]

## METABOLISM OF THE LYMPHOCYTE POPULATIONS IN THE OUTCOME OF REPEAT CORNEAL TRANSPLANTATION

© 2019 Y. A. Komakh<sup>1\*</sup>, S. A. Borzenok<sup>1</sup>, T. V. Radygina<sup>2</sup>,  
S. V. Petrichuk<sup>2</sup>, D. G. Gerasimova<sup>2</sup>

\*E-mail: komakh@yandex.ru

<sup>1</sup>The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FSAI «Scientific Center of Children's Health» Moscow, Russia

Received: 14.07.2019. Accepted: 22.08.2019

In the study estimation of the informative definition of the activity ratio of mitochondrial dehydrogenases glycerol-3-phosphate (GPDG) and succinate (SDG) in the major populations of lymphocytes to predict graft rejection at the 15 recipients of the group's risk before rekeratoplasty. An increase in the ratio of GPDG/SDG activity in all major lymphocyte populations, most pronounced in B-lymphocytes and NK- cells, was found in patients with adverse outcome. The ratio of activity GPDG/SDG can serve as a prognostic indicator of graft rejection in keratoplasty.

*Key words:* corneal transplantation, lymphocyte metabolism, immunophenotyping

### Authors:

**Komakh Y. A.**, ✉ Ph.D., Head of the Transplantology and Cellular Biology Laboratory, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Autonomous Institution, Moscow, Russia. E-mail: komakh@yandex.ru;

**Borzenok S. A.**, M.D., Ph.d., Prof., Head of the Center of Fundamental and Applied Medical and Biological Problems, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Autonomous Institution, Moscow, Russia;

**Radygina T. V.**, Ph.D. (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology. National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia;

**Petrichuk S. V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology. National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia;

**Gerasimova D. S.**, intern of the Laboratory of Experimental Immunology and Virology. National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ НЕЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ПЕРВОЙ ЛИНИИ ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ

© 2019 г. А. С. Кузнецов\*, А. С. Хохлова, М. С. Урбанова, Е. В. Маркелова, Н. П. Емельянова, А. А. Петров

\*E-mail: agent\_zebrovich@mail.ru

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский Государственный Медицинский Университет»  
Минздрава РФ, Владивосток, Россия

Поступила: 25.07.2019. Принята: 30.08.2019

Первичная открытоугольная глаукома занимает первое место по инвалидности среди глазных заболеваний. Препараты первой линии — аналоги простагландинов не всегда эффективны. Целью работы стал поиск предикторов неэффективности этой терапии. Были исследованы цитокины: ФНО- $\alpha$ , ФНО- $\beta$ , ИЛ4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-22, ИЛ-29, ИФН- $\gamma$ , ТФР- $\alpha$ , ТФР- $\beta$ 1, ТФР- $\beta$ 2 в слезной жидкости 124 глаз при первичной диагностике глаукомы. Установлено, что дополнительным предиктором некомпенсации внутриглазного давления при назначении препаратов является высокий уровень ИЛ-17 и ТФР- $\beta$ 2, предиктором снижения зрительных функций на терапии — высокий уровень ИЛ-6.

**Ключевые слова:** первичная открытоугольная глаукома, цитокины, терапия глаукомы

DOI: 10.31857/S102872210007067-8

Адрес: 690000, Владивосток, пр. Острякова 4, Кафедра нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава РФ, Кузнецов Александр Сергеевич.  
Тел.: 8 904 628 93 07 (моб.). E-mail: agent\_zebrovich@mail.ru

### Авторы:

**Кузнецов А. С.**, аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

**Хохлова А. С.**, аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

**Маркелова Е. В.**, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

**Урбанова М. С.**, ординатор кафедры офтальмологии и оториноларингологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

**Емельянова Н. П.**, студентка 6 курса ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

**Петров А. А.**, студент 6 курса ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава РФ, Владивосток, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

На протяжении последних лет в структуре инвалидности первое место в мире занимает первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) [4]. Препаратами первой линии в качестве монотерапии для снижения внутриглазного давления

(ВГД) во всем мире используются аналоги простагландинов (АПГ) в виде инстилляций [1]. Тем не менее, у ряда пациентов на фоне терапии продолжают снижаться функции (поля зрения) и/или повышаться давление, что приводит к необходимости назначения дополнительных средств, смены препаратов, хирургическому лечению [5]. Активно обсуждается роль гуморального иммунитета в развитии ПОУГ, данные часто противоречивы [2, 3].

Целью данной работы стал поиск иммунологических предикторов неэффективности АПГ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 65 человек с ПОУГ (124 глаза). Количество глаз с I стадией составило 48%, со II стадией 33%, с III стадией — 19%. Женщин 47%, мужчин 53%. Средний возраст 63,4+3,8 лет. Критерием исключения из обследования послужили наличие острых и хронических заболеваний в стадии обострения, ревматологических и аутоиммунных болезней, воспалительных заболеваний в глазу и иной сопутствующей офтальмологической патологии, кроме начальной катаракты. Контрольную группу составили



20 человек без офтальмологической патологии (40 глаз) соответствующего возраста, средний возраст 56,5±3,3 года.

Забор слезной жидкости проводился из внутреннего угла глаза. Оценивали уровень ФНО- $\alpha$ , ФНО- $\beta$ , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-22, ИЛ-29, ИФН- $\gamma$ , ТФР- $\alpha$ , ТФР- $\beta$ 1, ТФР- $\beta$ 2. Содержание показателей определяли методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с использованием специфических тест-систем «R&D Diagnostics Inc.» (США). Учет результатов проводили с помощью иммуноферментного анализатора «Multiscan» (Финляндия). Обработка всех цифровых данных проводилась методом непараметрической статистики с использованием программы Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено, что, при сравнении группы контроля и группы пациентов с ПОУГ, достоверно изменены при ПОУГ следующие цитокины ( $p < 0,05$ ) – ФНО- $\alpha$ , ФНО- $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-17, ТФР- $\beta$ 1, ТФР- $\beta$ 2. В группе с ПОУГ в слезной жидкости уровень ФНО- $\alpha$  составил 45,4 (29,4;65,3) пг/мл, ФНО- $\beta$  – 12,3 (7,8;22,3) пг/мл. ИЛ-6 – 3,6 (2,1;7,4) пг/мл, ИЛ-17 – 93,3 (67,7; 112,2) пг/мл, ТФР- $\beta$ 2 – 224,5 (187,5;243,6) пг/мл. В группе контроля эти показатели были ниже. В группе со стабильным течением ПОУГ и эффективностью препаратов первой линии, по сравнению с контролем достоверно повышены только ИЛ-17 (в 4,5 раза) и ИЛ-6 (в 7,2 раза). В группе 2 повышены, по сравнению с контролем, ФНО- $\alpha$  (в 2,6 раз), ИЛ-6 (в 10,6 раз), ИЛ-17 (в 6,1 раз), ТФР- $\beta$ 2 (в 1,6 раз). В группе 3 повышены ИЛ-6 (в 7,5 раза), ИЛ-17 (в 9,3 раза), ТФР- $\beta$ 2 (в 2,5 раз). В группе 4, по сравнению с контролем, повышены ФНО- $\alpha$  (в 3,4 раза), ФНО- $\beta$  (в 6,5 раз), ИЛ-6 (в 9,1 раз), ИЛ-17 (в 10,2 раза), ТФР- $\beta$ 2 (в 2,5 раз).

При сравнении групп между собой интерес представила группа с повышением ВГД и снижением функций при получении терапии первой линии. В ней показатели местного иммунитета изменены максимально. Уровень ФНО- $\alpha$  составил 51,3 (34,3;76,9) пг/мл ( $p_{1-4,2-4} < 0,05$ ), ФНО- $\beta$  – 14,4 (6,5;24,5) пг/мл ( $p_{1-4,2-4,3-4} < 0,05$ ), ИЛ-6 – 4,1 (2,3;8,1) пг/мл ( $p_{1-4} < 0,05$ ), ИЛ-17 – 98,2 (76,5;145,4) пг/мл ( $p_{1-4,3-4} < 0,05$ ). При анализе дисбаланса цитокинов во всех группах сравнения, в группе 2 увеличена доля ИЛ-6, в группе 3 доля ИЛ-17 и ТФР- $\beta$ 2, в группе 3 – ФНО- $\alpha$ , ФНО- $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-17.

При помощи ROC-анализа выявлена сопряженность риска некомпенсации зрительных функций с уровнем ИЛ-6 выше 3,9 пг/мл (специфичность 89,1%, чувствительность 95,2%); сопряженность некомпенсации ВГД на фоне лечения с уровнем ИЛ-17 выше 89,5 пг/мл (специфичность 92,6%, чувствительность 97,2%) и уровнем ТФР- $\beta$ 2 выше 219,3 пг/мл (специфичность 87%, чувствительность 92,7%), критерием некомпенсации обоих показателей может служить уровень ФНО- $\alpha$  выше 39,4 пг/мл (специфичность 94,1%, чувствительность 95,5%).

Таким образом, показатели местного гуморального иммунитета играют роль в реагировании глаз с ПОУГ на назначаемую терапию. При ПОУГ изменены следующие показатели – ФНО- $\alpha$ , ФНО- $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-17, ТФР- $\beta$ 1, ТФР- $\beta$ 2. По-видимому, в группе пациентов, назначение препаратов в которой не компенсирует ВГД, изначально есть нарушения работы системы трансформирующих факторов роста и формирования межклеточного матрикса, развивается нейтрофильное воспаление, показатель которого – высокий уровень ИЛ-17 [2]. В группе с некомпенсацией функций, видимо, дополнительно развивается аутоиммунное повреждение зрительного нерва, повышается уровень ИЛ-6. Это подтверждает исследования, в которых показана роль ИЛ-6, совместно с ФНО- $\alpha$  в развитии оптической нейропатии при глаукоме [3, 4]. Полученные данные позволяют, в будущем, обосновать таргетную терапию ПОУГ, индивидуально рекомендовать раннюю активную тактику, комбинированную терапию или раннюю хирургию.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Астахов Ю. С., Нечипоренко П. А. Аналоги простагландинов: прошлое, настоящее, будущее. Офтальмологические ведомости, 2017, 10, 1, 40–52. [Astahov Y. S., Nechiporenko P. A. The past, present and future of prostaglandin analogs, Ophthalmology J., 2017, 10, 1, 40–52.]
2. Симбирцев А. С. Роль цитокинов в развитии опухолей и в иммунотерапии рака. В кн.: Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. Фолиант, СПб 2018, 187–188. [Simbirsev A. S. The role of cytokines in the development of tumors and in cancer immunotherapy. In: Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. Folio, St. Petersburg 2018, 187–188].
3. Duvesh R., Puthuran G., Srinivasan K. Multiplex Cytokine Analysis of Aqueous Humor from the Patients with Chronic Primary Angle Closure Glaucoma. Current Eye Research. 2017, 42, 1608–1613.
4. Gupta D., Wen J., Huebner J. Cytokine biomarkers in tear film for primary open-angle glaucoma. Clinical Ophthalmology, 2017, 11, 411–416.

5. Li T. Comparative Effectiveness of First-Line Medications for Primary Open-Angle Glaucoma: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Ophthalmology*, 2016, 123(1), 129–140.

## THE IMMUNOLOGICAL PREDICTORS OF THE INEFFICIENCY FIRST LINE THERAPY AT THE PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

© 2019 A. S. Kuznetsov\*, A. S. Khokhlova, E. V. Markelova, M. S. Urbanova, N. P. Emeiyanova, A. A. Petrov

\*E-mail: agent\_zebrovich@mail.ru

Federal State Educational Institution of Higher Education “Vladivostok State Medical University” of the Russian Federation Ministry of Health, Vladivostok, Russia

Received: 25.07.2019. Accepted: 30.08.2019

The primary open-angle glaucoma is a first in disability among eye diseases. First-line drugs – prostaglandin analogues are not always effective. The aim of the work was the search for predictors of the ineffectiveness of this therapy. The cytokines TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, IL-29, IFN- $\gamma$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 was investigated in the tear fluid of 124 eyes in the diagnosis of glaucoma. Predictors of non-compensation of intraocular pressure when prescribing prostaglandin drugs is a high level of IL-17 and a decrease in TGF- $\beta$ 2. The high level of IL-6 is a predictor of a decrease in visual function during prostaglandin therapy.

*Key words:* primary open-angle glaucoma, cytokines, glaucoma therapy

### Authors:

**Kuznetsov A. S.**, ✉ postgraduate student of Department of normal and pathological physiology, Federal State Educational Institution of Higher Education “Vladivostok State Medical University” of the Russian Federation Ministry of Health, Vladivostok, Russia.

**E-mail:** agent\_zebrovich@mail.ru;

**Khokhlova A. S.**, postgraduate student of Department of normal and pathological physiology, Federal State Educational Institution of Higher Education “Vladivostok State Medical University” of the Russian Federation Ministry of Health, Vladivostok, Russia;

**Markelova E. V.**, PhD, head of the Department of normal and pathological physiology, Federal State Educational Institution of Higher Education “Vladivostok State Medical University” of the Russian Federation Ministry of Health, Vladivostok, Russia;

**Urbanova M. S.**, resident of Department of ophthalmology and otorhinolaryngology, Federal State Educational Institution of Higher Education “Vladivostok State Medical University” of the Russian Federation Ministry of Health, Vladivostok, Russia;

**Emeiyanova N. P.**, student of Federal State Educational Institution of Higher Education “Vladivostok State Medical University” of the Russian Federation Ministry of Health, Vladivostok, Russia;

**Petrov A. A.**, student of Federal State Educational Institution of Higher Education “Vladivostok State Medical University” of the Russian Federation Ministry of Health, Vladivostok, Russia.

## КОЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ИММУННЫХ ТОЧЕК PD-1, PD-L1, TIM3 И LAG3 В ПОПУЛЯЦИЯХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ И ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

© 2019 г. О. В. Курмышкина<sup>1</sup>, А. А. Богданова<sup>1,2</sup>, П. И. Ковчур<sup>1</sup>, Т. О. Волкова<sup>1\*</sup>

\*E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт биологии КарНЦ» РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия.

Поступила: 26.06.2019. Принята: 02.08.2019

В статье рассмотрены результаты иммунофенотипирования Т-лимфоцитов по маркерам контрольных точек иммунного ответа, представляющих перспективные мишени противоопухолевой иммунотерапии, у пациенток с ранними стадиями вирус-ассоциированного рака шейки матки. Обсуждаются различия в профиле экспрессии данных маркеров субпопуляциями лимфоцитов в составе опухоли и в периферической крови.

**Ключевые слова:** противоопухолевый иммунитет, контрольные точки иммунного ответа, вирус-ассоциированный рак, цервикальные неоплазии, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, регуляторные Т-клетки

DOI: 10.31857/S102872210007068-9

**Адрес:** 185910 Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33, ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Волкова Татьяна Олеговна. Тел./факс: +7(8142) 795322.

**E-mail:** VolkovaTO@yandex.ru

**Авторы:**

**Курмышкина О. В.**, к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики врожденного иммунитета Института высоких биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» Минобрнауки РФ, Петрозаводск, Россия;

**Богданова А. А.**, аспирант лаборатории экологической биохимии ФГБУН «Институт биологии КарНЦ» РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия; Госзадание № 6.5111.2017/8.9;

**Ковчур П. И.**, д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии, ЛОР-болезней, офтальмологии, стоматологии, онкологии, урологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» Минобрнауки РФ, Петрозаводск, Россия;

**Волкова Т. О.**, д.б.н., профессор кафедры биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института, директор Института высоких биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» Минобрнауки РФ, Петрозаводск, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Достижение положительного эффекта от применения методов иммунотерапии рака предполагает многоточечное воздействие на функционально различные механизмы иммунного

ответа, в том числе ингибиторные механизмы, реализуемые через «контрольные точки» иммунитета (ИКТ). Если рассматривать Т-клеточное звено, роль маркеров ИКТ, например, PD-1 (CD279) /PD-L1 (CD274), в определении функционального состояния Т-лимфоцитов обусловлена не только уровнем их экспрессии, но и совокупностью других факторов, в частности: профилем их совместной экспрессии с другими ИКТ или, наоборот, маркерами Т-клеточной активации, принадлежностью к той или иной субпопуляции Т-клеток, локализацией Т-клеток (первичная опухоль, лимфоузлы, периферическая кровь), стадией онкологического заболевания и его этиологией. В случае вирус-ассоциированных опухолей, включая обусловленные папилломавирусной (ВПЧ) инфекцией, вирусная этиология может определять особенности процессов иммунного ответа с участием ИКТ [1], при этом рак шейки матки (РШМ) является наименее исследованным в отношении ИКТ видом ВПЧ-зависимого рака [2].

Несмотря на то, что представленные в литературе немногочисленные исследования ИКТ при РШМ охватывают в основном формы метастатического, резистентного, рецидивирующе-

го рака [2, 3], большой интерес для понимания механизмов противоопухолевого действия ингибиторов ИКТ и поиска биомаркеров – предикторов клинического ответа представляют те изменения, которые сопровождают ранние этапы прогрессии опухоли.

**Целью** данной работы являлся сравнительный анализ паттерна коэкспрессии PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274/B7-H1), TIM3 (CD366) и LAG3 (CD223) в основных популяциях Т-лимфоцитов, выделенных из образцов опухолевой ткани и периферической крови пациенток с ранними формами ВПЧ(+) РШМ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы цервикального эпителия и периферической крови были получены в ходе операции от пациенток с диагнозом плоскоклеточный РШМ0-I стадии (n=20) и подтвержденным ВПЧ(+) статусом, проходивших лечение в ГБУЗ Республиканский онкологический диспансер. Забор крови был также выполнен у 20 здоровых ВПЧ(-) женщин, не имеющих патологий шейки матки (группа контроля). Анализ экспрессии ИКТ проводился методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (BioLegend, Miltenyi Biotec, Dako) и комбинации флуорофоров: FITC (CD4 или CD8), PE-Vio770/PE-Cy7 (CD25), APC-Vio770/APC-Cy7 (CD127), PE (PD-1), PerCP-Cy5.5 (PD-L1), APC (TIM3 или LAG3). Границы позитивных/негативных популяций устанавливались с помощью серии Fluorescent Minus One контролей. Для иммунофенотипирования опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) образцы ткани подвергались мягкой ферментативной диссоциации (в присутствии 0.2% коллагеназы) с получением суспензии одиночных клеток. Статистическая достоверность оценивалась согласно критерию Уилкоксона-Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

При анализе результатов цитометрии лимфоцитов периферической крови (ЛПК) и ОИЛ были выделены: 1) общая популяция CD4 и CD8 Т-клеток; 2) субпопуляции CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клеток; 3) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+/high</sup>CD127<sup>-/low</sup> (регуляторные Т-клетки/Трег), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-/low</sup>CD127<sup>+</sup> (рассматриваемые как конвенциональные не-Трег лимфоциты) и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>. В пределах данных популяций оценивалась доля клеток, экспрессирующих ИКТ-маркеры PD-1, PD-L1, TIM3 и LAG3 (каж-

дый маркер в отдельности и совместно два или три маркера).

При сравнении уровня экспрессии (в % окрашенных клеток) PD-1 и PD-L1 в общих популяциях CD4 и CD8 ЛПК наиболее значимое увеличение в группе больных (относительно контроля) наблюдалось для CD8 Т-клеток; увеличение % TIM3 и % LAG3 Т-клеток выявлено как в CD4, так и в CD8 звене, но в случае CD8 популяции оно было более выраженным. Кроме того, при РШМ отмечалось увеличение доли циркулирующих CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, позитивных одновременно по двум и трем ИКТ. Сопоставление с экспрессией CD25 выявило существенное увеличение доли CD25<sup>+</sup>PDL1<sup>+</sup> как среди CD4, так и CD8 ЛПК, а также доли CD25<sup>+</sup>TIM3/LAG3<sup>+</sup> среди CD4 Т-клеток. Более того, в популяции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов от пациенток с РШМ была повышена доля клеток, ко-экспрессирующих 2 и 3 ИКТ (PD1<sup>+</sup>PDL1<sup>+</sup>TIM3<sup>+</sup> и PD1<sup>+</sup>PDL1<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup>), в то время как для CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клеток различия в экспрессии ИКТ между группами здоровых и больных были менее выражены или отсутствовали. Схожие наблюдения получены в отношении CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> популяции ЛПК, в которой наиболее заметно увеличивалась доля PDL1<sup>+</sup>TIM3<sup>+</sup> и PDL1<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> клеток в группе РШМ, при отсутствии достоверных различий в паттерне коэкспрессии ИКТ между группами больных и здоровых для CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> популяции, что подтверждает специфичность наблюдаемых изменений. В целом, различия между группами контроля и РШМ-пациенток в уровне экспрессии ИКТ-маркеров на CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитах более выражены, чем в общей CD4/CD8 популяции, при этом доля CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток была выше в группе больных. В совокупности полученные результаты позволяют предположить, что популяции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (включающие активированные Т-эффекторы и Трег), которые ко-экспрессируют 2 или 3 ИКТ-маркера, вовлечены в ранние этапы прогрессии вирус-ассоциированного РШМ. Анализ минорных популяций ЛПК CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup> и CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> выявил увеличение частоты PD1<sup>+</sup>, PD1<sup>+</sup>PDL1<sup>+</sup> клеток (для CD4) и PDL1<sup>+</sup>, LAG3<sup>+</sup> (для CD8) в группе РШМ.

При рассмотрении популяций CD4 и CD8 Т-клеток в образцах пре- и микроинвазивного РШМ обнаружены существенные различия между ОИЛ и ЛПК в профиле экспрессии ИКТ. В целом, для ОИЛ характерен более высокий процент клеток, экспрессирующих ИКТ (в особенности

ТІМ3 и PD-1); кроме того, по сравнению с ЛПК, большая доля CD4 и CD8 ОИЛ одновременно имеет два или три ИКТ-маркера, что повышает вероятность их нахождения в состоянии иммунного «истощения». С другой стороны, появление ИКТ на ОИЛ может быть следствием их активации и, действительно, по сравнению с ЛПК, подавляющая доля ОИЛ была положительной по CD25. Различия между ЛПК и ОИЛ были наиболее заметными для CD8 Т-клеток, при этом в большей степени экспрессия PD-1 и ТІМ3 была ассоциирована с CD25<sup>+</sup> ОИЛ. Аналогичная тенденция наблюдалась для CD25<sup>+/high</sup>CD127<sup>-/low</sup> Т-клеток, представленность которых в ОИЛ существенно выше, по сравнению с циркулирующей, снаиболее выраженными различиями, выявленными для CD8<sup>+</sup> популяции. Значительная доля Трег в составе РШМ-инфильтрата были позитивны по 2 или 3 ИКТ (наиболее важным данное наблюдение является в отношении CD8 ОИЛ, вклад которых в локальный иммунный ответ при прогрессии РШМ может быть преобладающим [3]). В целом, результаты свидетельствуют о том, что на раннем этапе перехода от внутриэпителиального развития к инвазивному росту для РШМ характерно увеличение уровня совместной экспрессии ИКТ на ОИЛ с одновременно высоким уровнем

представленности клеток с Трег-фенотипом, что может существенно ограничивать противоопухолевый иммунный ответ и создавать условия для прогрессии местно-распространенных и метастазирующих форм.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 17-15-01024). Исследования проведены в соответствии с планом реализации Программы развития опорного университета ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» на период 2017–2021 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Wang HF, Wang SS, Tang YJ, Chen Y, Zheng M, Tang YL, Liang XH. The Double-Edged Sword-How Human Papillomaviruses Interact With Immunity in Head and Neck Cancer. *Front Immunol.* 2019, 10, 653.
2. Liu Y, Wu L, Tong R, Yang F, Yin L, Li M, You L, Xue J, Lu Y. PD-1/PD-L1 Inhibitors in Cervical Cancer. *Front Pharmacol.* 2019, 10, 65.
3. Heeren AM, Rotman J, Stam AGM, Pocorni N, Gas-sama AA, Samuels S, Bleeker MCG, Mom CH, Zijl-mans HJMAA, Kenter GG, Jordanova ES, de Gruijl TD. Efficacy of PD-1 blockade in cervical cancer is related to a CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell subset with operational effector functions despite high immune checkpoint levels. *J Immunother Cancer.* 2019, 7, 43.

### COEXPRESSION OF IMMUNE CHECKPOINT MARKERS PD-1, PD-L1, TIM-3, AND LAG-3 IN CIRCULATING AND TUMOR-INFILTRATING T CELL POPULATIONS IN CERVICAL CANCER PATIENTS

© 2019 O. V. Kurmyshkina<sup>1</sup>, A. A. Bogdanova<sup>1,2</sup>, P. I. Kovchur<sup>1</sup>, T. O. Volkova<sup>1\*</sup>

\*E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

<sup>1</sup>Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the RAS, Petrozavodsk, Russia

Received: 26.06.2019. Accepted: 02.08.2019

The article presents the results of immunophenotyping performed on T cells from early-stage cervical cancer patients using immune checkpoint markers considered as promising and valid targets for antitumor immunotherapy. The differences in the expression pattern of these markers between lymphocyte subpopulations isolated from the tumor site or peripheral blood are discussed.

*Key words:* antitumor immunity, immune checkpoints, virus-associated cancer, cervical neoplasia, tumor-infiltrating lymphocytes, regulatory T cells

#### Authors:

**Kurmyshkina O. V.**, PhD, senior researcher, Laboratory of Molecular Genetics of Innate Immunity, Institute of High-Tech Biomedicine, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia;

**Bogdanova A. A.**, PhD student, Laboratory for Environmental Biochemistry, Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia; government contract № 6.5111.2017/8.9;

**Kovchur P. I.**, MD-PhD, professor of the Department of hospital surgery, ENT diseases, ophthalmology, dentistry, oncology, urology, Institute of Medicine, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia;

**Volkova T. O.**, ☒ PhD, professor of the Department of biomedical chemistry, immunology and laboratory diagnostics, Institute of Medicine; director of the Institute of High-Tech Biomedicine; Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia. **E-mail:** VolkovaTO@yandex.ru

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ CD64 НА НЕЙТРОФИЛАХ У ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКИМ СЕПСИСОМ

© 2019 г. В. А. Лазанович\*, А. В. Костюшко, В. Б. Шуматов

\*E-mail: immuno2003@mail.ru

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, Россия

Поступила: 12.07.2019. Принята: 18.08.2019

Проводилось исследование уровня экспрессии CD64 на нейтрофилах методом проточной цитометрии у 49 пациентов с сепсисом и анализ зависимости данных показателей от степени тяжести состояния по шкале APACHE II (в баллах), выраженности полиорганной дисфункции по шкале SOFA (в баллах). Высокий уровень экспрессии nCD64 на нейтрофилах прямо коррелировал с более тяжелой степенью органной дисфункции (SOFA), тяжестью состояния (APACHE II). Данные результаты позволяют предположить, что CD64 на нейтрофилах может служить биомаркером, отражающим степень системного воспаления при сепсисе, быть критерием в прогнозе тяжести течения и исхода заболевания у пациентов с сепсисом.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, CD64, сепсис

**DOI:** 10.31857/S102872210007069-0

**Адрес:** 690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, д. 2, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра нормальной и патологической физиологии, Лазанович Владимир Анатольевич.

Тел. +79147034509 (моб.); E-mail: immuno2003@mail.ru

**Авторы:**

**Лазанович В. А.**, к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Владивосток, Россия;

**Костюшко А. В.**, к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Владивосток, Россия;

**Шуматов В. Б.**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Владивосток, Россия.

Хирургический сепсис представляет собой серьезную проблему здравоохранения во всем мире. Он является основной причиной смерти в отделениях интенсивной терапии, цифры летальности при котором могут достигать 70–80% [4]. На сегодняшний день сепсис определен как жизнеугрожающая органная дисфункция, вызванная дисрегуляторным ответом организма на инфекцию [3]. Многочисленные клинические и экспериментальные данные показывают, что у пациентов с сепсисом в патогенезе заболевания большую роль играют нарушения

иммунной системы. Ее дисфункция обусловлена изменениями со стороны врожденного иммунитета, особенно на начальных этапах септического процесса, которые во многом определяют последующие адаптивные реакции.

Поиск новых биомаркеров воспаления, отличающихся высокой специфичностью и чувствительностью, как предикторов септических осложнений, является одним из основных вопросов у этой категории пациентов. В ряде работ была показана полезность использования nCD64 не только для диагностики системной инфекции, но и в качестве индикатора степени тяжести и прогноза заболевания [2]. Следовательно, одним из биомаркеров может быть показатель экспрессии nCD64 на нейтрофилах.

CD64 представляет собой мембранный белок, гликопротеин, который является высокоаффинным рецептором (Fcγ RI), который экспрессирован преимущественно на макрофагах/моноцитах, на нейтрофилах в состоянии покоя практически не выявляется. Его экспрессия увеличивается при активации нейтрофилов в несколько раз в течение 4–6 часов и нормализуется через 48 часов после отсутствия бактериального стимула. Это делает его крайне привлекательным диагностическим показателем системного инфекционного процесса.

**Цель работы.** Оценить уровень экспрессии nCD64 на нейтрофилах у пациентов с сепсисом, проанализировать зависимость его уровня от степени тяжести, выраженности полиорганной дисфункции и исходов заболевания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами проанализированы результаты проспективного исследования, проведенного на базе краевого Центра анестезиологии и реаниматологии ГБУЗ Приморской краевой клинической больницы № 1, г. Владивостока. В исследование были включены 49 пациентов, в первые 48 часов после установления диагноза сепсиса или септического шока. Степень тяжести оценивали, используя интегральную шкалу APACHEII, (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation), а полиорганной дисфункции/недостаточности – SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessments Score Sequential Organ Failure Assessment). Ретроспективно оценивали летальность в группах за первые 28 дней наблюдения. Цитофлюориметрический анализ популяции нейтрофилов, экспрессии активационных маркеров выполняли в течение 2 часов после забора венозной крови, на проточном цитометре FACS Calibur BD, по стандартному протоколу. Для анализа уровня экспрессии использовали моноклональные антитела к молекулам CD14-FITC, CD64-PE (производства BioLegend, Inc., США). Количественную оценку экспрессии исследуемого поверхностного рецептора проводили по средней интенсивности флуоресценции (MFI – mean fluorescence intensity). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы StatPlus 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке взаимосвязей экспрессии (MFI) nCD64 и степени тяжести состояния по шкале APACHEII в баллах было выявлено, что чем выше уровень экспрессии данного рецептора на нейтрофилах, тем более тяжелое течение септического процесса. Уровень экспрессии (MFI) nCD64 также коррелировал с выраженностью полиорганной дисфункции по шкале SOFA (в баллах). В ходе исследования также выявлены различия экспрессии (MFI) nCD64 на нейтрофилах в зависимости от исхода септического процесса. Так, уровень данного маркера был существенно выше у пациентов с неблагоприятным исходом  $59,6 \pm 23,7$  (MFI) по сравнению с группой выживших  $45,4 \pm 12,5$  (MFI) ( $p < 0,05$ ).

Инфекционные осложнения являются серьезной проблемой в хирургических отделениях. Их диагностика на ранних этапах системного воспаления позволяет своевременно прогнозировать и принимать правильные терапевтические решения у каждого конкретного пациента с сепсисом и органной дисфункцией, что может положительно влиять на исход заболевания, уменьшить финансовые затраты на лечение данной категории больных [1]. В этой связи методы проточной цитометрии, как эффективный диагностический инструмент в интенсивной терапии, позволяют в режиме реального времени оценивать важные иммунологические показатели [5].

В настоящем исследовании была выявлена корреляционная взаимосвязь экспрессии nCD64 со степенью тяжести состояния по шкале APACHEII (в баллах) и выраженностью полиорганной дисфункции по шкале SOFA (в баллах). Отмечено, что чем выше уровень экспрессии (MFI) данного рецептора на нейтрофилах, тем более тяжелое течение септического процесса и выраженность полиорганной дисфункции по шкале SOFA (в баллах).

## ВЫВОДЫ

Определение уровня экспрессии на нейтрофилах (MFI) nCD64 является чувствительным и специфичным маркером системной инфекции у хирургических пациентов. Данный показатель может быть использован не только для диагностики системной инфекции, но и в качестве индикатора степени тяжести течения септического процесса и прогноза исхода заболевания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hsu K. H., Chan M. C., Wang J. M. et al. Comparison of Fcγ receptor expression on neutrophils with procalcitonin for the diagnosis of sepsis in critically ill patients. *Respirology*. 2011; 16(1), 152–60.
2. Icardi M., Erickson Y., Kilborn S. et al. CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients. *J. Clin. Microbiol.* 2009; (47): 3914–3919.
3. Singer M., Deutschman S., Seymour C. W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8), 801–810.
4. Stevenson E. K., Rubenstein A. R., Radin G. T., Wiener R. S., Walkey A. J. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis. *Crit Care Med*. 2014;42, 625–631.
5. Venet F., Lepape A. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU – from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Crit. Care*. 2011; 15(5), 231.

## DETERMINATION OF THE LEVEL OF CD64 ON NEUTROFILES IN PATIENTS WITH SURGICAL SEPSIS

© 2019 V. A. Lazanovich\*, A. V. Kostyushko, V. B. Shumatov

\*E-mail: immuno2003@mail.ru

Federal State Budget Educational Institute of higher professional education Pacific State  
Medical University of Ministry of health Russian Federation, Vladivostok, Russia

Received: 12.07.2019. Accepted: 18.08.2019

The level of the expression of CD64 on neutrophils by flow cytometry in 49 patients with sepsis was studied, the dependence of these parameters on the degree of severity of the condition on the scale APACHEII (in points), the severity of multiple organ dysfunction scale SOFA (in points). High-level of expression on neutrophils nCD64 directly correlated with more severe organ dysfunction (SOFA), the weight of the state (APACHEII). These results may give the suggestion that presence of CD64 on neutrophils may serve as a biomarker reflecting on the degree of systemic inflammation in sepsis and may be a criterion in the prediction of the severity of disease and outcome in patients with sepsis.

*Key words:* neutrophils, CD64, sepsis, prediction

### Authors:

**Lazanovich V. A.**, ✉ Ph.D., assistant professor, Department of normal and Pathological Physiology, Federal State Budget Educational Institute of higher professional education Pacific State Medical University of Ministry of health Russian Federation, Vladivostok, Russia. E-mail: immuno2003@mail.ru;

**Kostyushko A. V.**, Ph.D., assistant professor, Department of normal and Pathological Physiology, Federal State Budget Educational Institute of higher professional education Pacific State Medical University of Ministry of health Russian Federation, Vladivostok, Russia;

**Shumatov V. B.**, Doctor of Sciences, Professor of the Department of intensive care, anesthesiology, intensive care and emergency medical services, Federal State Budget Educational Institute of higher professional education Pacific State Medical University of Ministry of health Russian Federation, Vladivostok, Russia;



## РЕАКЦИЯ АКТИВИРОВАННЫХ МОНОНУКЛЕАНЫХ КЛЕТОК НА СОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ С ТИТАНОВЫМИ МАТРИКСАМИ, НЕСУЩИМИ КАЛЬЦИЙФОСФАТНОЕ ПОКРЫТИЕ

© 2019 г. Л. С. Литвинова<sup>1</sup>, К. А. Юрова<sup>1</sup>, В. В. Шуплецова<sup>1</sup>,  
О. Г. Хазиахматова<sup>1</sup>, Е. С. Мелашенко<sup>1\*</sup>, В. В. Мелашенко<sup>1</sup>, Е. О. Шунькин<sup>1</sup>,  
Ю. П. Шаркеев<sup>3</sup>, Е. Г. Комарова<sup>3</sup>, М. Б. Седельникова<sup>3</sup>, И. К. Норкин<sup>1</sup>,  
К. И. Прокин<sup>1</sup>, П. А. Иванов<sup>1</sup>, И. А. Хлусов<sup>2,3</sup>

\*E-mail: lena.melashchenko17@mail.ru

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,  
Калининград, Россия;

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

<sup>3</sup>Томский политехнический университет, Томск, Россия

Поступила: 27.07.2019. Принята: 30.08.2019

Проведена оценка реакций мононуклеарных клеток крови (МНК) при сокультивировании с титановыми подложками, несущими двустороннее кальцийфосфатное покрытие (КФ), в условиях дополнительной активации Т-клеточного рецептора. Установлено, что в активационной 3D модели при контакте с КФ-покрытием, усиливается секреция про- и противовоспалительных цитокинов (IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4), на фоне снижения жизнеспособности культуры МНК и изменения их иммунофенотипа, в сторону увеличения числа клеток, экспрессирующих CD95<sup>+</sup> и CD45R0<sup>+</sup>, (число CD25<sup>+</sup> клеток не изменялось), что может свидетельствовать о гиперактивации МНК в 3D модели при ее стимуляции активатором Т-клеток.

**Ключевые слова:** МНК, Т-лимфоциты, титановые имплантаты, про- и противовоспалительные цитокины, иммунофенотип

DOI: 10.31857/S102872210007070-2

**Адрес:** 236029 Калининград, ул. Гайдара, 6, «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, Мелашенко Елена Сергеевна. Тел.: 595–595 доб. 6634;

**E-mail:** lena.melashchenko17@mail.ru

### Авторы:

**Литвинова Л. С.**, д.м.н., заведующая базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Юрова К. А.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Шуплецова В. В.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Хазиахматова О. Г.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Мелашенко Е. С.**, биолог центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Мелашенко В. В.**, инженер-исследователь центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Шунькин Е. О.**, инженер-исследователь базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Шаркеев Ю. П.**, д.ф.-м.н., профессор, зав. лаб. физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

**Комарова Е. Г.**, к.т.н., младший научный сотрудник лаборатории физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

**Седельникова М. Б.**, д.т.н. старший научный сотрудник лаборатории физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

**Норкин И. К.**, аспирант БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Прокин К. И.**, студент БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Иванов П. А.**, научный сотрудник базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Хлусов И. А.**, д.м.н. профессор кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, профессор Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий Национального НИ ТПУ, Томск, Россия.

Воспалительная реакция, сопровождающая травматическое повреждение кости, является многофакторным процессом, влияющим на

костную регенерацию и приживление имплантатов, где важную роль играют мононуклеарные лейкоциты крови (МНК) [1].

**Целью** работы явилось изучение реакций МНК на трехмерный матрикс, имитирующий регенерирующую костную ткань, в условиях сокультивирования *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение МНК производилось из лейкоцитарной суспензии здоровых доноров центрифугированием на градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>). Состояние трехмерной (3D) культуры клеток имитировали при помощи добавления в клеточную культуру подложек (10x10x1 мм<sup>3</sup>) из коммерчески чистого титана, несущих рельефное (индекс шероховатости  $Ra = 2-5$  мкм) микродуговое двустороннее кальцийфосфатное (КФ) покрытие, симулирующее состояние минерального матрикса регенерирующей костной ткани. В эксперименте использовались две модели культивирования: 2D-клетки на плоской поверхности культурального планшета (контроль); 3D-сокультивирование с кальцийфосфатным матриксом.

Культивирование МНК проводили в 24-х луночных планшетах («OrangeScientific», Бельгия) в полной питательной среде (ППС): RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», США), 10% инактивированной (56°C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров («Sigma-Aldrich», США), 200 мМ/л L-глутамин («Sigma-Aldrich», США), 30 мкг/мл гентамицин («GibcoLifeTechnologies», США),  $1 \times 10^6$  активатора Т-лимфоцитов — использовали реагент T-CellActivation/ExpansionKithuman (Ac/Exp) («MiltenyiBiotec», Германия), который представляет собой антибиотинные MACSiBead™ частицы с биотинилированными антителами против человеческих CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>. После инкубации с антителами к CD95, CD25, CD40/RA клетки анализировали на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу фирмы-производителя. Жизнеспособность клеток выявляли с использованием 0,4% раствора трипанового синего (Invitrogen, США) при помощи автоматического счётчика клеток Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, США). Супернатанты из клеточных культур со-

бирали после 48 часов и определяли количество про- и противовоспалительных цитокинов (IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных 2D-культурах при добавлении активирующего комплекса (CD2-/CD3-/CD28-) процент живых клеток составлял 80,65 [80,17; 82,25]%. В экспериментальных 3D моделях в присутствии активатора) была выявлена интенсификация процессов клеточного некроза и снижение жизнеспособности культуры МНК ( $p < 0,05$ ). Число клеток в апоптозе в активированных 3D культурах было сопоставимо с таковым в 2D культурах.

Было зафиксировано достоверное увеличение ( $p < 0,05$ ; 3D относительно 2D): процентного содержания клеток с рецептором индукции апоптоза CD95<sup>+</sup> (Fas/Apo-1) с 20,17 [17,50–22,99]% в 2D- до 25,80 [22,80–27,27]% в 3D-культурах; Т-клеток памяти CD45R0<sup>+</sup> с 32,89 [32,30–33,81]% в 2D- до 36,03 [34,20–36,79]% в 3D-культурах. Также регистрировалось снижение процента наивных Т-клеток CD45RA<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) однако число CD25<sup>+</sup> клеток не изменялось. Кроме того в 3D культурах относительно 2D, регистрировалось повышение ( $p < 0,05$ ) уровня провоспалительных (IL-2 и TNF- $\alpha$ ) и протиаинтивовоспалительных медиаторов (IL-10 и IL-4).

Таким образом, сокультивирование активированных МНК с имплантатами способствовало снижению относительного содержания живых клеток в культуре за счет интенсификации процесса ядерной формы гибели клеток; возрастанию числа клеток, презентующих маркеры клеток памяти (CD45R0) и апоптоза (CD95), при отсутствии влияния на экспрессию молекулы активации CD25 и увеличению уровня секреции МНК про- и противовоспалительных цитокинов. Вышесказанное может свидетельствовать о гиперактивации МНК в 3D модели с добавлением Т-активатора. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Baht G. S., Vi L., Alman B. A. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(2):138–145.

## REACTION OF ACTIVATED MONONUCLEATED CELLS TO CO-CULTIVATION WITH CALCIUM PHOSPHATE COATING OF TITANIUM MATRIX

© 2019 L. S. Litvinova<sup>1</sup>, K. A. Yurova<sup>1</sup>, V. V. Shupletsova<sup>1</sup>,  
O. G. Khaziakhmatova<sup>1</sup>, E. S. Melashchenko<sup>1\*</sup>, V. V. Malashchenko<sup>1</sup>, E. O. Shunkin<sup>1</sup>,  
Yu. P. Sharkeev<sup>3</sup>, E. G. Komarova<sup>3</sup>, M. B. Sedelnikova<sup>3</sup>, I. K. Norkin<sup>1</sup>,  
K. I. Prokin<sup>1</sup>, P. A. Ivanov<sup>1</sup>, I. A. Khlusov<sup>2,3</sup>

\*E-mail: lena.melashchenko17@mail.ru

<sup>1</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

<sup>3</sup>Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

Received: 27.07.2019. Accepted: 30.08.2019

The reactions of mononuclear blood cells (MNC) were evaluated under cocultivation with titanium substrates carrying a bilateral calcium phosphate coating (CP) under conditions of additional activation of the T-cell receptor. It has been established that in the activation 3D model, in contact with CP-coating, the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4) increases, against the background of a decrease in the viability of the MNC culture and changes in their immunophenotype, in the direction of increasing the number of cells expressing CD95<sup>+</sup> and CD45R0<sup>+</sup> (the number of CD25<sup>+</sup> cells has not changed), which may indicate that the MNC is hyperactive in the 3D model when it is stimulated by an activator of T cells.

*Key words:* MNC, T-lymphocytes, titanium implants, pro- and anti-inflammatory cytokines, immunophenotype

### Authors:

**Litvinova L. S.**, MD, Head of the Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies I. Kant, Kaliningrad, Russia;

**Yurova K. A.**, Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology I. Kant, Kaliningrad, Russia;

**Shupletsova V. V.**, Ph.D. Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology I. Kant, Kaliningrad, Russia;

**Haziakhmatova O. G.**, Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology I. Kant, Kaliningrad, Russia;

**Melashchenko E. S.**, ✉ Biologist of the Center for Medical Biotechnology BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia.

E-mail: lena.melashchenko17@mail.ru;

**Malashchenko V. V.**, Researcher, Center for Medical Biotechnologies BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia;

**Shunkin E. O.**, Engineer Researcher Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia;

**Sharkeyev Yu. P.**, Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Head. lab Physics of nanostructured biocomposites, Tomsk, Russia;

**Komarova E. G.**, Ph.D., Junior Researcher, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, IPPM SB RAS, Tomsk, Russia;

**Sedelnikova M. B.**, Doctor of Technical Sciences Senior Researcher, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, IPPM SB RAS, Tomsk, Russia;

**Norkin I. K.**, PhD student BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia;

**Prokin K. I.**, student BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia;

**Ivanov P. A.**, Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Khlusov I. A.**, Ph.D. Professor of the Department of Morphology and General Pathology of the SBEI HPE Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Professor of the Research School of Chemical and Biomedical Technologies of the National Research Institute of TPU, Tomsk, Russia.

## АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ЛИЗИСА ЛЕЙКОЦИТОВ НА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА У ЛИЦ, СТРАДАЮЩИХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

© 2019 г. Э. С. Майназарова<sup>1\*</sup>, В. С. Тойгомбаева<sup>2</sup>, А. Ж. Мырзакулова<sup>2</sup>, Н. С. Тюмонбаева<sup>3</sup>

\*E-mail: [elmira\\_main07@mail.ru](mailto:elmira_main07@mail.ru)

<sup>1</sup>ГОУВПО «Кыргызско Российский Славянский Университет», Бишкек, Кыргызстан;

<sup>2</sup>Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

<sup>3</sup>Кыргызский Государственный Университет им И. Арабаева, Бишкек, Кыргызстан

Поступила: 09.07.2019. Принята: 15.08.2019

Анализ результатов реакции специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ) на лекарственные средства у лиц, страдающих ишемической болезнью сердца в КР показал высокий процент результатов РСЛЛ в группе йодсодержащих рентгенконтрастных веществ.

**Ключевые слова:** лекарственная аллергия, реакция специфического лизиса лейкоцитов, ишемическая болезнь сердца

DOI: 10.31857/S102872210007071-3

**Адрес:** 720000 Бишкек, ул. Киевская 44, Кафедра эпидемиологии и иммунологии, ГОУВПО «Кыргызско Российский Славянский Университет», Майназарова Эльмира Сыдыковна. Тел.: +996312662567, факс: +996312431169, +996709730970 (моб). E-mail: [elmira\\_main07@mail.ru](mailto:elmira_main07@mail.ru)

**Авторы:**

**Майназарова Э. С.**, к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и иммунологии ГОУВПО КРСУ, Бишкек, Кыргызстан;

**Тойгомбаева В. С.**, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой общей и клинической эпидемиологии, Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Мырзакулова А. Ж.**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии КГМА им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Тюмонбаева Н. С.**, к.б.н., доцент, заведующая кафедрой естественно-математических дисциплин КГУ им И. Арабаева, Бишкек, Кыргызстан.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Проблема нежелательных реакций на лекарственные средства из года в год не теряет своей актуальности в клинической практике. Доступность лекарств, их бесконтрольный прием, в том числе с профилактической целью, полипрагмазия – все это способствует росту риска лекарственной аллергии [1]. Проблема лекарственной аллергии выдвинулась на одно

из первых мест в медицине благодаря росту числа лекарственных аллергических реакций, увеличению тяжести их проявлений. Присоединение лекарственной аллергии к основному заболеванию усложняет терапевтическую тактику, снижает эффективность медикаментозной терапии, а нередко создает непосредственную угрозу жизни больного [2, 3].

На сегодняшний день установлено, что тяжелое течение анафилактического шока отмечается у больных с ишемической болезнью сердца, принимающих β-адреноблокаторы и ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента [4]. Одним из наиболее эффективных методов, используемых для диагностики лекарственной аллергии остаются лабораторные методы *in vitro* [1]. Кроме того, с позиций сегодняшнего дня достоверность старых иммунологических методик (РДТК, РПГА и др) в аллергологии подвергается большому сомнению, поскольку множество внешних и внутренних факторов способны оказать влияние на конечный результат исследования и достоверность составляет 40–60% [5]. Однако доступность и дешевизна не позволяют нам полностью отказаться от их использования.

**Цель работы:** анализ результатов реакций специфического лизиса лейкоцитов на лекарственные средства у пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца, в Кыргызской Республике.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами был осуществлен иммунологический анализ результатов реакций специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ) на лекарственные средства (ЛС) у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) на территории Кыргызской Республики за период с сентября 2017 г. по май 2019 г. Всего было проанализировано результатов РСЛЛ на 329 препаратов по 7 параметрам у 89 пациентов с ишемической болезнью сердца. Возраст пациентов, у которых были проанализированы результаты РСЛЛ на ЛС, колебался от 32 до 85 лет. Реакцию специфического лизиса лейкоцитов проводили по методу Новикова Д. К. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ статобработки с определением  $M \pm m$  и показателя статистической достоверности (P).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из представленного массива данных было выбрано 271 сообщений о результатах РСЛЛ, касающихся лекарственных средств, влияющих на сердечно-сосудистую систему. Другую часть оценки результатов РСЛЛ составили йодсодержащие рентгеноконтрастные вещества в количестве 58 препаратов по 3 позициям, которые применялись для проведения коронарографии и ангиографии.

Результаты РСЛЛ на лекарственные средства у пациентов, страдающих ИБС были разделены на 7 групп. Среди проанализированных ЛС 1 группу (ингибиторы АПФ) составили 67 препаратов, 2 группу (блокаторы медленных кальциевых каналов) составили 56 препаратов. В 3 группу были включены 49 препаратов (нитраты), в 4 группу включили 42 препарата (анти тромбические лекарственные средства), 5 группу ( $\beta$ -адреноблокаторы) составили 33 препарата и 6 группу (блокаторы рецепторов АТII) составили 24 препарата. В 7 группу были включены 58 препаратов (йодсодержащие рентгеноконтрастные вещества).

Как показали наши исследования, отмечается достоверное повышение результатов РСЛЛ в 1 группе ( $19,4\% \pm 1,17$ ), во 2 группе ( $14,5\% \pm 0,52$ ), в 3 группе ( $13,5\% \pm 0,27$ ), в 4 и 5 группах соответ-

ственно ( $15,2\% \pm 0,4$ ) и ( $17,7\% \pm 0,33$ ), в 6 группе ( $12,2\% \pm 0,19$ ) по сравнению с нормальными значениями РСЛЛ (до 10,0%).

Следует отметить, что самый высокий процент результатов РСЛЛ встречался именно в 7 группе среди йодсодержащих рентгеноконтрастных веществ ( $21,0 \pm 0,97$ ) напротив 10,0% (референсные значения РСЛЛ). Как было сказано выше в группу йодсодержащих рентгеноконтрастных веществ были включены такие препараты как визипак, ультравист и омнипак. В ходе исследования выявили из трех препаратов 7 группы достоверно высокие показатели РСЛЛ ультрависта в количестве 21,7% ( $P < 0,005$ ) по сравнению с нормальными значениями РСЛЛ (до 10,0%) и незначительное повышение показателей РСЛЛ у препарата омнипак  $11,8\% \pm 0,12$  и почти в пределах референсных значений оказались результаты РСЛЛ рентгеноконтрастного вещества визипак  $10,2 \pm 0,11$ .

Изучение спектра ЛС больных, страдающих ИБС показало, что результаты РСЛЛ ингибиторов АПФ, блокаторов медленных кальциевых каналов,  $\beta$ -адреноблокаторов и нитратов среди сердечно-сосудистых препаратов были достоверно выше остальных групп которая подтверждается данными сообщений о нежелательных реакциях на ЛС у лиц, страдающих ИБС у которых наиболее часто регистрируются аллергические реакции на вышеперечисленные группы препаратов.

Анализ исследования показал, что высокий процент результатов РСЛЛ-анализа встречался в 7 группе ЛС, это можно объяснить реакцией неспецифической гиперчувствительности, которые возникают часто при применении рентгеноконтрастных веществ, опиатов и др. Ряд факторов могут предрасполагать к их развитию: полипрагмазия, наличие сопутствующих заболеваний ЖКТ, нероэндокринной системы и др.

Таким образом, определение лекарственной чувствительности к лекарственным средствам у лиц, страдающих ИБС является серьезной клинической проблемой, ее наличие у пациента создает сложности в лечении основного заболевания и требует дальнейшего углубленного исследования,

## ВЫВОДЫ

Изучение спектра ЛС больных, страдающих ИБС показало, что результаты РСЛЛ ингибиторов АПФ, блокаторов медленных кальциевых каналов,  $\beta$ -адреноблокаторов и нитратов среди

сердечно-сосудистых препаратов были достоверно выше чем в остальных группах.

Самый высокий процент результатов РСЛЛ встречался в 7 группе среди йодсодержащих рентгенконтрастных веществ ( $21,0 \pm 0,97$ ).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Новиков Д. К., Сергеев Ю. В., Новиков П. Д. Лекарственная аллергия. – М., 2001, 312. [Novikov D. K., Sergeev Yu. V., Novikov P. D. Drug Allergy. – М., 2001, 312].
2. Хаитов Р. М. ред. Клиническая аллергология: руководство для практических врачей. М.: «Мед-пресс-информ»; 2002, 624. [Khaitov R. M. ed. Clinical Allergology: A Guide for Practitioners. М.: “Medpress-inform”; 2002, 624].
3. Ландышев Ю. С., Доровских В. А. Лекарственная аллергия. М.: «Нордмедиздат», 2010, 6–13. [Landyshov Yu. S., Dorovskikh V. A. Medicinal allergy. М.: “Nordmedizdat”, 2010, 6–13].
4. Астафьева Н. Г., Горячкина Л. А. Аллергология. 2000; № 4, 35–42. [Astafieva N. G., Goryachkina L. A. Allergology. 2000; № 4, 35–42].
5. Артюшевский С. Н. Клинические проблемы лекарственной аллергии. Медицинские новости. 2016, № 11, 41–45. [Artyushevskiy S. N. The clinical problem of drug allergy. Medical news. 2016, № 11, 41–45].

### ANALYSIS OF THE RESULTS OF THE REACTION OF SPECIFIC LYSIS OF LEUCOCYTES TO DRUGS IN PATIENTS SUFFERING FROM CORONARY HEART DISEASE IN THE KYRGYZ REPUBLIC

© 2019 E. S. Mainazarova<sup>1\*</sup>, V. S. Toigombaeva<sup>2</sup>, A. J. Myrzakulova<sup>2</sup>, N. S. Tyumonbaeva<sup>3</sup>

\*E-mail: [elmira\\_main07@mail.ru](mailto:elmira_main07@mail.ru)

<sup>1</sup>PEIHVE “Kyrgyz Russian Slavic University”, Bishkek, Kyrgyzstan;

<sup>2</sup>Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyzstan;

<sup>3</sup>Kyrgyz State University named after I. Arabayeva, Bishkek, Kyrgyzstan

Received: 09.07.2019. Accepted: 15.08.2019

Analysis of the results of the reaction of specific leukocyte lysis (RSLL) to drugs in persons suffering from coronary heart disease in the Kyrgyz Republic showed a high percentage of the results of RSLL in the group of iodine-containing x-ray contrast agents.

*Key words:* drug allergy, reaction of specific leukocyte lysis, ischemic heart disease

#### Authors:

**Mainazarova E. S.**, ☒ PhD, Associate professor of the Department of Epidemiology and Immunology, Kyrgyz Russian Slavic University, Bishkek, Kyrgyz Republic. **E-mail:** [elmira\\_main07@mail.ru](mailto:elmira_main07@mail.ru);

**Toigombaeva V. S.**, Doctor of Medical Science, Professor, Head of the Department of General and Clinical Epidemiology, Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic;

**Myrzakulova A. J.**, PhD, Associate professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic;

**Tyumonbaeva N. S.**, PhD, Associate professor of the head of the Department of natural and mathematical disciplines of KSU, Bishkek, Kyrgyz Republic.

## УРОВЕНЬ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 8 И ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА 1 ТИПА ПРИ ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПОЧЕК ПОСЛЕ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ

© 2019 г. **Е. В. Маркелова\***, **О. И. Фомина**, **В. Г. Фисенко**,  
**В. Ю. Арсенина**

\*E-mail: [markev2010@mail.ru](mailto:markev2010@mail.ru)

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,  
Владивосток, Россия

Поступила: 22.07.2019. Принята: 29.08.2019

Несмотря на развитие хирургической техники, методов анестезиологического пособия, защиты органов в условиях искусственного кровообращения, нерешенной остается проблема ранних послеоперационных осложнений после аортокоронарного шунтирования (АКШ), одним из таких осложнений остается острое повреждение почек (ОПП), распространенность которого по данным разных авторов достигает 30%. Цель: оценить диагностическое и прогностическое значение в определении уровня матриксной металлопротеиназы 8 и их ингибитора 1 типа (ММР-8, TIMP 1) у пациентов с острым повреждением почек до и после АКШ. Материалом исследования служила сыворотка крови 70 пациентов обоего пола с ишемической болезнью сердца (ИБС) до и после АКШ, разделенных на 3 группы: с ОПП (I гр.), с ОПП и фоновым заболеванием СД 2 типа (II гр.), без осложнений в виде ОПП (III гр.). Зарегистрировано увеличение концентрации ММР-8 в сыворотке крови при развитии ОПП в I гр. ( $p < 0,05$ ), выявлен низкий уровень ММР-8 до операции во II группе с последующим его нарастанием в 2 раза ( $p < 0,05$ ), увеличение уровня TIMP 1 после оперативного вмешательства зафиксировано в всех группах ( $p < 0,05$ ).

**Ключевые слова:** матриксная металлопротеиназа 8 типа, тканевой ингибитор 1 типа, острое повреждение почек, аортокоронарное шунтирование

DOI: 10.31857/S102872210007072-4

**Адрес:** 690002, Российская Федерация, Дальневосточный федеральный округ, Приморский край, г. Владивосток, проспект Острякова, дом 2. Телефон: 8 (423) 245-07-00.

**E-mail:** [markev2010@mail.ru](mailto:markev2010@mail.ru)

**Авторы:**

**Маркелова Е. В.**, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

**Фомина О. И.**, аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

**Фисенко В. Г.**, аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

**Арсенина В. Ю.**, студент лечебного факультета ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия.

Острое повреждение почек остается одним из самых частых осложнений после аортокоронарного шунтирования. В большинстве случаев применения метода искусственного кровообра-

щения, индуцирует в организме пациента каскад защитно-приспособительных и патологических реакций, которые повышают риск развития реальных осложнений. По-прежнему маркерами повреждения почек принято считать протеинурию, креатинин сыворотки крови и изменение скорости клубочковой фильтрации [3]. А такие общеизвестные маркеры, как NGAL и KIM2, цистатин С, не доказали свою эффективность в ранней диагностике [2]. Поэтому в последние годы внимание уделяется поиску так называемых иммунологических маркеров острого почечного повреждения, позволяющих проводить раннее выявление патологических изменений в почках и определять их характер, дифференцировать поражение разных отделов нефрона, оценить выраженность воспаления и интенсивность фиброгенеза [4]. Привлекают внимание данные о корреляции изменения уровня фак-

торов, регулирующих состояние межклеточного матрикса, с дисфункцией почек и их прогностическая значимость у пациентов с острым повреждением почек, перенесших аортокоронарное шунтирование. Поиск возможных изменений в системе матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов позволит использовать их в качестве ранних маркеров ренальных осложнений.

**Цель работы** – оценить уровень ММР-8 и ТИМР 1 в сыворотке крови у пациентов с ишемической болезнью сердца после аортокоронарного шунтирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение уровня ММР-8 и ТИМР 1 проведено в сыворотке крови методом твердофазного ИФА с использованием диагностических наборов R & D Systems, USA у 70 пациентов с ИБС обоего пола от 45 до 74 лет до и после АКШ на базе медицинского центра Дальневосточного Федерального Университета г. Владивостока. Ретроспективно все пациенты были разделены на группы: с острым повреждением почек (I гр.), с острым повреждением почек и сопутствующей патологией в виде сахарного диабета 2 типа (СД 2 типа) (II гр.), без острого повреждения почек (III гр.) и группа контроля (практически здоровые добровольцы), сопоставимая по полу и возрасту. Биологический материал забирался за сутки до операции, на 1е, 2е и 7е сутки после операции, у людей контрольной группы – однократно. Статистическая обработка полученных данных проведена непараметрическими методами. Результаты представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей (Me, Q25, Q75). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%, т.е. нулевые гипотезы отвергались в том случае, когда достигнутый уровень значимости P используемого статистического критерия принимал значения менее 5%. Статистическая обработка проводилась с использованием программы SPSS Statistics v.16. Внутри и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна - Уитни в рамках прикладной программы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отмечены высокие значения ММР-8 в сыворотке крови у пациентов с ОПП до операции – 2,46 (1,38;7,91) нг/мл,  $p < 0,05$ , в сравнении с группой ОПП и СД 0,39 (0,30;3,23) нг/мл,  $p < 0,05$  и без ОПП – 1,07 (0,64;1,41) нг/мл,  $p < 0,05$ . Следовательно, говорить о ММР-8 как

о возможном предикторе вероятных осложнений и использование, как маркера ОПП, возможно. Проанализировав данные полученные после оперативного вмешательства в исследуемых группах, можно отметить, что в группе ОПП было достоверное увеличение показателя ММР-8 в сыворотке крови 20,41 (6,11; 37,81) нг/мл;  $p < 0,05$ , что значительно отличается от группы с ОПП и СД – 4,50 (1,19;7,91) нг/мл,  $p < 0,05$ , а также с группой контроля без ОПП 2,09(1,31;2,73) нг/мл,  $p < 0,05$ . Достоверное увеличение показателя ТИМР 1 отмечалось в 2х группах с осложнениями: 233,57 (221,06; 233,19) и 255,54 (240,42;260,68) нг/мл,  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля 197,18 (186,44; 210,62) нг/мл,  $p < 0,05$ . При развитии ранних осложнений в виде ОПП наблюдается увеличение концентрации ММР-8, ответственной за ремоделирование внеклеточного матрикса, необходимой для поддержания структурной и функциональной целостности клубочков и интерстиция. Низкая активность ММР-8 в группе с ранними ренальными осложнениями и СД, вероятно, сопряжено с подавлением катаболизма компонентов внеклеточного матрикса в условиях гипергликемии. Компенсаторное увеличение уровня ТИМР 1 после оперативного вмешательства в обеих группах с операционными осложнениями было недостаточным, что привело к нарушению баланса протеолитической активности. К тому же ТИМР1 может инактивироваться изучаемым нами протеолитическим ферментом – эластазой нейтрофилов (ММР-8), благодаря чему значительно возрастает активность MMPs. Изменения у пациентов в I и II группах в сравнении с контролем подтверждают участие металлопротеиназ в механизмах ОПП посредством активации протеолиза, что приводит к увеличению сосудистой и канальцевой проницаемости, и могут влиять на гибель гломерулярных и тубулярных клеток. Данные изменения можно рассматривать в качестве дополнительного диагностического признака.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Колесников С. В., А. С. Борисов А. С. Острое почечное повреждение: новые аспекты известной проблемы // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2013. №4. – С. 69–73.
2. Табакьян Е. А, Партигулов С. А. Биомаркеры ишемии и острого повреждения почек после операций на сердце с искусственным кровообращением // Анестезиология, реаниматология, перфузиология. – 2013. №4. – С. 30–33.
3. Е. В. Маркелова, В. В. Здор и др. Матриксные металлопротеиназы их взаимосвязь с системой ци-



- токинов, диагностический и прогностический потенциал // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2016. No2. – С. 11–22.
4. Кныш С. В., Малков В. А., Чагина Е. А., Потепенко А. А. Изменение матричной металлопротеиназы-9 и ее тканевого ингибитора-1 при опоясывающем герпесе. Российский иммуноло-

гический журнал. 2018. Т. 12(21). № 4. С. 683–685. [Knysh S. V., Malkov V. A., Chagina E. A., Potapenko A. A. Alterations in matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 serum concentrations in patients with herpes zoster. Russian journal of immunology. 2018. 12(21). N.4. P. 683–685].

## THE LEVEL OF MATRIX METALLOPROTEINASE 8 AND TISSUE TYPE 1 INHIBITOR IN ACUTE KIDNEY INJURY AFTER CARDIAC SURGERY

© 2019 E. V. Markelova\*, O. I. Fomina, V. G. Fisenko, V. Yu. Arsenina

\*E-mail: markev2010@mail.ru

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Pacific state medical university»  
Ministry of Health Russia, Vladivostok, Russia

Received: 22.07.2019. Accepted: 29.08.2019

The problem of early postoperative complications after coronary artery bypass surgery remains unresolved, one of these complications is acute kidney injury (AKI), the prevalence of which according to different authors reaches 30%. Purpose: to evaluate the diagnostic and prognostic value in determining the level of matrix metalloproteinase 8 and their type 1 inhibitor (MMP-8, TIMP 1) in patients with acute kidney injury before and after cardiac surgery. Materials and methods: serum of 70 patients with coronary heart disease before and after cardiac surgery divided into 3 groups: with AKI (I gr.), with AKI and diabetes mellitus (II gr.), without renal complications (III gr.). Results: an increase in serum MMP-8 concentration was registered during the development of AKI in I gr. ( $p < 0.05$ ), low MMP-8 level was detected before the operation in group II ( $p < 0.05$ ), an increase in the level of TIMP 1 after surgery was recorded in all groups ( $p < 0.05$ ).

*Key words:* matrix metalloproteinase type 8, tissue type 1 inhibitor, acute kidney injury, cardiac surgery

### Authors:

**Markelova E. V.**, ✉ DrSci, professor, head of normal and pathological physiology department, FSBEI HE PSMU MOH Russia, Vladivostok, Russia. E-mail: markev2010@mail.ru;

**Fomina O. I.**, assistant professor of normal and pathological physiology department, FSBEI HE PSMU MOH Russia, Vladivostok, Russia;

**Fisenko V. G.**, assistant professor of normal and pathological physiology department, FSBEI HE PSMU MOH Russia, Vladivostok, Russia;

**Arsenina V. Yu.**, student of normal and pathological physiology department, FSBEI HE PSMU MOH Russia, Vladivostok, Russia.

## ИНТЕРЛЕЙКИН-8 ПОТЕНЦИРУЕТ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АКТИВИРОВАННЫХ МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ И Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. М. Е. Меняйло\*, В. В. Малащенко, О. Б. Мелашенко, Е. О. Шунькин, А. Г. Гончаров

\*E-mail: max89me@yandex.ru

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия

Поступила: 19.07.2019. Принята: 27.08.2019

Исследовали прямое влияние интерлейкина-8 (IL-8) на функциональную активность моноцитов/макрофагов (Мц/Мф) и Т-лимфоцитов человека. Показали, что после ЛПС-стимуляции, IL-8 активировал продукцию Мц/Мф IL-6 и IL-1 $\beta$ . Кроме того, IL-8 усиливал продукцию IL-2 и подавлял выработку IL-10 и IL-4 активированными Т-лимфоцитами. Результаты свидетельствуют о способности IL-8 стимулировать как провоспалительную (M1) активность Мц/Мф, так и участвовать в непосредственной регуляции адаптивных Th1-реакций.

**Ключевые слова:** интерлейкин-8, цитокины, моноциты/макрофаги, Т-лимфоциты

DOI: 10.31857/S102872210007093-7

**Адрес:** 236001 Калининград, ул. Гайдара, д. 6, каб. 406, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Научно-технологический парк «Фабрика», Меняйло Максим Евгеньевич. Тел.: +7(911) 471-87-04 (моб.).

**E-mail:** max89me@yandex.ru

### Авторы:

**Меняйло М. Е.**, к.м.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия;

**Малащенко В. В.**, научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия;

**Мелашенко О. Б.**, научный сотрудник центра медицинских биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Калининград, Россия;

**Шунькин Е. О.**, м.н.с. центра медицинских биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия;

**Гончаров А. Г.**, к.м.н., заместитель директора медицинского института по научной работе ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Моноциты/макрофаги (Мц/Мф) человека играют важную роль в иммунной защите, воспалении, гомеостазе, инициируют адаптивный

иммунитет. При классической активации (M1) Мц/Мф приобретают провоспалительные функции, при альтернативной (M2), Мц/Мф становятся эффективны в борьбе с внеклеточными патогенами и поддерживают регенеративные процессы [1]. Т-лимфоциты имеют решающее значение в достижении регулируемого эффективного иммунного ответа на патогены посредством распознавания и уничтожения клеток и секреции специфических цитокинов. Th1 клетки — характеризуются продукцией IFN- $\gamma$ , IL-2, тогда как Th2 — продуцируют IL-4, IL-5, IL-13 [2].

Как Мц/Мф так и Т-лимфоциты высокочувствительны к цитокиновому/хемокиновому микроокружению, они способны изменять набор поверхностных молекул и функциональную активность. Роль интерлейкина-8 (IL-8) в естественной иммунной защите хорошо описана в современной литературе, участие IL-8 в фундаментальных механизмах адаптивного иммунитета остается недостаточно изученным. Доказанное наличие рецепторов CXCR1 и CXCR2 на Мц/Мф и Т-лимфоцитах свидетельствует о том, что IL-8 способен непосредственно взаимодействовать с этими клетками [3]. Изучению

прямых эффектов IL-8 на функциональную активность Мц/Мф и Т-лимфоцитов и посвящена данная работа.

**Цель исследования:** исследовать прямое влияние IL-8 на функциональную активность моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов человека *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служила венозная кровь 16 условно здоровых доноров в возрасте от 21 до 35 лет, из которой получали мононуклеарные клетки (МНК) методом градиентного центрифугирования. Все доноры подписывали информированное согласие. Для получения из взвеси МНК монокультур Мц/Мф (CD14<sup>+</sup>) или Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), был использован метод позитивной колоночной иммуномагнитной сепарации («MiltenyiBiotec», Германия). CD14<sup>+</sup> клетки инкубировали в среде TechMACS (MiltenyiBiotec) в 24-х луночных планшетах в концентрации 24 часа. В качестве активатора использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС). Т-лимфоциты инкубировали 48 часов, для активации использовали частицы, конъюгированные с антителами к CD2/CD3/CD28. Рекомбинантный IL-8 добавляли к пробам вместе с активатором в концентрации 10 нг/мл.

Показателем функциональной активности исследуемых клеток являлось определение концентраций про- и противовоспалительных цитокинов. Оценку проводили методом ИФА на автоматическом анализаторе с применением наборов к IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (при анализе CD14<sup>+</sup> клеток) и IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 (при анализе CD3<sup>+</sup> клеток) («Вектор Бест» Россия). Для оценки статистической достоверности выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона для парных зависимых выборок. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружили, что действие IL-8 на продукцию цитокинов Мц/Мф зависит от активации ЛПС. Показали, что IL-8 усиливает выработку IL-1 $\beta$  и IL-6 активированными клетками. Интересно, что IL-8 не влиял на продукцию TNF- $\alpha$  и IL-10. Эти данные согласуются с IL-8-опосредованной провоспалительной поляризацией ЛПС-активированных Мц/Мф. Добав-

ление IL-8 к активированным Т-лимфоцитам приводило к усилению продукции IL-2. При этом было показано статистически значимое снижение продукции Т-лимфоцитами IL-10 и IL-4. На продукцию IFN- $\gamma$  активированными Т-клетками добавление IL-8 не влияло.

IL-8 значительно усиливал выработку IL-1 и IL-6, то есть цитокинов, которые наряду с IL-8 участвуют в аутокринной регуляции функциональной активности Мц/Мф [4]. При интерпретации этих результатов следует иметь в виду, что активированные Мц/Мф в данной системе продуцируют эндогенный IL-8, который может частично маскировать действие экзогенного IL-8 в отношении продукции цитокинов. Не только сами Мц/Мф, но и взаимодействующие с ними Т-клетки могут быть продуцентами IL-8. При исследовании выявили положительный эффект IL-8 на продукцию IL-2 (и отрицательный эффект на IL-10 и IL-4) Т-клетками. Следовательно, IL-8 обладает способностью опосредованно поддерживать пролиферативные Т-клеточные реакции, в том числе и те, которые лежат в основе формирования иммунной памяти [5]. Таким образом, IL-8 способен поддерживать провоспалительную активность Мц/Мф и содействовать развитию иммунных реакций, опосредуемых Т-хелперами 1 типа.

Информация о спонсорстве: работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания Минобрнауки РФ № 20.5562.2017/8.9.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Martinez F. O., Gordon S.* The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 2014, 6: 13.
2. *Hirahara K., Nakayama T.* CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *International immunology*. 2016, 28(4), 163–171.
3. *Meniailo M. E., Malashchenko V. V., Shmarov V. A., Gazatova N. D., Melashchenko O. B., Goncharov A. G., Seledtsova G. V., Seledtsov V. I.* Direct effects of interleukin-8 on growth and functional activity of T lymphocytes. *International immunopharmacology*. 2017, 50, 178–185.
4. *Arango Duque G., Descoteaux A.* Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*. 2014, 5, 491.
5. *Hwang E. S., Hong J. H., Glimcher L. H.* IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *Journal of experimental medicine*. 2005, 202(9), 1289–1300.

## INTERLEUKIN-8 POTENTIATED THE PRO-INFLAMMATORY ACTIVITY OF HUMAN MONOCYTES/MACROPHAGES AND T-LYMPHOCYTES

© 2019 M. E. Meniailo\*, V. V. Malashchenko, O. B. Melashchenko, E. O. Shunkin, A. G. Goncharov

\*E-mail: max89me@yandex.ru

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received: 19.07.2019. Accepted: 27.08.2019

We investigated the direct effect of interleukin-8 (IL-8) on the functional activity of human monocytes/macrophages and T-lymphocytes. It was shown that IL-8 enhanced the production of IL-6 and IL-1 $\beta$  by LPS-activated monocytes/macrophages. In addition, IL-8 enhanced the production of IL-2 and suppressed the production of IL-10 and IL-4 by activated T-lymphocytes. The results demonstrate the ability of IL-8 to stimulate both the pro-inflammatory (M1) activity of monocytes/macrophages, and to participate in the direct regulation of adaptive T-cell responses.

*Key words:* interleukin-8, cytokines, monocytes/macrophages, T-lymphocytes

### Authors:

**Meniailo M. E.**, ✉ PhD, Researcher of Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia. **E-mail:** max89me@yandex.ru;

**Malashchenko V. V.**, Researcher of Center of Medical Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia; **Melashchenko O. B.**, Researcher of Center of Medical Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Shunkin E. O.**, junior researcher of Center of Medical Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Goncharov A. G.**, Deputy Director of the Medical Institute for Scientific Work Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia.

## УРОВЕНЬ ИНТЕРФЕРОНОВ ЛЯМБДА 1 И 3 ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ЖЕНЩИН С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

© 2019 г. Т. А. Невежкина<sup>1\*</sup>, Л. С. Матюшкина<sup>1</sup>, А. П. Серебрякова<sup>1</sup>,  
О. Н. Сидорова<sup>1</sup>, М. С. Тулупова<sup>2</sup>

\*E-mail: [www.tanya.ru9292@mail.ru](mailto:www.tanya.ru9292@mail.ru)

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»  
Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования  
Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила: 14.07.2019. Принята: 20.08.2019

Папилломавирусная инфекция является одной из самых распространенных инфекций, передаваемой преимущественно половым путем. ПВИ наиболее часто сопровождается снижением клеточного иммунитета, а так же дефицитом общего и местного интерферона. Обследовано 129 пациенток на ИППП и ВПЧ. Было установлено разнонаправленное изменение ИЛ-28 (ИФН-лямбда 3) и ИЛ-29 (ИФН-лямбда 1) в сыворотке венозной крови. При ПВИ определено снижение ИФН-лямбда-1 при статистически значимом увеличении ИФН-лямбда-3 в сыворотке крови.

**Ключевые слова:** папилломавирусная инфекция, интерфероны лямбда 1 и 3

DOI: 10.31857/S102872210007073-5

**Адрес:** 690002 Владивосток, ул. Острякова, д. 2, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра нормальной и патологической физиологии, Невежкина Татьяна Андреевна.

Тел./факс: +7(914) 6728945 (моб.).

E-mail: [www.tanya.ru9292@mail.ru](mailto:www.tanya.ru9292@mail.ru)

**Авторы:**

**Невежкина Т. А.**, ассистент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

**Матюшкина Л. С.**, к.м.н., доцент, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

**Серебрякова А. П.**, студент лечебного дела, 4 курс ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

**Сидорова О. Н.**, к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

**Тулупова М. С.**, к.м.н., докторант кафедры акушерства-гинекологии. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования Российской Федерации, Москва, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Персистирование папилломавирусной инфекции (ПВИ) в организме женщины имеет большое значение в ее репродуктивном по-

тенциале. ПВИ является одной из самых распространенных инфекций, которая передается преимущественно половым путем. Только за 2015 год в амбулаторно-поликлинических условиях было зарегистрировано 34,8% новых случаев ВПЧ [5]. Иммунная система является основным фактором, который будет определять тяжесть и продолжительность воспалительного процесса, особенностей течения “медленных” вирусных инфекций, в том числе и ПВИ [3]. Иммунная система направлена на предотвращение манифестной ПВИ. Клеточный иммунитет является первой линией защиты репродуктивного тракта, оказывает блокирующее воздействие на персистенцию и интеграцию вируса в клетку и, в ряде случаев, способствует спонтанному регрессу вирусных поражений. Участие клеточного иммунитета в этом процессе подтверждает обнаружение большого количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в инфильтрате регрессирующих кондилом [4]. Часто при ПВИ наблюдается снижение клеточного иммунитета, а также дефицит местного и общего интерферона, особенно интерферонов 1 типа [1, 2], однако недостаточно изучены интерфероны 3 типа, которые

являются ключевым моментом в противовирусном ответе слизистой оболочки [7].

**Цель работы.** Исследовать уровень интерферонов ИЛ-28 (ИФН-лямбда 3) и ИЛ-29 (ИФН-лямбда 1) в сыворотке крови пациенток с ПВИ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 129 пациенток на инфекции, передающиеся половым путем (ИППП), согласно стандартам обследования пациентов на ИППП. Пациенток разделили на 3 основные группы: I группа (n=62) – с папилломавирусной инфекцией, II группа (n=57) – без папилломавирусной инфекцией и III группа – контрольная, 10 практически здоровых женщин-добровольцев. Средний возраст пациенток составил  $26,3 \pm 3,3$  лет, средний возраст женщин контрольной группы был  $31,5 \pm 2,2$  лет. Определение уровня ИЛ-28 (ИФН-лямбда 3) и ИЛ-29 (ИФН-лямбда 1) в сыворотке крови проводили с помощью специфических реактивов фирмы “R&D Diagnostics Inc.” (USA) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа, согласно прилагаемых инструкций. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора “Multiscan” (Финляндия). Количество выражали в пг/мл.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено достоверное снижение ИФН-лямбда-1 у женщин с ПВИ ( $p < 0,05$ ) (I группа –  $45,2 (6,9; 72,3)$  пг/мл, II группа –  $53,9 (12,32; 102,75)$  пг/мл и группа контроля –  $77,12 (38,58; 86,71)$  пг/мл). Тогда как содержание ИФН-лямбда-3, напротив, было снижено ( $p < 0,05$ ) в группе без ПВИ. В то время как у пациенток с ПВИ установлена статистически значимая активация продукции ИФН-лямбда-3 (I группа –  $318 (50,8; 410,69)$  пг/мл, II группа –  $187,8 (124,1; 279,5)$  пг/мл и группа контроля –  $231,2 (205,08; 251,93)$  пг/мл).

Интерфероны 3 типа имели разнонаправленные изменения: при ПВИ определено снижение ИФН-лямбда-1 при статистически значимом

увеличении ИФН-лямбда-3 в сыворотке крови. Тогда как у женщин II группы уровень ИФН-лямбда-1 не отличался от референсных величин, а показатели ИФН-лямбда-3, напротив, были снижены. Можно предполагать, стимулирующее влияние ПВИ на выработку ИФН-лямбда-3, обладающего наиболее выраженной противовирусной активностью. Это согласуется с отсутствием повышения сывороточного содержания интерферонов 3 типа в группе без ПВИ. Однако нельзя исключать влияние генетического полиморфизма [6], обуславливающего разнонаправленную динамику в уровне ИФН-лямбда 1 и 3 типов, что, безусловно, требует дальнейших исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Барановская Е. И., Кустова М. А., Жаворонок С. В. Перинатальные аспекты папилломавирусной инфекции // Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева. – 2015. – № 2 (2). – С. 26–30.
2. Киселева Т. С., Гумилевский Б. Ю. Влияние полиморфизмов rs8099917 T>G в гене IL28B на персистенцию высокоонкогенных типов папилломавирусной инфекции у женщин Волгоградской области // Аллергология и иммунология. – 2015. – Т. 16. – № 4. – С. 389.
3. Маркелова Е. В., Скляр Л. Ф., Просекова Е. В., Чепурнова Н. С., Нагорная А. В. Персистирующие вирусные инфекции: этиология и иммунопатогенез: монография / Е. В. Маркелова, Л. Ф. Скляр, Е. В. просекова и др. – [Под ред. Е. В. Маркеловой]. – Владивосток: Медицина ДВ, 2016. – 160 с.
4. Молочков В. А., Киселев В. И., Рудых И. В. Папилломавирусная инфекция. Клиника, диагностика, лечение: Пособие для врачей. – М.: Русский врач, 2009. – 35 с.
5. Роик Е. Е., Баранов А. Н., Трещева Н. Д. Эпидемиологические особенности папилломавирусной инфекции // Экология человека. – 2015. – С21–26.
6. Dellinger R. P., Levy M. M., Rhodes A. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock // Critical Care Medicine. – 2013. – V.41(2). – P. 580–637.
7. Parisa A. K., Masoumeh E., Kokhaei P., Soleimanjahi H. Preparation and Characterization of PLGA Nanoparticles Containing Plasmid DNA Encoding Human IFN-lambda-1/IL-29 // Iran J Pharm Res. – 2019. – V 18(1). – P. 156–167.

**LEVEL OF INTERFERONS LAMBDA 1 AND 3 TYPES IN SERIAL BLOOD  
IN WOMEN WITH PAPILLOMAVIRUS INFECTION**

© 2019 T. A. Nevezhkina<sup>1\*</sup>, L. S. Matyushkina<sup>1</sup>, A. P. Serebryakova<sup>1</sup>,  
O. N. Sidorova<sup>1</sup>, M. S. Tulupova<sup>2</sup>

\*E-mail: [www.tanya.ru9292@mail.ru](mailto:www.tanya.ru9292@mail.ru)

<sup>1</sup>Pacific State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation,  
Vladivostok, Russia;

<sup>2</sup>Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship  
University of Russia" of the Ministry of Education of the Russian Federation, Moscow, Russia

**Received:** 14.07.2019. **Accepted:** 20.08.2019

Human papillomavirus infection is one of the most common sexually transmitted infections. HPV is most often accompanied by a decrease in cellular immunity, as well as a lack of general and local interferon. Surveyed 129 patients with STIs and HPV. The multidirectional content of IL-28 (IFN-lambda 3) and IL-29 (IFN-lambda 1) in serum of venous blood was determined. In HPV, a decrease in IFN-lambda-1 was determined with a statistically significant increase in IFN-lambda-3 in blood serum.

*Key words:* human papillomavirus infection, interferons lambda 1 and 3

**Authors:**

**Nevezhkina T. A.**, ✉ Assistant of the Department of Obstetrics and Gynecology, FSBEI of HE TSMU of the Russian Ministry of Health, Vladivostok, Russia. **E-mail:** [www.tanya.ru9292@mail.ru](mailto:www.tanya.ru9292@mail.ru);

**Matyushkina L. S.**, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, FSBEI of HE TSMU of the Ministry of Health of Russia, Vladivostok, Russia;

**Serebryakova A. P.**, medical student, 4th year FSBEI of Higher Medical University, Moscow State Medical University, Vladivostok, Russia;

**Sidorova O. N.**, Ph.D., Associate Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, FSBEI HE TSMU, Ministry of Health of Russia;

**Tulupova M. S.**, Ph.D., doctoral candidate of the Department of Obstetrics-Gynecology. Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship University of Russia" of the Ministry of Education of the Russian Federation, Moscow, Russia.

## ТАРГЕТНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ ПРИ ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТАХ С ИНФЕКЦИОННЫМ СИНДРОМОМ

© 2019 г. И. В. Нестерова<sup>1,2</sup>

E-mail: inesterova1@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки России, Москва, Россия

Поступила: 27.06.2019. Принята: 06.08.2019

Основной целью данной работы является освещение современного состояния иммуномодулирующей терапии направленного – таргетного действия, используемой эффективно при проведении иммуномодулирующей терапии вторичных иммунодефицитов, при условии воздействия иммуномодулирующего препарата на известный рецептор. Например, глюкозаминилмураמיד-пептид, действует через NOD2 или рекомбинантный интерферон альфа 2b с антиоксидантным комплексом – через рецептор к IFN альфа. Приводятся современные данные о препаратах таргетного действия – моноклональных антителах (монАТ), используемых в настоящее время. Описаны позитивные и негативные эффекты терапии биологическими препаратами, а также методы предотвращения и профилактики побочных эффектов. Высказывается мнение, что в будущем, во избежание ошибок и осложнений, терапию монАТ должны проводить клинические иммунологи (в содружестве со специалистами других областей медицины) под контролем состояния иммунной системы и интерферонового статуса.

**Ключевые слова:** таргетная иммунотерапия, вторичный иммунодефицит, инфекционный синдром

DOI: 10.31857/S102872210007074-6

**Адрес:** 117513, г. Москва, Ленинский проспект, 123–1, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки России, кафедра аллергологии и иммунологии. Нестерова Ирина Вадимовна. Тел.: 8(916)1877341 (моб.); **E-mail:** inesterova1@yandex.ru

**Авторы:**

**Нестерова И. В.**, д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки России, Москва, Россия; главный научный сотрудник ЦНИЛ, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Россия.

Вторичные, или приобретенные в процессе постнатального развития, иммунодефициты (ВИД), равно вторичная иммунная недостаточность, – всегда клиническая категория, имеющая весьма характерные признаки того, что иммунная система индивидуума не справляется с антигенной нагрузкой, того или иного вида, чаще всего с инфекционной (вирусы, бактерии, грибы), что проявляется, в первую очередь, нетипично протекающими инфекциями, инфекционно-воспалительными заболеваниями

ми, резистентными к традиционной терапии. В основе клинического(-ких) признаков, клинического проявления ВИД, лежат приобретенные повреждения иммунной системы количественного или функционального характера, – своеобразная, лабораторно выявляемая, формула иммунного(ных) дефектов. У пациента со вторичным ИД иммунная система функционирует в рамках своих возможностей [1]. *Причиннозначимые факторы ВИД:* стресс, инфекции, травмы, ожоги, опухоли, наркоз, оперативное вмешательство, НПВП, лучевая и химиотерапия. *Факторы риска ВИД:* микро- и макроокружение; питание; особенности метаболизма; эндокринопатии; заболевания нервной системы.

### Классификация вторичных иммунодефицитов (Нестерова И. В., 2018)

#### Вторичные иммунодефициты:

Локальные (на уровне слизистых и кожи) и/или системные, моно- или комбинированные, острые или персистирующие – хронические:



1. Количественные и функциональные дефекты Т звена;
2. Количественные и функциональные дефекты гуморального звена;
3. Количественные и функциональные дефекты фагоцитов: нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов, макрофагов;
4. Количественные и функциональные дефекты естественных киллерных клеток;
5. Дефекты системы интерферонов;
6. Дефекты системы комплемента.

#### **Клинические критерии вторичного иммунодефицита с инфекционным синдромом:**

- Частые простудные заболевания у взрослых пациентов (более 4 раз в году) и детей (более 6–8 раз в году) в виде повторных ОРВИ или обострений хронических заболеваний ротоглотки (хронический тонзиллит, гайморит, фарингит, отит); стандартная терапия не предупреждает рецидива заболевания;
- Частые эпизоды хронической герпетической инфекции (более 4–6–14 раз в году), в том числе ороназофациальный герпес, генитальный герпес, Herpes Zoster, герпетический стоматит с частыми рецидивами;
- Хроническая герпетическая активная инфекция, вызванная ВЭБ, ЦМВ, ВЧГБ, возникающая или после банального ОРВИ, или после перенесенного инфекционного мононуклеоза;
- Хронические вирусные гепатиты В, С, др.
- ВПЧ: бородавки, папилломы, аногенитальные остроконечные кондиломы, папилломатоз гортани с частыми рецидивами; ВПЧ высокого онкогенного риска;
- Хронические заболевания органов дыхания с частыми обострениями (хронический ринит, хронический трахеит, хронический бронхит, повторные пневмонии);
- Хронические заболевания урогенитального тракта, плохо поддающиеся стандартной терапии, с частыми обострениями (хронический уретрит, хронический цистит, хронический пиелонефрит, хронический простатит, хронический эндометрит, хронический сальпингоофорит); хронический бактериально-кандидозный вагинит/кольпит с частыми обострениями;
- Наличие заболеваний, передающихся половым путем, плохо поддающихся стандартному лечению (хламидиоз, уреаплазмоз, гарднереллез, микоплазмоз, генитальный герпес, цитомегаловирусная инфекция и т.д.);
- Хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, плохо поддающиеся стандартной терапии, с частыми обострениями (хеликобактерный гастрит, язвенная болезнь желудка на фоне хеликобактерного гастрита, дисбактериоз кишечника и т.д.);
- Хронические вялотекущие инфекционно-воспалительные заболевания различных органов и систем в период обострения, характеризующиеся отсутствием изменений в анализе крови, отсутствием или слабой температурной реакцией;
- Хронические гнойные, инфекции с частыми обострениями (фурункулез, пиодермия, абсцессы), стандартная терапия не предупреждает рецидива заболевания);
- Кандидомикоз;
- Состояние после удаления селезенки (спленэктомии);
- Состояние во время переносимых и после перенесенных сепсиса, перитонита, острогематогенного остеомиелита, тяжелых ожогов, политравмы и т.д.;
- Состояние после длительного наркоза, оперативных вмешательств;
- Лимфопения; нейтропения; «неизменный» клинический анализ крови в остром периоде бактериальной инфекции;

Иммунотропная терапия, используемая в настоящее время для лечения различных иммунозависимых заболеваний, ассоциированных с ВИД, может носить позитивный (заместительная, модулирующая, корригирующая) и супрессивный характер. Иммунотерапия, обладающая позитивным влиянием, как правило, используется для лечения лиц с первичными (ПИД) и вторичными иммунодефицитами (ВИД), в первую очередь, ассоциированными с инфекционным синдромом. В настоящее время в России существует огромное количество, как отечественных, так и зарубежных иммунотропных препаратов, обладающих различным спектром воздействий на иммунную систему. При этом некоторыми авторами подчеркивается неспецифичность их влияния на функционирование иммунной системы (ИС) и системы интерферонов (IFN) [1,2].

Действительно, сегодняшняя реальность такова, что несмотря на достаточно большой перечень иммунотропных препаратов, существующих в России, имеется небольшое число иммуномодулирующих препаратов, обладающих реальной таргетной (от англ. target — цель) модулирующей

активностью, как позитивной, — восстанавливающей, модулирующей, корригирующей, так и супрессирующей — подавляющей, сдерживающей гиперактивность иммунной системы. Эти иммуномодулирующие препараты являются реально таргетными, поскольку они способны точно связываться с определенными рецепторами, локализуясь, как на поверхности клеток иммунной системы, так и внутриклеточно. В результате активируются сигнальные внутриклеточные пути, экспрессируются гены, ответственные за синтез провоспалительных цитокинов, хемокинов, интерферонов, и клетка восстанавливает свою, поврежденную или заблокированную под неблагоприятным воздействием вирусов, бактерий, грибов и других повреждающих факторов, функциональную активность.

**Классификация современных иммуотропных препаратов таргетного действия, обладающих доказанным позитивным иммуномодулирующим действием, используемых при ВИД**

- *Интерфероны*: интерферон альфа (IFNAR1, IFNAR2), интерферон бета (IFNAR1, IFNAR2), интерферон гамма (IFN $\gamma$ R);
- *Колонистимулирующие факторы*: G-CSF (рецептор к G-CSF), GM-CSF (рецептор к GM-CSF);
- *Мурамилпептиды*: глюкозаминилмурамилдипептид (NOD2), комплекс мурамилпептидов (NOD1 и NOD2);
- *Внутривенные иммуноглобулины*: IgG-обогащенные (Fc $\gamma$ I, Fc $\gamma$ II, Fc $\gamma$ III);
- *Цитокины*: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-7, IL-15, G-CSF, GM-CSF.

**Таргетная иммунотерапия — иммунотерапия направленного действия:**

- Восстановление дефектов функционирования системы интерферонов: заместительная и иммуномодулирующая терапия при острых и хронических нетипично протекающих вирусных инфекциях (рекомбинантный IFN $\alpha$ 2b в комбинации с антиоксидантами аскорбиновой кислотой и  $\alpha$ -токоферолом — виферон);
- Восстановление дефектов функционирования естественных киллерных клеток (глюкозаминилмурамилдипептид — ликопид);
- Восстановление дефектов функционирования нейтрофильных гранулоцитов (глюкозаминилмурамилдипептид — ликопид; внутривенные IgG-обогащенные иммуноглобулины; интерлейкин 1 $\beta$  — беталейкин);

- Восстановление дефектов функционирования Т-лимфоцитов (гексапептид — синтетический аналог гормона тимуса — имунофан; интерлейкин 2 — ронколейкин);
- Восстановление дефектов функционирования гуморального звена при дефиците сывороточных иммуноглобулинов (внутривенные IgG-обогащенные иммуноглобулины; внутривенные поликлональные IgM-обогащенные иммуноглобулины);
- Блокирование и модулирование гиперэргического функционирования иммунной системы при иммунозависимых заболеваниях, ассоциированных с гиперпродукцией цитокинов (TNF, IL6, IL17, IL1 $\beta$  и т.д.) и гиперактивацией нейтрофильных гранулоцитов.

Применяемая при ВИД иммуномодулирующая терапия, зависит не только от характера клинических проявлений и особенностей течения ВИД, но и от вида выявляемых дефектов функционирования ИС и/или системы IFN. Так, при ВИД с инфекционным синдромом, представленным рецидивирующими гнойными инфекциями кожи и/или подкожно-жировой клетчатки, при сепсисе у новорожденных и взрослых, при повторных острых респираторных инфекциях и при хронических герпетических инфекциях у детей и взрослых пациентов, ассоциированных с дефектами функционирования нейтрофильных гранулоцитов (НГ), нами отмечена позитивная клинико-иммунологическая динамика на фоне использования глюкозаминилмурамилдипептида (ликопида), действующего через внутриклеточные NOD2 рецепторы. При ВИД с вирусным инфекционным синдромом (повторные острые респираторные вирусные инфекции, рецидивирующий и упорно-рецидивирующий ороназофациальный и генитальный герпес, папилломавирусная инфекция, в том числе и высокого онкогенного риска), ассоциированным с дефектами в системе интерферонов (преобладающее в 90,0–100,0% случаев нарушение индуцированной продукции IFN $\alpha$ ), позитивный клинико-иммунологический эффект отмечается при использовании рекомбинантного IFN $\alpha$ 2b (виферон), действующего через IFNAR — рецептор к IFN $\alpha$ .

Активно разрабатывается стратегия таргетной иммунотерапии сепсиса с учетом состояния ИС в разные фазы процесса. В фазу цитокинового шторма, когда происходит гиперпродукция провоспалительных цитокинов IL-6, IL-1, TNF $\alpha$  проводится иммуносупрессивная таргетная терапия. Так, для блокирования провоспа-

лительных эффектов TNF $\alpha$  применяют анти-TNF $\alpha$  моноклональные антитела (various), для блокирования IL-1 – рецепторный антагонист IL-1 (anakinra), для блокирования активности IL-6 – рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело к человеческому рецептору IL-6 из подкласса иммуноглобулинов IgG1 Тоцилизумаб. Тоцилизумаб селективно связывается и подавляет как растворимые, так и мембранные рецепторы IL-6 (sIL-6R и mIL-6R). В фазу истощения функций иммунной системы – вторичного иммунодефицита или «иммунного парализа», применяется позитивная иммуномодулирующая терапия. Для повышения возможностей клеток иммунной системы презентировать антигены, восстановления нормального функционирования и количества нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, а также для восстановления продукции провоспалительных цитокинов используются препараты GM-CSF и IFN $\gamma$ . С целью нормализации процесса апоптоза, повышенного при сепсисе, и восстановления функций Т-лимфоцитов применяются препараты IL-7, IL-15. Использование anti-PD-(L)1 ингибирует взаимодействие PD-1-PD-L1 уменьшает апоптоз и восстанавливает функции Т-лимфоцитов [3,4]. При тяжелых проявлениях инфекционного синдрома при ВИД на первых этапах лечения возможно использование заместительной иммунотерапии.

В мире ведутся активные разработки, направленные на создание большого количества терапевтических моАТ, действие которых направлено на патогенетически значимые эпитопы вирусов (ВИЧ, риновирус) и бактерий (кишечная палочка, стафилококк) [5, 6]. Терапия биологическими препаратами используется в различных областях современной медицины. Она критична и для лечения тяжелых иммунодефицитов с инфекционным синдромом. Использование моАТ делает возможным селективно воздействовать на клетки ИС и цитокины, играющие значимую роль в иммунопатогенезе этих заболеваний и достигать специфических терапевтических эффектов [7]. Как правило, эти биологические препараты не вызывают глобальной иммуносупрессии, хотя и способны оказывать негативные эффекты на иммунные функции у некоторых индивидуумов, что компрометирует организм больного и может приводить к дополнительному усугублению ВИД и присоединению серьезных инфекций. Некоторые хронические заболевания могут активироваться под их влиянием, например, хронический вирусный

гепатит, или туберкулез. Пациенты, угрожаемые по реактивации хронических инфекционных заболеваний, могут быть заранее провакцинированы. В случае предполагаемого возникновения осложнений при проведении терапии моАТ необходимо использовать режимы профилактики и проводить антибактериальную или противовирусную терапию или, при возникновении гипогаммаглобулинемии, проводить заместительную иммунотерапию внутривенными иммуноглобулинами [7].

С нашей точки зрения, будущее принадлежит персонифицированной иммуномодулирующей терапии направленного точечного (таргетного) действия и проведение ее должны будут осуществлять только высокопрофессиональные клинические иммунологи. Именно при таких условиях интеграции клинической иммунологии с клинической медициной станет возможным безопасное и эффективное использование персонифицированной иммуномодулирующей терапии направленного точечного (таргетного) действия. Именно такой осторожный персонифицированный таргетный подход к лечению иммунодефицитов, иммунозависимых заболеваний с детекцией нарушений в иммунной системе и коррекцией иммунного ответа в зависимости от выявленных нарушений функционирования иммунной системы (дефицит или увеличение количества и гиперактивация иммунокомпетентных клеток, гиперпродукция ключевых цитокинов и т.д.) является безопасным и перспективным.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Нестерова И. В.* Вторичные иммунодефициты и методы их коррекции в практике врачоториноларинголога. «Иммунотерапия в практике ЛОР-врача и терапевта», под редакцией А. С. Симбирцева, Г. В. Лавреновой. Спб.: Диалог, 2018, 32–97. [*Nesterova I. V.* Secondary immunodeficiencies and methods for their correction in the practice of the otorhinolaryngologist. “Immunotherapy in the practice of ENT doctor and therapist”, edited by A. S. Simbirtsev, G. V. Lavrenova. St. Petersburg.: Dialogue, 2018, 32–97].
2. *Нестерова И. В.* Иммунотропные препараты и современная иммунотерапия в клинической иммунологии и медицине. Аллергология и иммунология, 2000, 23(3), 18–28. [*Nesterova I. V.* Immunotropic drugs and modern immunotherapy in clinical immunology and medicine. Allergology and Immunology, 2000, 23(3), 18–28.]
3. *Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T.* Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. Immunotherapy, 2016, 8(8), 959–970.

4. Van Ton A. M. P., Kox M., Abdo W. F., Pickkers P. Precision Immunotherapy for Sepsis. *Frontiers In Immunology*, 2018, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01926>).
5. Castro M. G., Baker G. J., Lowenstein P. R. Blocking immunosuppressive checkpoints for glioma therapy: the more the merrier!. *Clin Cancer Res.*, 2014, 20(20), 5147–5149.
6. Kirkham B. W., Kavanaugh A., Reich K. Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology*, 2014, 141(2), 133–142.
7. Ballou M., Fleisher T. Secondary immunodeficiency induced by drugs and biologic therapies. *UpToDate*, 2015. <https://www.uptodate.com/contents/secondary-immunodeficiency-induced-by-biologic-therapies>.

## TARGET IMMUNOTHERAPY IN SECONDARY IMMUNE DEFICIENCY WITH INFECTIOUS SYNDROME

© 2019 I.V. Nesterova<sup>1,2</sup>

*E-mail: inesterova1@yandex.ru*

<sup>1</sup>*Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Kuban State Medical University» of the Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia*

<sup>2</sup>*Federal State Autonomous Budget Educational Institution of Higher Professional Education «Peoples' Friendship University of Russia» of Ministry of Education and Science of Russia, Moscow, Russia*

**Received:** 27.06.2019. **Accepted:** 06.08.2019

The main goal of this work is to highlight the current state of immunomodulatory therapy with targeted – targeted action, which is used effectively when conducting immunomodulatory therapy of secondary immunodeficiencies, provided that the immunomodulatory drug acts on a known receptor. For example, glucosaminylmuramipeptide acts through NOD2 or recombinant interferon alpha 2b with an antioxidant complex through the IFN alpha receptor. Modern data on targeted action drugs – monoclonal antibodies (monAT), currently used are given. The positive and negative effects of biologic therapy are described, as well as methods of preventing and preventing side effects. It has been suggested that in the future, in order to avoid errors and complications, monotherapy should be administered by clinical immunology (in collaboration with specialists from other fields of medicine) under the control of the immune system and interferon status.

*Key words:* targeted immunotherapy, secondary immunodeficiency, infectious syndrome

### Author:

**Nesterova I. V.**, Doctor of Medical Sciences (MD), Professor, Professor of the Department of Allergology and Immunology, Federal State Budget Educational Autonomous Institution of Higher Professional Education «Peoples' Friendship University of Russia» of Ministry of Education and Science of Russia, Moscow, Russia; Chief Researcher of Central Research Laboratory, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia.

## РАЗРАБОТКА НАЦИОНАЛЬНЫХ ТРЕБОВАНИЙ К ПРОВЕДЕНИЮ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА, КАК ВАЖНЕЙШАЯ ЗАДАЧА В РЕГУЛИРОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ВАКЦИН

© 2019 г. Т. Н. Никитина\*, И. Е. Жук, Д. В. Горенков,  
В. И. Климов

\*E-mail: [nikitina@expmed.ru](mailto:nikitina@expmed.ru)

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Минздрава РФ, Москва, Россия

Поступила: 15.07.2019. Принята: 21.08.2019

Рак шейки матки, вызываемый папилломавирусом, занимает второе место в структуре онкологических заболеваний у женщин. Разработка вакцин против вируса папилломы человека отечественного производства является важным аспектом национальной и биологической безопасности населения. Доклинические исследования, как один из этапов разработки отечественных вакцин против вируса папилломы человека, должны отражать весь спектр требований к безопасности и быть гармонизированными с требованиями ведущих международных организаций.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, вирус папилломы человека, вакцины против ВПЧ

DOI: 10.31857/S102872210007075-7

**Адрес:** 127051 Москва, Петровский б-р, д.8, стр. 2, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Никитина Татьяна Николаевна.

Тел.: +7 (965) 132-38-95 (моб.)

E-mail: [nikitina@expmed.ru](mailto:nikitina@expmed.ru)

**Авторы:**

**Никитина Т. Н.**, к.м.н., главный эксперт ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Жук И. Е.**, ведущий эксперт ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Горенков Д. В.**, эксперт 1 категории ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Климов В. И.**, к.м.н., заместитель директора Центра планирования и координации научно исследовательских работ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва, Россия.

Папилломавирусная инфекция относится к наиболее распространенным вирусным инфекциям, передаваемым половым путем, вызывает рак шейки матки (РШМ), который занимает второе место в структуре онкологической заболеваемости у женщин. Отмечается рост за-

болеваемости и смертности в молодом возрасте от РШМ, который протекает особенно агрессивно, имеет склонность к раннему метастазированию и рецидивированию.

В настоящее время в мире зарегистрированы три вакцины для профилактики заболеваний, вызываемых папилломавирусом: Gardasil® (Нидерланды); Cervarix® (Бельгия), а также разработанная компанией Merck вакцина Gardasil-9 (США), которая в Российской Федерации еще не зарегистрирована. Разработка вакцин против вируса папилломы человека (ВПЧ) отечественного производства является важным аспектом национальной и биологической безопасности населения. Необходимым этапом в разработке новых вакцин против ВПЧ является проведение доклинических исследований (ДКИ), отражающих весь спектр требований к безопасности и гармонизированных с требованиями ведущих международных организаций [1].

**Цель исследований** состояла в анализе требований к проведению ДКИ вакцин, применяемых для профилактики предраковых заболеваний и РШМ. Для решения поставленной задачи

были проанализированы документы и данные ведущих зарубежных и отечественных медицинских организаций, а также данные ДКИ и научной литературы. При доклинической оценке эффективности и безопасности вирусных вакцин, как и других иммунобиологических лекарственных препаратов, в целях регистрации в Российской Федерации, предъявляется ряд общих требований: изучение физико-химических свойств активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата; подтверждение специфической активности; токсикологические исследования (острая и хроническая токсичность, местное действие, патоморфологические исследования, влияние на гематологические показатели и биохимические показатели сыворотки крови; пирогенность, влияние на ЦНС, репродуктивная токсичность). Изучение иммунологической безопасности проводят с помощью функциональных методов иммунологического исследования, включая морфологические и гистологические исследования как дополнение. В зависимости от природы (состава препарата) допускается использование других адекватных или дополнительных методик [2]. В 2017 году ВОЗ выпустил Рекомендации по обеспечению качества, безопасности и эффективности рекомбинантных вакцин против вируса папилломы человека, содержащих вирусоподобные частицы. Дополнительные рекомендации к дизайну, проведению, анализу и оценке ДКИ изложены в Руководстве ВОЗ по доклинической оценке вакцин. Рекомендации по общим принципам доклинической оценки адъювантов в составе вакцин и самим адъювантным вакцинам содержатся в отдельном руководстве ВОЗ [3]. Перед клиническими исследованиями на людях любой новой ВПЧ-вакцины, она должна быть максимально подробно охарактеризована, также необходимо провести предварительные исследования иммуногенности и безопасности на животных. Объем ДКИ зависит от сложности технологического процесса изготовления, состава вакцины и определяются индивидуально для каждого случая. В настоящее время не существует соответствующей адекватной животной модели для ВПЧ-инфекции ввиду видоспецифичности папилломавирусов. Рекомендуется, чтобы фармакодинамические свойства ВПЧ-вакцин оценивались в ходе исследований иммуногенности (например, на грызунах, кроликах и/или приматах). В соответствии с руководством ВОЗ в токсикологических исследованиях следует использовать окончательный состав

вакцины. Исследования необходимо проводить на соответствующих моделях животных, учитывая предполагаемое клиническое использование вакцины. Они могут включать введение вакцины до и во время беременности. Ввиду того, что целевая популяция для ВПЧ вакцин включает в себя женщин детородного возраста, исследования репродуктивной и онтогенетической токсичности являются обязательными. Исследования токсичности с многократным введением и онтогенетической токсичности должны включать оценку иммунного ответа в группе вакцинированных животных, в дополнение к необходимым токсикологическим клиническим точкам, с учетом существующих руководств ВОЗ. Если для производства ВПЧ-вакцины, содержащей вирусоподобные частицы, используется новый клеточный субстрат, то следует исследовать соответствующие аспекты безопасности, такие как потенциальный иммунный ответ, вызванный остаточными белками клетки-хозяина, на подходящей модели животных. Подробные исследования необходимо проводить, если окончательный продукт содержит адъювант, который может повысить иммунный ответ в отношении низких концентраций остаточных белков [4].

Проведенный анализ требований к ДКИ вакцин в Российской Федерации и зарубежных странах выявил необходимость разработки и внедрения национальных требований к проведению ДКИ, учитывающих международный опыт проведения ДКИ и рекомендаций ВОЗ. Это позволит в дальнейшем при разработке и регистрации отечественных вакцин против ВПЧ использовать национальные требования, методы и подходы к проведению качественных доклинических исследований.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCE

1. World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Key facts. 2019 Jan 24, 2019. Retrieved from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer), accessed 04 Feb 2019.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Имунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая / под ред. А. Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2013. — 536 с.

3. Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization: sixty-fourth report. Geneva: World Health Organization; 2014: Annex 2; WHO Technical Report Series, 987. Retrieved from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/129494/1/TRS\\_987\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/129494/1/TRS_987_eng.pdf?ua=1&ua=1), accessed 04 Feb 2019).
4. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization: fifty-fourth report. Geneva: World Health Organization; 2005: Annex 1; WHO Technical Report Series, No. 927. Retrieved from: [http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical\\_evaluation/ANNEX%20Nonclinical.P31-63.pdf?ua=1](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical_evaluation/ANNEX%20Nonclinical.P31-63.pdf?ua=1), accessed 04 Feb 2019).

## DEVELOPMENT OF NATIONAL REQUIREMENTS FOR NONCLINICAL EVALUATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS VACCINES AS AN IMPORTANT TASK IN THE REGULATION OF DOMESTIC VACCINES RESEARCH

© 2019 T. N. Nikitina\*, I. E. Zhuk, D. V. Gorenkov,  
V. I. Klimov

\*E-mail: [nikitina@expmed.ru](mailto:nikitina@expmed.ru)

*The Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

**Received:** 15.07.2019. **Accepted:** 21.08.2019

Cervical cancer caused by human papillomavirus is the second most common cancer in women. The development of domestic HPV vaccines is an important aspect of the national and biological security of the population. Nonclinical evaluation is one of the stages in national HPV vaccines development process and should reflect the full range of safety requirements and be harmonized with the requirements of leading international agencies.

*Key words:* cervical cancer, human papillomavirus, HPV vaccines

### Authors:

**Nikitina T. N.**, ✉ PhD, Main Expert, FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, Russia.

**E-mail:** [nikitina@expmed.ru](mailto:nikitina@expmed.ru);

**Zhuk I. E.**, Leading Expert, FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, Russia;

**Gorenkov D. V.**, Category 1 Expert, FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, Russia;

**Klimov V. I.**, PhD, Deputy Director of Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities of FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, Russia.

## ВЛИЯНИЕ ИММУНИЗАЦИИ НА ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

© 2019 г. М. С. Ниязалиева\*, В. С. Тойгомбаева, А. Э. Мергенов,  
И. Ш. Альджамбаева

\*E-mail: niyazalieva\_mira@mail.ru

Кыргызская Государственная Медицинская Академия им. И. К. Ахунбаева  
Бишкек, Кыргызская Республика

Поступила: 11.07.2019. Принята: 14.08.2019

Заболеваемость вирусными гепатитами в Кыргызской республике имеет тенденцию к снижению в возрастных группах 0–14 лет. Охват прививками детей варьирует от 80% в 2017–2018 годах – до 97% в 2000–2005 годах. Серологические исследования детей в возрасте от 1 года до 14 лет свидетельствует о том, что 56% обследованных были серонегативными, при этом наибольшее число приходится на возрастную группу 10–14 лет.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит В, заболеваемость, охват прививками, поствакцинальный иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210007076-8

**Адрес:** 720020 Бишкек, ул. И. Ахунбаева № 92, Кафедра общей и клинической эпидемиологии, Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева, Тойгомбаева Вера Садвакасовна. Тел.: +996312565946, факс: +996312545854, +996702099036 (моб).

**E-mail:** niyazalieva\_mira@mail.ru

**Авторы:**

**Тойгомбаева В. С.**, д.м.н., профессор заведующая кафедрой общей и клинической эпидемиологии Кыргызской Государственной Медицинской Академии им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Ниязалиева М. С.**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Кыргызской Государственной Медицинской Академии им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Мергенов А. Э.**, к.м.н., ассистент кафедры семейной медицины Кыргызской Государственной Медицинской Академии им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Альджамбаева И. Ш.**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Кыргызской Государственной Медицинской Академии им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Вирусный гепатит В (ВГВ) продолжает оставаться актуальной проблемой общественного здравоохранения в связи с развитием хронических поражений печени в Кыргызской Республике [1]. Если в 2009 году было зарегистрировано 85 случаев хронического гепатита В, то в 2014 году 347 случаев, а к 2018 году 848 случа-

ев [2]. Однако, эти цифры не отражают истинной инфицированности хроническими формами ВГВ в связи с погрешностями организации эпидемиологического надзора за ними. Настоящее время доказана эффективность вакцинопрофилактики, которая была введена в республике с 2000 года и привела к выраженной тенденции снижения заболеваемости среди возрастных групп, получивших прививки. В настоящее время наблюдается снижение охвата прививками детей связи с отказами и миграцией населения. В связи с этим возникла необходимость мониторинга активного выявления инфицированности ВГВ среди населения и оценки уровня поствакцинального иммунитета.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили сыворотки детей от 0 до 14 лет  $n=182$ , и взрослое население  $n=220$ . Формы 63 детей для выявления прививочного статуса. Данные официальной статистики: форма № 1 и форма № 18. Сыворотки исследовали методом ИФА с применением тест-системы ВекторБест AntiHBs IgG (Россия). Полученные результаты обрабатывали в системе Microsoft Excel, границу достоверности определяли при  $p=0,05$  по шкале Фишера Стьюдента [3].



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В структуре инфекционной патологии без гриппа и ОРВИ в Кыргызстане вирусные гепатиты составляют 21,7%, из них на долю ВГВ приходится 3,4%. В многолетней динамике заболеваемости наблюдается выраженная тенденция к снижению с ежегодными темпами 11,3%. Средние показатели заболеваемости за 2000–2018 годы составляют 12,3<sup>0</sup>/0000, минимальный 3,1<sup>0</sup>/0000 в 2015 году и максимальный 38,9<sup>0</sup>/0000 в 2002 году. Территориями риска по заболеваемости ВГВ являются город Бишкек 23,8%, Ошская область 16%, Чуйская область 13,7% и Джалал-Абадская область 13,1%. По остальным регионам доля регистрируемого ВГВ составляет 3,6% в Нарынской области до 10,6% в городе Ош. В настоящее время группами риска являются взрослые, доля которых варьирует от 91,2% 2009 до 98,0% в 2017 году. Гендерное распределение ВГВ характеризуется преимущественной заболеваемостью мужчин, доля которых составляет от 58,7% в 2017 году до 65,1% в 2018 году. Охват прививками в Республике в период введения вакцинации составлял 97%, который в 2018 году снизился до 67,5% с колебанием по регионам от 63,5% в Джалал-Абадской области до 72,9% в городе Ош.

Серологические исследования детей на наличие поствакцинального иммунитета показали, что из 182 обследованных детей 56% оказались серонегативными, при этом наибольшее число

серонегативных в возрасте 10–14 лет – 85,1%, от 1–4 лет – 53,8%, 0 до 1 года – 40,7% и у 5–9 летних – 27,2%. Доля серопозитивных самая высокая в возрастной группе 5–9 лет – 72,8%. У лиц 0–1 года она составляет 59,3% и у 1–4 лет – 46,2%. При этом от общего числа обследованных лица с высоким содержанием антител (400–1000 мМЕ/мл) составили 6,6%, у 9,9% они были от 100–400 мМЕ/мл и у 27,5% выявлен низкий уровень антител 10–100 мМЕ/мл.

Таким образом, из обследованных 182 детей с наличием прививок по форме № 63 56% оказались серонегативными и только 44% серопозитивными, причём 27,5% составили лица, имеющие низкий уровень содержания антител. Полученные данные требуют необходимости мониторинга организации прививочной работы для выявления причин большой доли серонегативных среди привитых и динамики формирования поствакцинального иммунитета.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Информационный бюллетень СЭСЗН МЗ КР за 2000–2018 гг. [Newsletter of the sanitary epidemiological service and public health of Ministry of Health of Kyrgyz Republic during 2000–2018].
2. Отчетная форма № 1 МЗ КР 2009–2018 гг. [Reporting form № 1 of Ministry of Health of Kyrgyz Republic during 2009–2018].
3. Медицинская статистика. Под ред. Балбачан О.А. Б.: КРСУ, 2014. 160 с. [Medical statistics. Edited by Balbanchan O.A. B.: KRSU, 2014].

## EFFECT OF IMMUNIZATION ON THE INCIDENCE OF VIRAL HEPATITIS IN THE KYRGYZ REPUBLIC

© 2019 M. S. Niiazalieva\*, V. S. Toigombaeva, A. E. Mergenov, I. Sh. Aldjambaeva

\*E-mail: niyazalieva\_mira@mail.ru

Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic

Received: 11.07.2019. Accepted: 14.08.2019

The incidence of viral hepatitis in the population of the Kyrgyz Republic tends to decrease in the age groups of 0–14 years. The vaccination coverage of children varies from 80% in 2017–2018 to 97% in 2000–2005. Serological studies of children aged 0 to 14 years indicate that 56% of those examined were shown negative result, with the largest number being in the age group 10–14 years.

*Key words:* viral hepatitis B, incidence, vaccination coverage, post-vaccination immunity

### Authors:

**Toigombaeva V. S.**, Doctor of Medical Science, Professor, Head of the Department of General and Clinical Epidemiology, Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic;

**Niiazalieva M. S.**, ☒ PhD, Associate professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: niyazalieva\_mira@mail.ru;

**Mergenov A. E.**, PhD, Department of Family Medicine, Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic;

**Aldjambaeva I. Sh.**, PhD, Associate professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic.

## ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ В МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

© 2019 г. М. С. Ниязалиева<sup>1\*</sup>, В. С. Тойгомбаева<sup>1</sup>, С. Т. Карагулова<sup>2</sup>

\*E-mail: niyazalieva\_mira@mail.ru

<sup>1</sup>Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева,  
Бишкек, Кыргызская Республика;

<sup>2</sup>ГОУВПО «Кыргызско-Российский Славянский Университет»,  
Бишкек, Кыргызская Республика

Поступила: 11.07.2019. Принята: 15.08.2019

Заболеваемость медработников вирусным гепатитом В (ВГВ) варьирует от 2<sup>0</sup>/<sub>0000</sub> (2011 г.) до 42<sup>0</sup>/<sub>0000</sub> (2014 г.). Прививки против ВГВ медработникам проводятся на добровольной основе по схеме 0–1–6. Серологическое исследование на наличие поствакцинального иммунитета среди привитых медработников свидетельствует о серопозитивности у 74,7% с защитным титром антител от 10 до 200 МЕ/мл у 50,8%.

**Ключевые слова:** Вирусный гепатит В, медработники, иммунизация, поствакцинальный иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210007077-9

Адрес: 720020 Бишкек, ул. И. Ахунбаева № 92, Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева, Ниязалиева Мира Суеркуловна. Тел.: +996312565946, факс: +996312545854, +996772140412 (моб).

E-mail: niyazalieva\_mira@mail.ru

Авторы:

**Ниязалиева М. С.**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Тойгомбаева В. С.**, д.м.н., профессор-заведующая кафедрой общей и клинической эпидемиологии, Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Карагулова С. Т.**, к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и иммунологии ГОУВПО КРСУ, г. Бишкек, Кыргызстан.

Сохранение здоровья медицинских работников – залог успешного решения задач модернизации и развития здравоохранения. Среди предупредительных мер по снижению риска инфицирования вирусным гепатитом В медработников в процессе их профессиональной деятельности самым эффективным методом в отношении данного заболевания является иммунопрофилактика [1, 2].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили сыворотки крови медицинских работников (n=501) и данные официальной статистики заболеваемости медработников вирусными гепатитами форма № 18). Сыворотки исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением тест-системы ВекторБест AntiHBs IgG (Россия). Полученные результаты обрабатывали в системе Microsoft Excel, границу достоверности определяли при p=0,05 по шкале Фишера Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным официальной статистики за период с 2009 по 2018 год всего был зарегистрирован 51 случай вновь заболевших ВГВ среди медицинских работников по республике. В динамике за десятилетний период отмечается умеренная тенденция к снижению числа случаев заболеваемости ВГВ, с ежегодным темпом снижения 11,3%. В среднем ежегодно регистрировалось по 5 случаев ВГВ, минимально один случай в 2011 году и максимально 21 случай

в 2014 году. В большинстве своем заболевшие ВГВ являлись работниками стационаров (62%). Серологическое исследование сывороток крови медицинских работников методом ИФА говорит о серопозитивности в 74,4%, при этом титры антител от 10 до 100 мМЕ/мл имели 25,5%, 101–200 мМЕ/мл – 25,3%, 201–300 мМЕ/мл – 5,4%, 301–400 мМЕ/мл – 16,4% и 500 и выше – 2%. Следует отметить, что все они получали прививки против ВГВ по схеме 0–1–6. 25,3% обследованных медицинских работников документально привитые оказались серонегативными.

У лиц молодого возраста от 18 до 44 лет доля лиц с высоким уровнем AntiHBs IgG составила 25%. Удельный вес серопозитивных в этой же возрастной группе был 49,4%. В возрастной группе 45–60 лет доля с высоким уровнем антител составила 22,1%, а с низким уровнем 51,7%. У лиц 60 лет и старше уровни антител выявлялись только в титрах 10–100 и 101–200 мМЕ/мл.

Большая доля зараженности медицинских работников различных стационаров свидетельствует о том, что факторами риска являются нарушения при проведении гемоконтактных манипуляций, что согласуется с данными научных исследований, проведенные З. Ш. Нурматовым в 2008 г. и М. Б. Ырысовой в 2010 г. [3, 4]. Выявление низкого уровня антител у лиц пожилого возраста, по-видимому, связано с более длительным сроком между проведенной иммунизацией и забором крови на ИФА, что согласуется с данными Н. И. Шульгиной, которая отмечает, что 12–36 месяцев после последней прививки удельный вес серопозитивных сохраняется у 93,9%, через 3–6 лет – у 82,2%, а через 7 лет – у более 77,5% привитых теряют антитела [2].

Таким образом, полученные результаты указывают на необходимость проведения серологического мониторинга качества поствакциналь-

ного иммунитета у работающих лиц старшего возраста для определения возможности проведения бустер-иммунизации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Калинина З. П., Дарьина М. Г., Мовчан К. Н., Мамичева О. Ю., Гагаркина И. Б., Аверина Т. Я., Балабаш О. А., Ефимова Л. И., Потемкина И. В. О поствакцинальном иммунитете против вирусного гепатита В у медицинских работников Санкт-Петербурга. // Инфекция и иммунитет, 2015, Т-5, № 1, 89–92. [Kalinina Z. P., Dar'ina M. G., Movchan K. N., Gagarkina I. B., Averina T. Ya., Balabash O. A., Yefimova L. I., Potemkina I. V. Duration of postvaccinal immunity against hepatitis B in healthcare workers in St. Petersburg. Russian Journal of Infection and Immunity 2015, Vol. 5, № 1, pp/ 89–92].
2. Шульгина Н. И., Стасенко В. Л. Оценка длительности и напряженности поствакцинального гуморального иммунитета к гепатиту В у лиц декретированных групп. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011, № 1 (56), 68–73. [Shulgina N. I., Stasenko V. L. Assessment of Duration and Intensity of Post-vaccination Humoral Immunity to Hepatitis B Patients Decreed groups. 2011, № 1 (56), pp. 68–73].
3. Нурматов З. Ш. Эффективность вакцинопрофилактики гепатита В среди детей Кыргызской Республики. Автореферат дисс. на соискание уч. степени канд. мед. наук. 24 с. [Nurmatov Z. Sh. The efficacy of hepatitis B vaccine prevention among children of the Kyrgyz Republic. Abstract of Diss. For competition academic Degree of Candidate of Medical Sciences. 24p.].
4. Ырысова М. Б. Эпидемиологические особенности парентеральных вирусных инфекций у медицинских работников (на примере г. Бишкек) Автореферат дисс. на соискание уч. степени канд. мед. наук. 26 с. [Yrysova M. B. Epidemiological features of parenteral viral infections in health care workers (by the example of Bishkek) Abstract of Diss. for competition academic Degree of Candidate of Medical Sciences 26p.].

## INCIDENCE OF VIRAL HEPATITIS B IN HEALTH CARE WORKERS IN THE KYRGYZ REPUBLIC

© 2019 M. S. Niazaliev<sup>1\*</sup>, V. S. Toigombaeva<sup>1</sup>, S. T. Karagulova<sup>2</sup>

\*E-mail: niyazaliev\_mira@mail.ru

<sup>1</sup>Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic;

<sup>2</sup>Kyrgyz-Russian Slavic University, Bishkek, Kyrgyz Republic

Received: 11.07.2019. Accepted: 15.08.2019

The incidence of health care workers with viral hepatitis B (HBV) varies from 2<sup>0</sup>/<sub>0000</sub> (2011) to 42<sup>0</sup>/<sub>0000</sub> (2014). Vaccinations against HBV to health workers are conducted on a voluntary basis according to the scheme 0–1–6. Serological testing for the presence of immunity after immunization among vaccinated health workers indicates presence of immunity in 74.7% with a protective antibody titer from 10 to 200 IU / ml in 50.8%.

*Key words:* Viral hepatitis B, health care workers, immunization, post-vaccination immunity

### Authors:

**Niazaliev M. S.**, ☒ PhD, Associate professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic. **E-mail:** niyazaliev\_mira@mail.ru;

**Toigombaeva V. S.**, Doctor of Medical Science, Professor, Head of the Department of General and Clinical Epidemiology, Kyrgyz State Medical Academy named after I. K. Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyz Republic;

**Karagulova S. T.**, PhD, Associate professor of the Department of Epidemiology and Immunology, Kyrgyz Russian Slavic University, Bishkek, Kyrgyz Republic.

## ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ СПИНАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА У ПАЦИЕНТА С РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

© 2019 г. Н. Ю. Пономарева<sup>1\*</sup>, В. Г. Митьковский<sup>1,2</sup>, Е. Н. Ямпольская<sup>1</sup>, А. В. Кочетков<sup>1,2</sup>, В. В. Лазарев<sup>1</sup>

\*E-mail: [ponomarevanyu@ckbvl.net](mailto:ponomarevanyu@ckbvl.net)

<sup>1</sup>ФГБУЗ Центральная клиническая больница восстановительного лечения ФМБА России, Московская область, Россия;

<sup>2</sup>Академия постдипломного образования Федерального научно-клинического центра ФМБА России, Москва, Россия

Поступила: 19.07.2019. Принята: 26.08.2019

Представлен клинический случай острого нарушения спинального кровообращения у пациента с рецидивирующей герпес-вирусной инфекцией. Для выявления молекулярных и клеточных механизмов предрасположенности и реализации локальной сосудистой катастрофы, оценки прогноза, пациенту проведено генотипирование по панелям генов, продукты которых участвуют в процессах регуляции гемостаза и иммунного ответа. Выявлены полиморфизмы генов, детерминирующие (при сочетании неблагоприятных средовых факторов с избытком вирусных антигенов) иммуно-опосредованные нарушения гемостаза. На основе особенностей генотипа рекомендован персонализированный подход к лечению и реабилитации пациента с мониторингом коагулологических и иммунологических маркеров, индивидуализированным выбором антикоагулянтов, антиагрегантов и антифибринолитических препаратов.

**Ключевые слова:** персонализированный подход, биомаркер, молекулярная диагностика, вирусная инфекция, тромбоз, реабилитация

DOI: 10.31857/S102872210007078-0

**Адрес:** 141551, Московская область, Солнечногорский район, д. Голубое. ФГБУЗ Центральная клиническая больница восстановительного лечения ФМБА России, отделение персонифицированной медицины, Пономарева Наталия Юрьевна. Тел.: 8(495)5362112, 89164361232 (моб.).

**E-mail:** [ponomarevanyu@ckbvl.net](mailto:ponomarevanyu@ckbvl.net)

**Авторы:**

**Пономарева Н. Ю.**, к.м.н., врач-генетик, заведующий отделением персонифицированной медицины, ФГБУЗ ЦКБВЛ ФМБА России, Московская область, Россия;

**Митьковский В. Г.**, к.м.н., Главный врач ФГБУЗ ЦКБВЛ ФМБА России, Московская область, Россия; Доцент Академии постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия;

**Ямпольская Е. Н.**, Заместитель Главного врача ФГБУЗ ЦКБВЛ ФМБА России, Московская область, Россия;

**Кочетков А. В.**, д.м.н., профессор Академии постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России, Москва, Заместитель Главного врача по науке ФГБУЗ ЦКБВЛ ФМБА России, Москва, Россия;

**Лазарев В. В.**, к.м.н., Заведующий неврологическим отделением, заместитель главного врача по реабилитации в неврологии ФГБУЗ ЦКБВЛ ФМБА России, Московская область, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Применение персонифицированных подходов с оценкой генетических особенностей человека для управления состоянием здоровья и резервами организма сегодня оказывает существенное влияние на все направления медицины [1]. В клинической практике для диагностики, таргетного лечения, реабилитации и профилактики мультифакториальной патологии особенно важно уточнение молекулярно-клеточного патогенеза наследственно обусловленных нарушений регуляторных систем: гемостаза, иммунного ответа, обмена веществ, детоксикации и др. [2, 3].

**Цель:** выявление у пациента с острым нарушением спинального кровообращения полиморфизма генов, ассоциированных с факторами риска для определения механизма развития сосудистой катастрофы, оценки прогноза с выбором биомаркеров для профилактики тромбозов.

## МЕТОДЫ

Молекулярно-генетическое типирование од- нонуклеотидных полиморфизмов генов с при- менением полимеразной цепной реакции PCR- RT; трактовка на основе данных мета-анализов и полногеномного поиска ассоциаций геноти- пов с клиническими проявлениями (GWAS — Genome-Wide Association Studies); диагностика, лечение и реабилитация с использованием пер- сонализированных подходов, разработанных в ФМБА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Пациент 41 года, в семейном анамнезе ССЗ, с 35 лет впервые развилась герпес-вирусная ин- фекция с тяжелым течением, рецидивами до двух раз в год, которые проходили на фоне ле- чения противовирусным препаратом тамифлю; с 37 лет при обострениях прибавились длитель- ные интермиттирующие парестезии, онемение ног. Через семь дней после очередного обостре- ния развилась анурия, затем нижний парапарез с нарушением функции тазовых органов, чув- ствительности, двигательной активности, что было расценено как острое нарушение спиналь- ного кровообращения в бассейне артерии Дем- прож-Готтерона и через сутки в бассейне артерии Адамкевича. На фоне стационарного лечения отмечено улучшение процесса, на третьи сутки появилась двигательная активность, наруше- ния чувствительности в стадии регресса. Через два месяца поступил для реабилитации в невро- логическое отделение ФГБУЗ ЦКБВЛ ФМБА России. В отделении персонифицированной медицины в результате генотипирования у па- циента выявлены полиморфизмы генов GP1BA, ITGA2 (располагающие к тромбообразованию за счет увеличения адгезии и агрегации тром- боцитов); сочетанные полиморфизмы генов MTHFR, MTRR, MTR (определяющие нару- шение обмена фолатов с развитием гипергомо- цистеинемии, что увеличивает риск артериаль- ных и венозных тромбозов); полиморфизм гена PAI1 (ассоциированный со снижением актив- ности тромболитика); при исследовании набора генов иммунного ответа — выявлены полимор- физмы: гена провоспалительного цитокина IL8, ассоциированного с предрасположенностью к RS-вирусной инфекции; гена противовос- палительного цитокина IL10 с плейотропным

иммунорегуляторным действием (ассоциирован с активацией CD4<sup>+</sup> клеток типа Th1, иницииру- ющих локальное воспаление); гена CRP (с по- вышением в крови уровня С-реактивного белка (предиктор атеротромбоза и повышенного риска ССЗ); гена CCR2 (продукт которого -СС рецеп- тор хемокина 2 экспрессируется на многих клет- ках при воспалении, в т.ч. и на эндотелиоцитах) ассоциирован с риском инфаркта; гена FCGR2 (кодирует рецептор для Fc конца иммуноглобу- линов G, который — при избытке инфекцион- ных антигенов — определяет антиген-антитело- комплемент-опосредованную цитотоксичность, циркуляторный стаз, оседание иммунных ком- плексов на эндотелии микрососудов) — сниже- ние антитромбогенной, повышение прокоагу- лянтной активности [4].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленные особенности генотипа пациен- та позволяют объяснить патогенез нарушений гемостаза, обусловленных действием иммунных факторов; персонализировать терапевтические подходы и профилактику повторных случаев нарушения кровообращения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. *Уйба В. В.* Основные перспективы организации оказания персонифицированной медицинской помощи в системе Федерального медико-биоло- гического агентства. // Медицина экстремальных ситуаций. 2015: № 2 С.: 77–79 [*Uyba V. V.* The main prospects of the organization of rendering the personi- fied medical care in the system of Federal Medical Bio- logical Agency// Medicine of extreme situations. 2015: № 2 P.: 77–79]
2. *Хаитов Р. М., Алексеев Л. П., Кофиади И. А.* Роль иммуногенетики в решении фундаментальных и прикладных задач персонализированной ме- дицины. // Медицина экстремальных ситуаций. 2016: № 3 С.: 9–24. [*Khaitov R. M., Alexeev L. P., Ko- fiadi I. A.* Role of immunogenetics in solving of funda- mental and applied tasks of personalized medicine// Medicine of extreme situations. 2016: № 3 P.: 9–24]
3. *Simmonds R. E., Hermida J., Rezende S. M. et al.* Haemostatic genetic risk factors in arterial thrombosis. // *Thromb Haemost* 2001; 86 (1): p.374–85.
4. Система цитокинов. Теоретические и клинические аспекты. Сборник трудов./ Под ред. В. А. Козлова, С. В. Сенникова. — Новосибирск: «Наука» 2004. — стр.324 [System of cytokines. Theoretical and clinical aspects. Collection of works. / Under the editorship of V. A. Kozlov, S. V. Sennikov. — Novosibirsk: “Science” 2004: p. 324]

## GENETICALLY CAUSED MOLECULAR MECHANISMS OF DEVELOPMENT OF THE SPINAL STROKE IN THE PATIENT WITH THE PERSISTENT VIRAL INFECTION

© 2019 N. Yu. Ponomareva<sup>1\*</sup>, V. G. Mitkovsky<sup>1,2</sup>, E. N. Yampolskaya<sup>1</sup>,  
A. V. Kochetkov<sup>1,2</sup>, V. V. Lazarev<sup>1</sup>

\*E-mail: ponomarevanyu@ckbvl.net

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Healthcare Institution Central Clinical Hospital of Rehabilitation  
Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Academy of post-degree formation Federal scientific clinical center of Federal Medical Biological  
Agency of Russia of Russia, Moscow, Russia

Received: 19.07.2019. Accepted: 26.08.2019

The clinical case of an acute disorder of spinal blood circulation at the patient with often recurrent herpes-viridae infection is provided. For identification of molecular and cellular mechanisms of predisposition and realization of local vascular accident, forecast assessment, to the patient genotyping on panels of genes which products participate in processes of regulation of a hemostasis and immune response is carried out. The polymorphisms of genes determining (at a combination of adverse environmental factors there are a lot of viral antigens) the immune mediated disturbances of a hemostasis are revealed. On the basis of features of a genotype the personalized approach to treatment and rehabilitation of the patient with the monitoring the koagulologicheskikh and immunological markers individualized by the choice of anticoagulants, antiagregant and anti-fibrinolytic drugs is recommended.

**Key words:** the personalized approach, molecular diagnostics, biomarker, thrombosis, a viral infection, a rehabilitation

### Authors:

**Ponomareva N. Yu.**, ✉ PhD, the doctor geneticist managing office of the personalized medicine Federal State Budgetary Healthcare Institution Central Clinical Hospital of Rehabilitation Medical Biological Agency of Russia, Moscow region, Russia.

**E-mail:** ponomarevanyu@ckbvl.net;

**Mitkovsky V. G.**, PhD, Chief physician of Federal State Budgetary Healthcare Institution Central Clinical Hospital of Rehabilitation Medical Biological Agency of Russia, Moscow region, Russia; Associate professor Academy of post-degree formation Federal scientific clinical center of Federal Medical Biological Agency of Russia of Russia, Moscow, Russia;

**Yampolskaya E. N.**, Deputy Chief physician of Federal State Budgetary Healthcare Institution Central Clinical Hospital of Rehabilitation Medical Biological Agency of Russia, Moscow region, Russia;

**Kochetkov A. V.**, MD, Deputy Chief physician for science Federal State Budgetary Healthcare Institution Central Clinical Hospital of Rehabilitation Medical Biological Agency of Russia, Moscow region, Russia; professor of Academy of post-degree formation Federal scientific clinical center of Federal Medical Biological Agency of Russia of Russia, Moscow, Russia;

**Lazarev V. V.**, PhD, the Manager of neurologic office, the deputy chief physician for rehabilitation in neurology of Federal State Budgetary Healthcare Institution Central Clinical Hospital of Rehabilitation Medical Biological Agency of Russia, Moscow region, Russia.

## ДИНАМИКА УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СТАТИНОВ

© 2019 г. О. А. Радаева<sup>1\*</sup>, А. С. Симбирцев<sup>2,1</sup>, Ю. А. Костина<sup>1</sup>,  
М. С. Искандярова<sup>1</sup>

\*E-mail: radaevamed@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет  
им. Н. П. Огарева», Саранск, Россия

<sup>2</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт соболических биопрепаратов»  
ФМБА России, Санкт-Петербург

Поступила: 14.07.2019. Принята: 21.08.2019

Цель исследования – изучить динамику содержания IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1ra, IL-18, IL-18BP, IL-37, IL-6, sIL-6r, LIF, sLIFr, IGF-1, TNF- $\alpha$ , sTNF-RI, IL-17, IL-2, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1, IL-8, CX3CL1, CXCL10, INF $\gamma$ , M-CSF, IL-34, VEGF-A, EPO в сыворотке крови у больных с метаболическим синдромом (МС) при применении статинов. Применение статинов в течение 6 месяцев у больных с МС характеризуется снижением M-CSF до 399 [375–440] пг/мл ( $p < 0,001$ ) с вторичным увеличением концентрации протективного фактора – сертуина-1 ( $p < 0,001$ ) и ЛПВП, что блокирует прогрессирование атеросклеротических процессов, но при концентрации M-CSF в интервале [395–454] пг/мл отменяется его стимулирующее влияние на синтез VEGF-A, что соотносится со снижением выраженности коронарных коллатералей и сохраняет высокий риск развития инфаркта миокарда (возможно, что данный эффект нивелируется при применении статинов более 6 месяцев). Полученные данные доказывают актуальность долгосрочных исследований в данном направлении.

**Ключевые слова:** метаболический синдром, цитокины, статины

DOI: 10.31857/S102872210007079-1

Адрес: 430000 Саранск, ул. Ульянова, д. 26а, ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева», кафедра иммунологии, микробиологии и вирусологии. Радаева Ольга Александровна. Тел./факс: +7(8342) 321983, 89053784198 (моб.)

E-mail: radaevamed@mail.ru

Авторы:

**Радаева О. А.**, к. м. н., доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО «НИ МГУ им. Н. П. Огарева», Саранск, Россия;

**Симбирцев А. С.**, член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор, научный руководитель ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург;

**Костина Ю. А.**, к. м. н., доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «НИ МГУ им. Н. П. Огарева», Саранск, Россия;

**Искандярова М. С.**, ассистент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «НИ МГУ им. Н. П. Огарева», Саранск, Россия.

Статины являются ингибиторами 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоЭа-редуктазы и используются в течение 30 лет для профилактики инфаркта миокарда и инсульта, как за счет снижения липо-

протеинов низкой плотности (ЛПНП), так и роста липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [1]. На сегодняшний день актуальны исследования, анализирующие плеiotропные и иммуномодулирующие эффекты действия статинов [2].

**Цель исследования** – изучить динамику содержания IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1ra, IL-18, IL-18BP, IL-37, IL-6, sIL-6r, LIF, sLIFr, IGF-1, TNF- $\alpha$ , sTNF-RI, IL-17, IL-2, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1, IL-8, CX3CL1, CXCL10, INF $\gamma$ , M-CSF, IL-34, VEGF-A, EPO в сыворотке крови у больных с метаболическим синдромом (МС) при применении статинов в течение 6 месяцев.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У 200 пациентов с ЭАГ II стадии на момент начала исследования, через 5 лет наблюдения и через 6 месяцев применения статинов (у 65 больных, с сформировавшимся за время наблюдения МС), иммуноферментным мето-



дом в сыворотке крови определяли содержание цитокинов, уровни глюкозы, ТГ, ЛПНП, ЛПВП. Критерии включения в исследование: ЭАГ II стадии (без МС), сопоставимые: возраст, длительность ЭАГ и терапия. В течение последующих 5 лет регистрировали развитие МС на основе индекса массы тела, уровней глюкозы, ЛПНП, ЛПВП и др., что позволило сформировать 2 группы: 1 – больные ЭАГ II стадии без МС (135 человек) и 2 – с сформировавшимся за 5 лет наблюдения МС (65 человек), которые в последующем принимали статины.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью StatSoft Statistica 10.0. Данные представлены: медиана и персентили [ $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ]. При сравнении показателей использовали критерий Вилкоксона или парный  $t$ -критерий Стьюдента, корреляционный анализ Спирмана или Пирсона в зависимости от распределения показателей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление «стартовых» уровней цитокинов сыворотки крови больных ЭАГ II стадии в зависимости от формирования МС в последующие 5 лет, а также проведение многофакторного регрессионного анализа, доказали у двух из 28 анализируемых цитокинов предикторные связи с изменением частоты формирования МС: содержание М-CSF более 453 пг/мл определял рост риска развития МС в 3,5 раза ( $p < 0,001$ ), а IGF-1 при концентрации более 116000 пг/мл – снижение в 2,14 раза ( $p < 0,01$ ). Важно отметить, что уровень М-CSF у больных ЭАГ при формировании МС в период наблюдения увеличивался с 389 [328–442] пг/мл до 549 [470–626] пг/мл ( $p < 0,001$ ), а в интервале (389–454) пг/мл независимо коррелировал с ростом в крови концентраций резистина и фетуина-А ( $r = 0,71$  и  $r = 0,79$ ,  $p < 0,01$ ), выступая одним из компонентов прогрессирования метаболические нарушения в виде увеличения ЛПНП ( $r = 0,68$  и  $r = 0,71$ ,  $p < 0,01$ ) и снижения толерантности к глюкозе; при увеличении М-CSF в крови более 454 пг/мл дополнительно формируются патогенетические связи в виде уменьшения количественных характеристик сиртуина-1 ( $r = 0,71$ ,  $p < 0,01$ ) и блока его протективных свойств. Применение в течение 6 месяцев препарата из группы статинов у больных с МС характеризовалось уменьшением ЛПНП ( $p < 0,001$ ) на фоне роста ЛПВП ( $p < 0,001$ ) с изменением содержания 3 цитокинов из 28 анализируемых. Зарегистрировано снижение М-CSF до

399 [375–440] пг/мл ( $p < 0,001$ ) и VEGF-A до 254 [192–310] пг/мл, ( $p < 0,001$ ) с вторичным ростом сертуина-1 ( $p < 0,001$ ), но без динамики уровней резистина и фетуина-А ( $p > 0,05$ ); также отмечено увеличение содержания IL-34 ( $p < 0,01$ ), ассоциированного по нашим данным, со снижением риска развития инсульта [3]. В ходе проведенного 10-летнего исследования доказана связь содержания М-CSF в крови в интервале [389–453] пг/мл и увеличения риска развития инфаркта миокарда в 3,4 раза ( $p < 0,01$ ) при сравнении с больными ЭАГ при концентрации М-CSF менее 389 пг/мл и более 453 пг/мл [3].

Получены данные о «быстрых» цитокин-ориентированных эффектах действия статинов у пациентов с ЭАГ и сформировавшимся МС. После 6 месяцев применения препарата из группы статинов в крови снижается уровень М-CSF со вторичным блокированием линии прогрессирования МС (М-CSF – снижение сертуина-1 – рост ЛПНП) на фоне роста IL-34 с увеличением адипонектина и ЛПВП, что является компонентом замедления атеросклеротических процессов. Но при концентрации М-CSF менее 454 пг/мл отменяется его стимулирующее влияние на синтез VEGF-A (эффект по данным литературы описан как потенциально дозозависимый [4]), что по результатам коронарографии соотносится со снижением выраженности коронарных коллатералей и потенциально сохраняет высокий риск развития инфаркта миокарда. Возможно, что при длительном применении статинов и динамичном снижении М-CSF пациенты перейдут в группу М-CSF менее 389 пг/мл и тем самым нивелируется выявленный неблагоприятный эффект. Полученные результаты доказывают актуальность долгосрочных исследований в данном направлении и значимость понимания вариативности цитокинзависимых линий при реализации эффектов действия статинов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Oesterle A., Laufs U., Liao J. K. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res*; 2017; 120(1), 229–243.
2. Zeiser R. Immune modulatory effects of statins. *Immunology*. 2018;154(1), 69–75.
3. Радаева О. А., Симбирцев А. С. М-CSF, IL-34, VEGF-A как факторы риска развития инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения у больных эссенциальной артериальной гипертензией. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(18). № 1, 93–101. [Radaeva O. A., Simbirtsev A. S. M-CSF, IL-34, VEGF-A as risk fac-

- tors of myocardial infarction and stroke in patients with essential hypertension. Russian Journal of Immunology. 2015; 9(18). № 1, 93–101.
4. Okazaki T., Ebihara S., Asada M., Yamada S., Saijo Y., Shiraishi Y., Ebihara T., Niu K., Mei H., Yam-

be T. Macrophage colony-stimulating factor improves cardiac function after ischemic injury by inducing vascular endothelial growth factor production and survival of cardiomyocytes. Am. J. Pathol. 2007; 171, 1093–1103.

## DYNAMICS OF CYTOKINE LEVELS IN BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME USING STATINS

© 2019 O. A. Radaeva<sup>1\*</sup>, A. S. Simbirtsev<sup>2</sup>, Yu. A. Kostina<sup>1</sup>, M. S. Iskandiarova<sup>1</sup>

\*E-mail: radaevamed@mail.ru

<sup>1</sup>National Research Mordovia State University, Saransk, Russia;

<sup>2</sup>State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA, St. Petersburg, Russia

Received: 14.07.2019. Accepted: 21.08.2019

The purpose of this research is to study the dynamics of the content in serum of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1ra, IL-18, IL-18BP, IL-37, IL-6, sIL-6r, LIF, sLIFr, IGF-1, TNF- $\alpha$ , sTNF-RI, IL-17, IL-2, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1, IL-8, CX3CL1, CXCL10, INF $\gamma$ , M-CSF, IL-34, VEGF-A, EPO in patients with metabolic syndrome (MS) using statins. The use of statins for 6 months in patients with MS is characterized by a decrease in M-CSF to 399 [375–440] pg / ml ( $p < 0.001$ ) with a secondary increase in the concentration of the protective factor – sertiuna-1 ( $p < 0.001$ ) and HDL, that blocks progression of atherosclerotic processes. The concentration of M-CSF in the range [395–454] pg / ml cancels its stimulating effect to synthesis of VEGF-A and slows the growth of coronary collaterals that maintaining a high risk of myocardial infarction (this effect is leveled when using statins for more than 6 months). The data obtained confirm the relevance of further research in this direction.

*Key words:* metabolic syndrome, cytokines, statins

### Authors:

**Radaeva O. A.**, ✉ PhD, docent of chair of Immunology, Microbiology, Virology, National Research Mordovia State University, Saransk, Russia. E-mail: radaevamed@mail.ru;

**Simbirtsev A. S.**, RAS Corresponding Member, DMedSci, Professor, Scientific Supervisor of State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia;

**Kostina Yu. A.**, PhD, docent of chair of Immunology, Microbiology, Virology, National Research Mordovia State University, Saransk, Russia;

**Iskandiarova M. S.**, assistant of chair of Immunology, Microbiology, Virology, National Research Mordovia State University, Saransk, Russia.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНФЛИКСИМАБА У ДЕТЕЙ С ВЗК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЦИТОКИНОВ И КОНЦЕНТРАЦИИ ПРЕПАРАТА

© 2019 г. Т. В. Радыгина<sup>1\*</sup>, А. С. Илларионов<sup>1</sup>, Д. Г. Герасимова<sup>1</sup>,  
А. О. Анушенко<sup>1</sup>, Ю. А. Комах<sup>2</sup>, А. С. Потапов<sup>1</sup>, С. В. Петричук<sup>1</sup>,  
А. П. Фисенко<sup>1</sup>

\*E-mail: [Radygina.TV@nczd.ru](mailto:Radygina.TV@nczd.ru)

<sup>1</sup>ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей»  
Минздрава РФ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова»  
Минздрава РФ, Москва, Россия

Поступила: 10.07.2019. Принята: 14.08.2019

В работе проведена оценка циркулирующих в крови провоспалительных и воспалительных цитокинов и получен уровень cut-off для TNF, IL-22, IL-23, IL-27, INF $\gamma$  между группами детей в обострении и ремиссии на фоне лечения инфликсимабом. Показано достоверное снижение остаточного уровня препарата в сыворотке крови у детей в обострении по сравнению с группой детей в ремиссии как для ЯК, так и для БК. Выявлено, что чем меньше возраст ребенка, тем быстрее образуются антитела к инфликсимабу. Уровень TNF, остаточный уровень инфликсимаба, а также уровень антител к инфликсимабу могут служить предикторами неотвечаемости и потери эффекта от терапии блокаторами TNF.

**Ключевые слова:** инфликсимаб, остаточный уровень инфликсимаба, блокаторы фактора некроза опухоли, болезнь Крона, язвенный колит

DOI: 10.31857/S102872210007080-3

**Адрес:** 119991 Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр 1, ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Минздрава РФ, лаборатория экспериментальной иммунологии и вирусологии. Радыгина Татьяна Вячеславовна. Тел./факс: 8(499)1341398, 89104218854 (моб.).  
**E-mail:** [Radygina.TV@nczd.ru](mailto:Radygina.TV@nczd.ru)

**Авторы:**

**Радыгина Т. В.**, к.м.н., ст.н.с., и.о. заведующего лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Илларионов А. С.**, аспирант гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Герасимова Д. Г.**, ординатор 2 года Лабораторного отдела, лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Анушенко А. О.**, врач-педиатр гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Комах Ю. А.**, к.м.н., заведующий лабораторией трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и

прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Потапов А. С.**, д.м.н., гл. н. сотрудник лаборатории разработки новых технологий диагностики и лечения болезней детского возраста ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Петричук С. В.**, д.б.н., гл. н. сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Фисенко А. П.**, д.м.н., директор ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», Минздрава РФ, Москва, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Блокаторы фактора некроза опухоли являются основой современной терапии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) тяжелой и средней степени тяжести у детей. Известно, что к году терапии у 50% детей наблюдается потеря эффекта от инфликсимаба (INF). Выяв-

ление предикторов неотвечаемости и потери эффекта поможет вовремя скорректировать терапию и предотвратить неэффективность INF. По разным данным, уровень остаточного инфликсимаба (Q-IFX) варьирует от 3 до 7 мкг/мл и коррелирует с состоянием клинической и эндоскопической ремиссией [1, 2]. Мониторинг Q-IFX позволяет уменьшить риск потери эффекта от терапии, а также снизить вероятность образования антител к INF.

**Цель исследования.** Оценить информативность различных маркеров, включающих остаточный уровень инфликсимаба, антител к нему и циркулирующих цитокинов в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплексное обследование 87 детей с ВЗК в возрасте 4–18 лет на фоне терапии INF – 31 пациент с язвенным колитом (ЯК) и 44 пациента с болезнью Крона (БК). Клиническая активность оценивалась с помощью индексов PUCAI (ЯК) и индекса PCDA (БК). Образцы крови были взяты через 8 недель после последней инфузии INF. Остаточный уровень IFX и антитела к IFX (АТ) оценивали иммуноферментным методом с помощью наборов MATRIKSBIOTEK (Турция) в сыворотке крови. Уровень цитокинов измеряли мультиплексным анализом, используя HumanTh17 MagneticBeadPanel (Merck, США). Статистическую обработку проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и ROC-анализа.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пациенты с БК и с ЯК были разделены на 2 группы. 1 группу составили дети со стойким положительным эффектом на фоне INF (ремиссия), 2 группу составили дети в обострении. Анализ уровня цитокинов выявил достоверные отличия между группами по уровню следующих провоспалительных цитокинов: IL-22, IL-23, IL-27, INF $\gamma$ , TNF. Проведенный ROC анализ показал хорошее качество разделительной модели для TNF с уровнем cut-off 13,4 pg/ml (AUC=0,843; Se 77%, Sp 79%) для БК и ЯК. У детей в обострении наблюдалось достоверное снижение Q-IFX в сыворотке крови по сравнению с группой де-

тей в ремиссии для ЯК ( $p=0,0007$ ) и для БК ( $p=0,0004$ ). Медианы по группам для БК и ЯК составили следующие значения: в 1 группе детей с БК Med=0,53 [0,22 + 1,8] мкг/мл, во 2 группе Med=3,75 [2,44 + 6,44] мкг/мл; в 1 группе детей с ЯК Med=0,45 [0,28 + 1,79], во 2 группе Med=3,9 [1,48 + 6,0]. В группах детей в обострении как для БК, так и для ЯК наблюдалось достоверное увеличение активности воспалительного процесса по индексам PUCAI и PCDA ( $p=0,001$ ). В результате ROC-анализа были получены уровни cut-off для пациентов с БК и ЯК, которые составили 2,21 мкг/мл для БК и 2,55 мкг/мл для ЯК. Антитела к IFX были выявлены всего в 17% случаев. И хотелось бы отметить, что чем меньше был возраст ребенка, тем быстрее образовывались АТ ( $r=0,58$ ).

Потерю эффекта от терапии блокаторами TNF и обострение ВЗК можно ожидать при снижении Q-IFX в сыворотке крови у детей с ЯК ниже 2,55 мкг/мл, а у детей с БК – ниже 2,21 мкг/мл. Своевременное мониторирование остаточного уровня инфликсимаба в крови пред инфузией позволит провести коррекцию дозы и кратности введения препарата и сможет снизить риск потери эффекта от терапии. В качестве маркера потери эффекта от IFX может также выступать уровень TNF > 13,4 pg/ml. Повышенный уровень провоспалительных цитокинов, в частности TNF, коррелирует с более низким остаточным уровнем IFX и потерей эффекта от терапии. Дети младшего возраста требуют динамического контроля остаточного уровня IFX и антител для назначения своевременной корригирующей терапии.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ungar B., Levy I., Yavne Y., Yavzori M., Picard O., Fudim E., Loebstein R., Chowers Y., Eliakim R., Kopylov U., Ben-Horin S. Optimizing Anti-TNF- $\alpha$  Therapy: Serum Levels of Infliximab and Adalimumab Are Associated With Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:550–7.
2. Hanauer S.B., Wagner C.L., Bala M., Mayer L., Travers S., Diamond R.H., Olson A., Bao W., Rutgeerts P. Incidence and importance of antibody response to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:542–53. treatment in Crohn's disease.

**THE EFFECTIVENESS OF INFLIXIMAB IN CHILDREN WITH IBD,  
DEPENDING ON THE LEVEL OF CIRCULATING CYTOKINES  
AND THE CONCENTRATION OF THE DRUG**

© 2019 **T.V. Radygina<sup>1\*</sup>, A. S. Illarionov<sup>1</sup>, D. G. Gerasimova<sup>1</sup>, A. O. Anushenko<sup>1</sup>,  
Y. A. Komakh<sup>2</sup>, A. S. Potapov<sup>1</sup>, S. V. Petrichuk<sup>1</sup>, A. P. Fisenko<sup>1</sup>**

*\*E-mail: Radygina.TV@nczd.ru*

*<sup>1</sup>National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia;*

*<sup>2</sup>The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russia*

**Received:** 10.07.2019. **Accepted:** 14.08.2019

In this study, we assessed the blood circulating proinflammatory and inflammatory cytokines and obtained the cut-off level for TNF, IL-22, IL-23, IL-27 between groups of children in exacerbation and remission during treatment with infliximab. There was a significant decrease in serum IFN in children in exacerbation compared with the group of children in remission for both UC and CD. It was found that the younger the age of the child, the faster the antibodies to infliximab were formed. The level of TNF in the blood, the residual level of infliximab, as well as the level of antibodies to infliximab can serve as predictors of non-response and loss of effect from therapy with TNF blockers.

*Key words:* infliximab, residual infliximab level, tumor necrosis factor blockers, Crohn's disease, ulcerative colitis

**Authors:**

**Radygina T. V.**, ✉ Ph.D. (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia. **E-mail:** Radygina.TV@nczd.ru;

**Illarionov A. S.**, PhD student of the Gastroenterological department with hepatological group. National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia;

**Gerasimova D. S.**, intern of the Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia;

**Anushenko A. O.**, pediatrician of the Gastroenterological department with hepatological group, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia;

**Komakh Y. A.**, PhD, Head of the Transplantology and Cellular Biology Laboratory, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Autonomous Institution, Moscow, Russia;

**Petrichuk S. V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology. National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia;

**Fisenko A. P.**, Head of the National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia.

## НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА ВЕРТИКАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

© 2019 г. Е. С. Романова\*, О. М. Филипович, Н. И. Кузнецов

\*E-mail: asrom@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 24.07.2019. Принята: 30.08.2019

Сведения о внутриутробном инфицировании плода и перинатальной передаче вируса гепатита С носят противоречивый характер и нуждаются в дальнейшем изучении. Существует множество факторов, которые могут увеличить риск перинатального инфицирования ВГС, такие как вирусная нагрузка, акушерские факторы, способы родоразрешения. Целью нашей работы была оценка риска перинатальной трансмиссии вируса гепатита С у детей, рожденных женщинами с ХГС, и возможности профилактики перинатального инфицирования ВГС.

**Ключевые слова:** перинатальное инфицирование, вирусный гепатит С

DOI: 10.31857/S102872210007081-4

**Адрес:** Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41, кафедра инфекционных болезней, Романова Елена Сергеевна.

Тел: +79117387920; **E-mail:** asrom@yandex.ru

**Авторы:**

**Романова Е. С.**, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Филипович О. М.**, ассистент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Кузнецов Н. И.**, д.м.н., профессор, профессор кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Инфекция, связанная с вирусом гепатита С (ВГС), остается одной из основных глобальных проблем здравоохранения. Распространенность в мире ВГС составляет от 1% до 8% у беременных женщин и от 0,05% до 5% у детей. Эпидемиологические критерии передачи ВГС от матери ребенку в настоящее время остаются неясными, и нет четкого понимания, что снижает вертикальный риск передачи инфекции. В большинстве исследований показано, что наиболее важным фактором риска является материнская вирусная нагрузка [1, 2] и именно она коррелирует с риском внутриутробного инфицирования.

Сведения о внутриутробном инфицировании плода и перинатальной передаче вируса гепатита С носят противоречивый характер и нуждаются в дальнейшем изучении.

**Цель исследования.** Оценка риска перинатальной трансмиссии вируса гепатита С у детей, рожденных женщинами с ХГС, и возможности профилактики перинатального инфицирования ВГС.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось 114 беременных женщин с ХГС. Родоразрешение у 67 женщин осуществлялось естественным путем, у 47 – плановым кесаревым сечением. Кроме того, было обследовано 97 детей рожденных от матерей с ХГС. 50 младенцев родились с помощью естественного родоразрешения, а 47 – планового кесарева сечения.

Подтверждение ВГС-инфекции осуществлялось обнаружением анти-ВГС антител методом иммуноферментного анализа (ИФА), а также выявлением РНК вируса гепатита С в сыворотке крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Кроме того, было проведено иммуногистохимическое исследование плаценты, с целью выявления антигенов вируса гепатита С. Забор материала проводился сразу после

родов. Иммуногистохимические (ИГХ) исследования выполнялись с применением мышиных моноклональных антител к NS3-антигену вируса гепатита С (в разведении 1/80, Novocastra Lab., Великобритания), который является неструктурным белком, отвечающим за репликативную активность ВГС и его обнаружение косвенно указывает на возможность репликации вируса в исследуемых тканях и позволяет говорить о возможности их инфицирования. Исследование проводилось с использованием ИГХ полимерной системы визуализации LabVision Quanto и аппарата для иммуногистохимического и иммуноцитохимического окрашивания Autostainer A360 (Thermo, Германия).

У детей, рожденных от матерей с хронической ВГС-инфекцией, проводилось выявление РНК ВГС методом ПЦР в крови в возрасте 6–9 месяцев, а также 18–20 месяцев, с целью выявления их инфицирования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что во время беременности большое количество вируса достигает плаценты и может вызывать воспалительные изменения, приводя к высвобождению воспалительных цитокинов и активизируя иммунный ответ матери. Нами были выявлены воспалительные изменения в плаценте 111 женщин из 114 обследованных (97,37%). Для исключения взаимосвязи инфицирования детей и наличия воспалительных изменений в плаценте матери, мы провели сравнительный анализ данных значений, но выявить достоверную закономерность нам не удалось. Так, воспалительные процессы в плаценте были выявлены у 111 женщин, а инфицирование детей, то есть выявление в их сыворотке РНК ВГС, определялось лишь у трех из всех рожденных детей.

Известно, что наличие инфицированной плаценты может являться фактором, способствующим вертикальной передаче вируса гепатита С. Мы обследовали плаценты, включенных в исследование женщин на наличие NS3ВГС и определили, что частота выявления инфицированности плаценты составила 85,9%, то есть NS3ВГС выявлялся у 98 женщин из 114. Закономерно было предположить, что инфицированность плаценты может приводить к риску перинатальной передачи ВГС, однако проведенный анализ показал, что инфицирование плаценты не привело к инфицированию ВГС детей, рожденных от этих матерей. Из всех обследован-

ных детей, рожденных от матерей с детекцией NS3ВГС в плаценте, лишь у двоих (0,02%) выявлялась РНК ВГС, что свидетельствовало о наличии ВГС-инфекции ( $\chi^2=3,932$ ;  $p=0,047$ ).

Как указывалось выше, особое значение в перинатальной передаче вируса отводится уровню вирусной нагрузки ВГС. В ходе нашей работы мы изучили зависимость инфицирования плаценты от уровня вирусной нагрузки. Нам удалось установить, что частота инфицирования плаценты зависит от уровня вирусной нагрузки ВГС. Так в группе беременных, у которых была обнаружена инфицированная плацента, уровень вирусной нагрузки был достоверно выше и составил  $6,40 \log_{10}$  (ВН РНК НСV), по сравнению со значением этого показателя в группе беременных с неинфицированной плацентой  $4,14 \log_{10}$  (ВН РНК НСV) ( $p<0,001$ ).

Остается спорным вопрос о способе разрешения женщин с ХГС и целесообразности планового кесарева сечения. В нашем исследовании из всей группы детей было выявлено 3 инфицированных ребенка, рожденных естественным путем ( $n=50$ ). В группе детей, рожденных при плановом кесаревом сечении ( $n=47$ ) инфицированных детей обнаружено не было. Причем, следует отметить, что при сравнительном анализе групп исследования в зависимости от уровня вирусной нагрузки. Он был выше в группе беременных с плановым кесаревым сечением –  $6,4$  ВН ВГС РНК ( $\log_{10}$ ) по сравнению с  $5,8$  ВН ВГС РНК ( $\log_{10}$ ) у женщин с естественными родами ( $p=0,044$ ).

Таким образом, полученные результаты говорят об отсутствии взаимосвязи между воспалительными изменениями плаценты и риском перинатального инфицирования ВГС. В то время как уровень вирусной нагрузки влияет на инфицированность плаценты ВГС и является ведущим фактором в инфицировании плода. Кесарево сечение может быть потенциально защитной мерой профилактики вертикальной передачи ВГС от матери к ребенку.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Mavilia M. G., Wu G. Y.* Mechanisms and Prevention of Vertical Transmission in Chronic Viral Hepatitis. *J Clin Transl Hepatol.* 2017 Jun 28;5(2):119–129. doi: 10.14218/JCTH.2016.00067. Epub 2017 Jun 7.
2. *Chun-Yan Yeung, Hung-Chang Lee, Wai-Tao Chan, Chun-Bin Jiang, Szu-Wen Chang, and Chih-Kuang Chuang.* Vertical transmission of hepatitis C virus: Current knowledge and perspectives *World J Hepatol.* 2014 Sep 27; 6(9): 643–651.

## SOME RISK FACTORS VERTICAL TRANSMISSION OF VIRAL HEPATITIS C

© 2019 E. S. Romanova\*, O. M. Filipovich, N. I. Kuznetsov

\*E-mail: asrom@yandex.ru

North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Received: 24.07.2019. Accepted: 30.08.2019

Abstract information about intrauterine infection of the fetus and perinatal transmission of the hepatitis C virus are controversial and need further study. There are many factors that can increase the risk of perinatal HCV infection, such as viral load, obstetric factors, methods of delivery. The aim of our work was to assess the risk of perinatal transmission of the hepatitis C virus in children born to women with chronic hepatitis C and the possibility of preventing perinatal HCV infection.

*Key words:* perinatal infection, viral hepatitis C

### Authors:

**Romanova E. S.**, ✉ PhD associate professor of the Department of Infection Diseases of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia. **E-mail:** asrom@yandex.ru;

**Filipovich O. M.**, assistant of the Department of Infection Diseases of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia;

**Kuznetsov N. I.**, DsC professor of the Department of Infection Diseases of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia.



## К ВОПРОСУ ДИАГНОСТИКИ ДИСФУНКЦИИ ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТРОПОГЕННЫХ НАГРУЗОК

© 2019 г. В. В. Трошина<sup>1</sup>, Н. З. Зокиров<sup>1</sup>, В. Д. Гладких<sup>2\*</sup>

\*E-mail: Gladkich2007@rambler.ru

<sup>1</sup>Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия;  
<sup>2</sup>ФГУП Научно-производственный центр «Фармзащита» ФМБА России, Москва, Россия

Поступила: 15.07.2019. Принята: 27.08.2019

В настоящем сообщении рассматривается методологический подход к оценке дисфункции иммунитета у детей, проживающих на потенциально неблагоприятных экологических территориях, основанный на определении характера взаимосвязи переменных (определяемый аллельный вариант  $A_1A_1$  гена ФНО, содержание ФНО, ИЛ10, ИФН $\gamma$ , IgA) и формы зависимости (силы изменения одной переменной в ответ на изменение другой переменной) при повторно-определяемых параметрах состояния иммунного статуса.

**Ключевые слова:** дисфункция иммунитета, часто болеющие дети, экологическое неблагополучие

DOI: 10.31857/S102872210007082-5

### Авторы:

**Трошина В. В.**, к.м.н., доцент кафедры педиатрии Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия;

**Зокиров Н. З.**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой педиатрии Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия;

**Гладких В. Д.**, д.м.н., профессор, заместитель директора по науке ФГУП Научно-производственного центра «Фармзащита» ФМБА России, Москва, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Доля часто болеющих детей среди детского населения территорий, прилегающих к специализированным химическим производствам, является одной из приоритетных характеристик экологического благополучия региона. Неблагоприятное воздействие факторов антропогенной нагрузки, воздействующих на организм ребенка из среды обитания, проявляется не только увеличением числа респираторных инфекций среди детского населения, но и развитием дисфункции иммунитета и хронизацией синдромальных респираторных нарушений.

**Цель исследования:** разработка способа оценки дисфункции иммунитета с использованием чувствительной и специфичной совокупности критериев у детей с различными клиническими

вариантами течения повторной респираторной инфекции, проживающих на территориях, прилегающих к специализированному химическому производству.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении иммунного мониторинга часто болеющих детей в возрасте 4–6 лет ( $n = 481$ ) II группы здоровья, проживающих с момента рождения и до момента обследования на территориях, прилегающих к специализированному химическому производству в Кировской области, приоритетными считали: временные (возраст), пространственные (место и время проживания на декретированной территории), национальные (европейская популяция), нозологические (повторные респираторные инфекции с учетом числа ОРИ по возрастной норме), иммунные (аллельные варианты  $A_1$ ,  $A_2$  гена ФНО, содержание цитокинов ФНО, ИЛ10, ИФН $\gamma$ , IgA) показатели.

Включенные в исследование дети, в зависимости от места проживания, были разделены на 3 группы:

- первая группа детей ( $n = 149$ ) проживала в населенном пункте А, на расстоянии менее

5 км от специализированного химического производства;

- вторая группа детей ( $n = 156$ ) проживала в населенном пункте Б, на расстоянии более 20 км;

- третья группа детей ( $n = 176$ ) проживала в населенном пункте В, на расстоянии более 35 км от специализированного химического производства.

При обработке полученного материала использовали математический аппарат, включающий методы корреляционного и регрессивного анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении иммунологического мониторинга детского населения, проживающего в условиях воздействия потенциальных антропогенных нагрузок, установлено:

- при определяемом аллельном варианте  $A_1A_1$  гена ФНО и содержания ФНО более 30 пг/мл, ИЛ10 менее 20 пг/мл, ИФН $\gamma$  менее 12 пг/мл, IgA менее 1 г/л прогнозируется дисфункция иммунитета, сопровождающаяся повторными респираторными инфекциями, превышающими возрастную норму, и развитием синдромов гипертрофии миндалин и аденоидов разной степени выраженности, хронического аденоидита и хронического тонзиллита;

- при аллельном варианте  $A_1A_2$  содержание ФНО менее 40 пг/мл, ИЛ10 более 26 пг/мл, ИФН $\gamma$  более 40 пг/мл, IgA более 1.5 г/л прогнозируется благоприятное течение повторной респираторной инфекции без развития дисфункции иммунитета и формирования синдромальных (гипертрофия миндалин, гипертрофия

аденоидов) и нозологических проявлений (хронический аденоидит, хронический тонзиллит), повторных респираторных инфекций у детей.

Включение методов корреляционного и регрессивного анализа с определением характера взаимосвязи переменных (определяемый аллельный вариант  $A_1A_1$  гена ФНО, содержание ФНО, ИЛ10, ИФН $\gamma$ , IgA менее 1 г/л) и формы зависимости (силы изменения одной переменной в ответ на изменение другой переменной) при повторно-определяемых параметрах состояния иммунного статуса детей, проживающих в условиях вероятного экологического неблагополучия, позволяет исключить влияние антропогенной нагрузки на развитие дисфункции иммунитета. Предложенный, на основании проведенного исследования, методологический подход для оценки дисфункции иммунитета целесообразно применять у детей с различными вариантами течения повторных респираторных инфекций, проживающих в условиях антропогенной нагрузки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Мартынов А. И., Пинегин Б. В., Ярилин А. А. Оценка иммунного статуса человека в условиях воздействия химического и биологического фактора: Пособие/ под ред. Хаитова, ГЭОТАР-Медиа, М., 2011, 304.
2. Самсыгина Г. А. Часто болеющие дети. ГЭОТАР-Медиа, М., 2018, 159.
3. Таточенко В. К. Болезни органов дыхания у детей (Практическое руководство), 7 переработанное и дополненное издание, М., 2019, 293.
4. Paediatric Respiratory Medicine ERS Handbook 1st Edition Ernst Eber. Fabio Midulla// Eur. Res. Society., 2013, 719.

**THE QUESTION OF DIAGNOSIS DYSFUNCTION OF THE IMMUNE SYSTEM  
IN CHILDREN LIVING IN CONDITIONS OF EXPOSURE TO POTENTIAL  
ANTHROPOGENIC LOADS**

© 2019 V. V. Troshina<sup>1</sup>, N. Z. Zokirov<sup>1</sup>, V. D Gladkich<sup>2\*</sup>

\*E-mail: Gladkich2007@rambler.ru

<sup>1</sup>Academy of Postgraduate Education under the Federal State Budgetary Unit "Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Federal State Unitary Enterprise Research & Production Center "Pharmaceutical Protection" of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

**Received:** 15.07.2019. **Accepted:** 27.08.2019


In the present message the methodological approach to immunity dysfunction assessment at the children living in potentially adverse ecological territories based on determination of nature of interrelation of variables (the defined allelic A<sub>1</sub>A<sub>1</sub> option of gene TNF, the maintenance of TNF, IL10, IFN $\gamma$ , IgA) and dependence forms is considered (forces of change of one variable in response to change of other variable) at the repeated determined parameters of a status of the immune status

*Key words:* immunity dysfunction, often ill children, ecological trouble

**Authors:**

**Troshina V. V.**, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pediatrics, Academy of postgraduate education under FSBU FSCC of FMBA of Russia, Moscow, Russia;

**Zokirov N. Z.**, MD, Professor, Head of the Department of Pediatrics, Academy of postgraduate education under FSBU FSCC of FMBA of Russia, Moscow, Russia;

**Gladkich V. D.**,  MD, Professor, Deputy Director for Science, Federal State Unitary Enterprise Research & Production Center "Pharmaceutical Protection" of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia. **E-mail:** Gladkich2007@rambler.ru

## ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ Е. ТРУДНОСТИ ДИАГНОСТИКИ

© 2019 г. З. А. Хохлова<sup>1\*</sup>, Р. А. Гилёва<sup>1</sup>, Т. В. Середина<sup>1</sup>, Т. В. Маянская<sup>2</sup>,  
В. Н. Карпова<sup>2</sup>, Н. А. Никифорова<sup>2</sup>, Е. В. Захарова<sup>2</sup>

\*E-mail: zinaidaxoxlowa@yandex.ru

<sup>1</sup>Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал  
ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Новокузнецк, Россия;

<sup>2</sup>ГБУЗ КО Новокузнецкая городская клиническая инфекционная больница № 8,  
Новокузнецк, Россия

Поступила: 12.07.2019. Принята: 23.08.2019

В статье обсуждаются трудности установления диагноза вирусного гепатита Е и формы болезни у пациентов с коморбидными состояниями, при обнаружении в сыворотке крови антител к вирусу гепатита Е.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит Е, диагностика, антитела

DOI: 10.31857/S102872210007083-6

Адрес: 654005 Кемеровская обл., г. Новокузнецк, пр. Строителей, д. 5, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра инфекционных болезней, Хохлова Зинаида Александровна. Тел.: +79133189703 (моб.)

E-mail: zinaidaxoxlowa@yandex.ru

### Авторы:

**Хохлова З. А.**, д. м. н., профессор, заведующая кафедрой инфекционных болезней Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ, Новокузнецк, Россия;

**Гилева Р. А.**, доцент кафедры инфекционных болезней Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ, Новокузнецк, Россия;

**Середина Т. В.**, к. м. н., доцент кафедры инфекционных болезней Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ, Новокузнецк, Россия;

**Маянская Т. В.**, заведующая отделением № 2 ГБУЗ КО «Новокузнецкая городская клиническая инфекционная больница № 8», Новокузнецк, Россия;

**Карпова В. Н.**, врач-лаборант ГБУЗ КО «Новокузнецкая городская клиническая инфекционная больница № 8», Новокузнецк, Россия;

**Никифорова Н. А.**, врач-лаборант ГБУЗ КО «Новокузнецкая городская клиническая инфекционная больница № 8», Новокузнецк, Россия;

**Захарова Е. В.**, к. м. н., главный врач ГБУЗ КО «Новокузнецкая городская клиническая инфекционная больница № 8», Новокузнецк, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирусный гепатит Е (ГЕ) – относительно новое для сибирского региона заболевание, лабораторная диагностика которого проводится не во всех стационарах. В настоящее время в России регистрируются как завозные, так и местные (автохтонные) случаи ГЕ. Описаны спорадические случаи и вспышки заболевания разной степени тяжести [1–4]. В ряде регионов (Хабаровский край, Якутия, Тыва, Свердловская, Ростовская, Белгородская, Московская области) у жителей обнаружены антитела к вирусу ГЕ при отсутствии клинических проявлений на момент обследования [2]. Диагноз острого ГЕ подтверждается обнаружением специфических антител IgM и/или четырехкратным нарастанием титра IgG, а также обнаружением РНК вируса ГЕ [1, 2]. Однако на практике не всегда это возможно. На Юге Кузбасса ГЕ до 2018 г. официально не регистрировался. Вместе с тем, ежегодно регистрируются случаи (15–20) гепатита неуточненной этиологии, что требует дополнительных исследований, в том числе на ГЕ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено исследование сыворотки крови методом ИФА на антитела класса IgM и IgG к вирусу ГЕ у 87 больных, поступивших в ин-

фекционный стационар с подозрением на вирусный гепатит. Возраст больных 1–89 лет, мужчин 48, женщин 41. Использовались тест-системы ЗАО Вектор-Бест «Вектоген E-IgM» и «Вектоген E-IgG». Параллельно проводилось исследование крови на антитела к вирусам гепатитов A, B, C с помощью диагностических тест-систем ЗАО Вектор-Бест.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антитела к вирусу GE в диагностическом титре (коэффициент позитивности (КП)  $\geq 1$ ) обнаружены у 6 взрослых пациентов: 2-х женщин и 4-х мужчин, средний возраст составил 59,17 (37–89) лет. У 2-х пациентов определялись IgM и IgG, у 3-х – только IgG, у одного – IgG в диагностическом титре (КП=1,0) и IgM ниже диагностического уровня: КП составил 0,9. В 4 случаях КП IgG был высокий, составлял в среднем 10,33 (8,9–11,4), в 2-х получены более низкие показатели (1,0 и 3,9). За пределы Кемеровской области в ближайшие 6 месяцев пациенты не выезжали, никто из них не работал в животноводстве, контакт с инфекционными больными отрицали; 2 употребляли свинину, у остальных пищевой анамнез не уточнен.

Жалобы на лихорадку предъявляли 2 больных, интоксикацию (астения, отсутствие аппетита, слабость), тяжесть в правом подреберье – 6, желтуху – 4, кожный зуд – 2 больных. Во всех случаях отмечалась поздняя госпитализация в среднем на  $12,2 \pm 3,2$  день болезни (7–18-й день). Клинические симптомы и биохимические признаки синдромов желтухи, цитолиза, холестаза, мезенхимально-воспалительного синдрома установлены в 100% наблюдений. При инструментальном исследовании (УЗИ, фиброэластометрия) выявлены признаки хронического гепатита у 3 больных, у 3 – гепатоз (в т.ч. у 1 также стеатоз поджелудочной железы). Из анамнеза установлено у одного больного наличие ВИЧ-инфекции 4Б стадии (на АРТ), хронического гепатита С (ХГС), злоупотребление алкоголем, у 2-х – артериальная гипертензия, у 1 – ожирение. У 2-х при обследовании в стационаре был впервые выявлен ХГС (anti-HCV IgG+, ПЦР+), у 1 – гипергликемия и анемия.

На фоне проводимого лечения, включавшего патогенетическую и симптоматическую терапию, отмечалась положительная динамика с замедленным регрессом синдрома холестаза. По совокупности клинико-лабораторных данных установлен окончательный диагноз острого GE

у 2-х пациентов, паст-инфекция GE – у одного, вероятно хронический GE – у 3-х больных, которым рекомендовано наблюдение и обследование в динамике. Во всех случаях отмечалась коморбидная патология.

Таким образом, гепатит E регистрируется на Юге Кузбасса, как острая, так и хроническая форма болезни. По данным литературы, хронизация GE происходит при иммуносупрессии; считается, что хроническая форма GE протекает латентно, патогенез манифестации процесса не изучен [1, 2, 5]. Возникают трудности при диагностике формы GE при наличии у пациента коморбидной патологии, включая ХГС, жировой гепатоз, при однократном исследовании сыворотки крови на антитела к GE и при отсутствии возможности молекулярной диагностики (ОТ-ПЦР).

Для расшифровки диагноза вирусного гепатита показано включение в алгоритм обследования исследование на маркеры не только гепатитов A, B, C, D, но также E, в первую очередь, у взрослых пациентов. Однократного исследования на антитела к вирусу GE может оказаться недостаточно для уточнения формы заболевания, что обуславливает необходимость повторного исследования, а также внедрения ПЦР-диагностики.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Малинникова Е. Ю.* Особенности гепатита E на современном этапе изучения энтеральных инфекций. *Инфекционные болезни* 2014, том 12, № 1, с. 59–65. [*Malinnikova E. Yu.* Features of hepatitis E at the present stage of the study of enteric infections. *Infectious diseases* 2014, Vol. 12, No. 1, 59–65].
2. *Малинникова Е. Ю., Михайлов М. И., Кюгерян К. К.* Вирусный гепатит E. Современные представления об этиологии, эпидемиологии, клинике и профилактике. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение* 2014, № 3, с. 13–22. [*Malinnikova E. Yu., Mikhaylov M. I., Kyugeryan K. K.* Viral hepatitis E. Current understanding of etiology, epidemiology, diagnosis, clinic and prevention. *Infectious diseases: News, Opinions, Training*. 2014, Vol. 8, No. 3, 13–22].
3. *Михайлов М. Е., Малинникова Е. Ю., Кюгерян К. К., Поляков А. Д.* Гепатит E – актуальные проблемы изучения (2016–2018). *Инфекционные болезни. Новости, мнения, обучение* 2019, том 8, № 1, с. 74–83. [*Mikhaylov M. I., Malinnikova E. Yu., Kyugeryan K. K., Polyakov A. D.* Hepatitis E – actual problems of study (2016–2018). *Infectious diseases: News, Opinions, Training*. 2019, Vol. 8, No. 1, 74–83].
4. *Ильченко Л. Ю., Малинникова Е. Ю.* Фульминантные случаи гепатита E. Современные проблемы науки и образования 2014, № 2. [*Ilchenko L. Yu., Malinnikova E. Yu.* Fulminant cases of hepatitis E. *Modern problems of science and education* 2014, No. 2].

**VIRAL HEPATITIS E. DIAGNOSTIC DIFFICULTIES BEHIND**

© 2019 **Z. A. Khokhlova<sup>1\*</sup>, R. A. Gileva<sup>1</sup>, T. V. Sereda<sup>1</sup>, T. V. Mayanskaya<sup>2</sup>,  
V. N. Karpova<sup>2</sup>, N. A. Nikiforova<sup>2</sup>, E. V. Zakharova<sup>2</sup>**

*\*E-mail: zinaidaxoxlowa@yandex.ru*

*<sup>1</sup>Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medical Education – branch of FSBEI DPO RMANPO  
of the Ministry of Health of Russia, Novokuznetsk, Russia;*

*<sup>2</sup>GBU KO Novokuznetsk City Clinical Infectious Diseases Hospital № 8, Novokuznetsk, Russia*

**Received:** 12.07.2019. **Accepted:** 23.08.2019

The article discusses the difficulties of establishing the diagnosis of viral hepatitis E and the form of the disease in patients with comorbid conditions, when antibodies to the hepatitis E virus are detected in blood serum.

*Key words:* viral hepatitis E, diagnostics, antibodies

**Authors:**

**Khokhlova Z. A.**, ✉ doctor of Medicine, professor, head of the Infectious Diseases Department of Novokuznetsk State Institute of Advanced Medical Education – the branch office of FGBOU DPO RMANPO of the Russian Federation Ministry of Health, Novokuznetsk, Russia. **E-mail:** zinaidaxoxlowa@yandex.ru;

**Gileva R. A.**, associate professor of the Infectious Diseases Department of NGIUV- the branch office of FGBOU DPO RMANPO of the Russian Federation Ministry of Health, Novokuznetsk, Russia;

**Sereda T. V.**, PhD, Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medical Education, branch of FSBEI DPO RMANPO of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novokuznetsk, Russia;

**Mayanskaya T. V.**, Head of Department No. 2, Novokuznetsk City Clinical Infectious Diseases Hospital No. 8, Novokuznetsk, Russia;

**Karpova V. N.**, Laboratory Doctor, Novokuznetsk City Clinical Infectious Diseases Hospital № 8, Novokuznetsk, Russia;

**Nikiforova N. A.**, Laboratory Doctor, Novokuznetsk City Clinical Infectious Diseases Hospital № 8, Novokuznetsk, Russia;

**Zakharova E. V.**, Ph.D., Head Physician, Novokuznetsk City Clinical Infectious Diseases Hospital № 8, Novokuznetsk, Russia.

## СВЯЗЬ ВИТАМИНА D, ПИЩЕВОЙ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВОМ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

© 2019 г. М. И. Худякова<sup>1\*</sup>, Н. А. Черевко<sup>1</sup>, К. В. Березовская<sup>2</sup>

\*E-mail: khudiakovami@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»  
Минздрава РФ, Томск, Россия;

<sup>2</sup>Медицинское объединение ООО «Центр семейной медицины», Томск, Россия

Поступила: 19.07.2019. Принята: 26.08.2019

В работе исследовали взаимосвязь концентрации 25-ОН витамина D, показателей пищевой гиперчувствительности и уровня провоспалительных цитокинов у детей с расстройством аутистического спектра (РАС). Обнаружена связь между низким содержанием витамина D, повышенными концентрациями специфических IgG (sIgG) к пищевым антигенам (ПАГ) зерновых и молочных продуктов, провоспалительных цитокинов (IL17, IFN $\gamma$ ). Таким образом, дефицит витамин D связан с показателями иммунного воспаления и с механизмами пищевой толерантности у детей с РАС.

**Ключевые слова:** расстройство аутистического спектра, пищевая гиперчувствительность, 25-ОН витамин D, IL17, IFN $\gamma$

DOI: 10.31857/S102872210007084-7

**Адрес:** 634055 Томск, Московский тракт, 2, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Худякова Мария Ивановна.

Тел.: +7(923) 446-82-03 (моб.); E-mail: khudiakovami@mail.ru

**Авторы:**

**Худякова М. И.**, соискатель, ординатор ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Томск, Россия;

**Черевко Н. А.**, д-р мед. наук, профессор ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Томск, Россия;

**Березовская К. В.**, врач общей врачебной практики, врач-педиатр ООО «Центр Семейной Медицины», Томск, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Расстройство аутистического спектра (РАС) характеризуется нарушением социальных взаимодействий и проявлениями ограниченно-повторяющихся моделей поведения [1]. Каждому 68 ребёнку в возрасте до 8 лет диагностируется РАС [2]. Патогенез развития РАС остаётся спорным, однако, значительная роль в развитии данного заболевания отводится нейроиммунному воспалению [1].

В последние годы были представлены исследования о роли пищевых антигенов, нарушении

пищевой толерантности и развитии патологических процессов, являющихся причинами воспалительных ответов в центральной нервной системе и иммунных дисфункций в кишечнике у детей с РАС [3, 4].

Показано также, что дефицит витамина D может снижать количество регуляторных Т-клеток, усиливать нейроиммунное воспаление и тяжесть проявления РАС [5]. Мы предполагаем, что концентрации витамина D и его взаимодействие с VD-рецептором, экспрессированным на дендритных клетках (CD103<sup>+</sup>DCs) тонкого кишечника, играют роль в протекции пищевой толерантности.

**Цель работы** состояла в выявлении взаимосвязи концентраций витамина D, специфической IgG-опосредованной пищевой гиперчувствительности и уровня провоспалительных цитокинов у детей с РАС.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами было проведено проспективное когортное исследование 103 детей, разделенных на две группы. Основная группа составила 73 ребёнка

с диагностированным РАС различной степени тяжести. Контрольная группа была представлена 30 соматически здоровыми детьми. Средний возраст детей —  $7 \pm 2$  лет.

Материалом исследования служила кровь, взятая из подкожных вен области локтевого сгиба. От родителей детей было получено информированное согласие на проведение комплексных исследований и обработку персональных данных.

Оценка специфической IgG-зависимой гиперчувствительности к 111 пАГ, объединенных по сходным антигенным структурам в 8 кластерах, проводилась с использованием многокомпонентного ИФА по методике Immunohealth™ [6]. Оценка концентрации цитокинов в сыворотке крови была произведена с применением наборов кIL17A (BenderMedsystems Австрия), IFN $\gamma$  (Вектор-Бест, Россия). Концентрацию 25-ОН витамина D определяли с помощью набора Euroimmun AG (Германия).

Статистический анализ был выполнен в программе IBM SPSS Statistics 23.0.0.0 (США) с использованием критериев Колмогорова-Смирнова, U-критерия Манна-Уитни, W-критерия Уилкоксона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании концентрации 25-ОН витамина D в обеих группах был выявлен дефицит витамина D по сравнению с известными референсными значениями нормы. Средние значения составили: 25,72 нг/мл в группе детей с РАС и 16,15 нг/мл в контрольной группе. Нами было установлено, что у детей с РАС значительно чаще выявляется IgG-опосредованная гиперчувствительность к антигенам продуктов молочного кластера (коровье молоко, казеин, творог, йогурт, сыр твердый, медиана составила 5495,5 (4375–7104,7) МЕ) и к антигенам кластера зерновых продуктов (глютен, пшеница, овёс, рожь, пшено, 534 (264,3–1027,5) МЕ) по сравнению с детьми из группы сравнения (3689 (2991,5–5617,7) МЕ и 304 (165–566) МЕ соответственно) ( $p < 0,05$ ).

При оценке особенностей изучаемых цитокинов были выявлены статистически значимые различия концентраций IL17A и IFN $\gamma$  в группе детей с РАС по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ). Медиана значений концентраций цитокинов в группе детей с РАС составила

IL17A — 9,58 (3,76–26,75) пг/мл и IFN $\gamma$ : 14,9 (13,12–16,10) пг/мл. Медиана значений концентраций цитокинов в группе сравнения составила IL17A — 6,85 (2,95–15,05) пг/мл и IFN $\gamma$  — 13,35 (11,85–14,2) пг/мл.

Далее было установлено, что в группе детей с РАС концентрация витамина D находилась в обратной корреляции с концентрацией IL17A ( $r = -0,276$   $p < 0,05$ ) и IFN $\gamma$  ( $r = -0,0783$   $p < 0,05$ ), а также со значениями концентраций специфических IgG к пАГ кластера зерновых продуктов (в частности, пшено ( $r = -0,48$   $p < 0,05$ ) и суммарному IgG к пАГ молочных продуктов ( $r = -0,3$   $p < 0,05$ ).

В нашем исследовании установлено, что в обеих группах наблюдался дефицит витамина D. Примечательно, что в группе детей с РАС отмечены более высокие значения концентрации 25-ОН витамина D. Это связано с тем, что последние принимали препараты витамина D в дозе от 2 до 4 тыс. МЕ в сутки от 6 до 12 месяцев до исследования. Однако, прием рекомендованных доз не приводил к восполнению дефицита витамина D до референсных значений нормальных показателей.

Вероятно, что витамин D может непосредственно влиять на иммунные клетки, экспрессирующие специфический рецептор VDR, в частности на DCs, T-reg лф, опосредуя синтез супрессорных цитокинов, таких как TGF $\beta$  и IL10, он участвует в синтезе кортизола, обеспечивает процессы регуляции активности адаптивного иммунного ответа на антигены, включая пищевые антигены и, соответственно, механизмы контроля пищевой толерантности. Выявленные в нашей работе низкие значения витамина D в группе детей с РАС на фоне увеличения концентрации IL17 и IFN $\gamma$ , высоких показателей пищевой гиперчувствительности относительно группы сравнения, свидетельствует о вовлеченности витамина D в процессы хронического иммунного воспаления у данной категории пациентов.

Важно, что у детей с РАС выявленный дефицит витамина D сочетается с дисбалансом провоспалительных цитокинов и выраженностью показателей пищевой гиперчувствительности. А у детей группы контроля дефицит витамина D, вероятно, создает только риски для развития процессов нарушений барьерных функций кишечника. По-прежнему остаётся открытым вопрос о персонализированных дозах приёма витамина D и их влиянии на показатели цитокинов.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Siniscalco D., Schultz S., Brigida A., Antonucci N. Inflammation and neuro-immune dysregulations in autism spectrum disorders. *Pharmaceuticals*. 2018, 11(2), 56.
2. Christensen D.L., Baio J., Braun K.V.N., Bilder D., Charles J., Constantino J.N. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network. *MMWR Surveillance Summaries*. 2016, 65(3), 1–23.
3. De Magistris L., Picardi A., Siniscalco D., Riccio M.P., Sapone A., Cariello R., Abbadessa S., Medici N., Lam-mers K.M., Schiraldi C., Iardino P. Marotta R., Tolo-ne C., Fasano A., Pascotto A., Bravaccio C. Antibodies against food antigens in patients with autistic spectrum disorders. *BioMedresearchinternational*. 2013.
4. Черевко Н.А., Скирневская А.В., Розенштейн М.Ю., Новиков П.С., Муравейник О.А., Денисов А.А. Осо-бенности специфической гиперчувствительности к пищевым антигенам молочного и злакового кластеров у детей с расстройством аутистического спектра. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018, 17(1), 159–166. [Cherevko N.A., Skirnevskaya A.V., Rosenstein M.Y., Novikov P.S., Muraveinik O.A., Denisov A.A. Features of specific food hypersensitivity to dairy and cereal products in children with autism spectrum disorder *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018, 17(1), 159–166].
5. Cannell J.J., Grant W.B. What is the role of vitamin D in autism? *Dermato-endocrinology*. 2013, 5(1), 199–204.
6. Розенштейн М.Ю., Розенштейн А.З., Кондаков С.Э., Черевко Н.А. Современные лабораторные методы диагностики пищевой непереносимости. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (1): 69–78. [Rosensteyn M. Y., Rosensteyn A. Z., Kondakov S. E., Cherevko N. A. Modern methods of food intolerance testing. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016, 15(1): 69–78].

**CORRELATION OF VITAMIN D, FOOD HYPERSENSITIVITY  
AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN CHILDREN WITH AUTISM  
SPECTRUM DISORDERS**

© 2019 M. I. Khudiakova<sup>1\*</sup>, N. A. Cherevko<sup>1</sup>, Berezovskaya<sup>2</sup>

\*E-mail: khudiakovami@mail.ru

<sup>1</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

<sup>2</sup>Center of Family Medicine, Tomsk, Russia

**Received:** 19.07.2019. **Accepted:** 26.08.2019

The study investigated the relationship between the concentration of 25-OH vitamin D, food hypersensitivity and the level of pro-inflammatory cytokines in children with ASD. An inverse correlation was found between the concentration of vitamin D and specific IgG (sIgG) to food antigens of dairy and grain products, concentration of pro-inflammatory cytokines (IL17, IFN $\gamma$ ). Thus, deficiency of vitamin D is associated with indicators of immune inflammation and the mechanisms of food tolerance in children with ASD.

*Key words:* autism spectrum disorder, food hypersensitivity, 25(OH)D<sub>3</sub>, IL17, IFN $\gamma$

**Authors:**

**Khudiakova M. I.**, ✉ PhD applicant, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

**Cherevko N. A.**, Grand PhD in Medical sciences, Professor of the Department of Allergology and Immunology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

**Berezovskaya K. V.**, general practitioner, pediatrician, Center of Family Medicine, Tomsk, Russia.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ IgE У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

© 2019 г. С. В. Чечетова\*, Р. М. Кадырова, З. К. Джолбунова, Э. С. Майназарова

\*E-mail: Chechetova.svetl@mail.ru

КГМА им. И. К. Ахунбаева «Кыргызская Государственная медицинская академия», Бишкек, Кыргызстан

Поступила: 10.07.2019. Принята: 14.08.2019

Проведен анализ уровня IgE в группе детей с острыми вирусными инфекциями, среди которых была корь, краснуха, парвовирусная инфекция В-19, энтеровирусная инфекция и острые респираторные вирусные инфекции с сопутствующим аллергическим дерматитом.

**Ключевые слова:** IgE, иммунный статус, вирусные инфекции, корь, краснуха, ОРВИ, аллергический дерматит, парвовирусная инфекция В-19, энтеровирусная инфекция

DOI: 10.31857/S102872210007085-8

### Авторы:

**Чечетова С. В.**, к.м.н., доцент кафедры детских инфекционных болезней КГМА им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Кадырова Р. М.**, д.м.н., профессор кафедры детских инфекционных болезней КГМА им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Джолбунова З. К.**, д.м.н., заведующий кафедрой детских инфекционных болезней КГМА им. И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;

**Майназарова Э. С.**, к.м.н., доцент кафедры иммунологии и эпидемиологии КРСУ, Бишкек, Кыргызстан.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

Последние годы отмечается повсеместный рост острых вирусных инфекций среди детей, частота тяжелых форм, с резистентностью и торпидностью к проводимой терапии [2]. В Кыргызстане с 2018 года отмечается рост больных с корью, регистрируются и другие кореподобные заболевания, такие как парвовирусная инфекция В-19, энтеровирусная инфекция, краснуха. Часто наблюдается сочетание вирусных инфекций и аллергии у одного пациента. Однако, это не простое сложение двух патологических состояний, а более сложный процесс взаимодействия факторов болезни. Инфекционные агенты могут выступать в качестве аллергена, особенно у предрасположенных к этому детей. Также, некоторые острые вирусные инфекции у ребенка могут привести к обострению аллергического заболе-

вания и вызвать прогрессирование болезни [2]. На фоне повышенного аллергического состояния создаются условия для присоединения вторичной бактериальной инфекции. Острые вирусные инфекции выступают как триггер аллергопатологии. Очень часто триггером аллергопатологии служат вирусы кори и ветрянки, гриппа, парагриппа, энтеровирусы, ВИЧ [3]. Острые вирусные инфекции способны нарушать барьерную проницаемость дыхательных путей и этим способствовать проникновению аллергена. У больных атопией при вирусных инфекциях обнаруживается повышение уровня общего IgE, усиление как немедленной, так и поздней фазы аллергической реакции. Что касается данных об изменении уровня иммуноглобулина Е при вирусных инфекциях у детей, то они немногочисленны, противоречивы и требуют дополнительного изучения [1].

**Цель работы:** изучить особенности изменения уровня IgE на фоне острых кореподобных вирусных инфекций у детей.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы общеклинические методы; иммуноферментный анализ (ИФА) определения уровня IgE, IgM к вирусу кори, краснухи, парвовирусной инфекции В-19. Результаты ИФА анализировали согласно

инструкциям по использованию тест-систем (Вектор Бест, Россия). Анализ статистических данных проводился с использованием программы SPSS.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Под нашим наблюдением находилось 52 ребенка с клиническими проявлениями острой вирусной инфекции, которые лечились в Республиканской клинической инфекционной больнице (РКИБ) г. Бишкек. Изучение спектра нозологических форм вирусных инфекций в наблюдаемой группе больных детей показало, что 42,3% больных были с клиническим диагнозом «Корь», 19,2% – «Краснуха», 19,2% – «Парвовирусная инфекция В-19», 13,5% – «ОРВИ с сопутствующим отягощенным аллергическим фоном» и 5,8% составили пациенты с диагнозом «Энтеровирусная инфекция». Среди пациентов исследуемой группы 46,2% составили мальчики и 53,8% – девочки. При этом, среди мальчиков медиана уровня IgE составила 137,5 МЕ/мл (при норме показателя IgE до 100,0 МЕ/мл), а доверительный интервал для медианы 95% – 93,508–371,158 МЕ/мл. В то же время, среди девочек медиана уровня IgE составила 99,5 МЕ/мл, доверительный интервал для медианы 95% – 82,859–287,434 МЕ/мл, что свидетельствует о достоверной разнице уровня IgE в сравниваемых группах и представляет определенный интерес для дальнейших наблюдений. В процессе исследования нами были выделены две группы пациентов с острыми вирусными инфекциями в зависимости от развития бактериальных осложнений. В 1-ю группу вошли дети с острыми вирусными инфекциями, осложненными бактериальной инфекцией (27 человек). Вторая группа включала пациентов с неосложненным течением вирусных инфекций (25 детей). У этих больных проанализирован показатель уровня IgE, проведен поиск корреляционных связей и сравнительный анализ результатов исследования в группах наблюдения. Наиболее частым бактериальным осложнением в 1-й группе больных была пневмония, реже – острый гнойный тонзиллит. Согласно проведенным расчетам, показателя IgE в группе вирусно-бактериальной инфекции, медиана составила 70,0 МЕ/мл (квартили 55–70–133), конфиденциальный интервал для медианы 95% 62,0–101,0 МЕ/мл (95,7%). При этом, во 2-й группе больных детей с вирусными инфекциями, неосложненной формой медиана была

180,0 МЕ/мл (квартили 112,5–180,0–248) и конфиденциальный интервал для медианы 95% составил 130,0–210,0 МЕ/мл (95,7%).

Из этого следует, что на фоне вирусных инфекций вероятность высокого показателя уровня IgE достоверно выше, чем при сочетанном течении вирусно-бактериальных инфекций. Эти данные, вероятно, следует объяснить тем фактором, что у большинства детей осложнения развивались на фоне коревой анергии, как правило при поздно начатой терапии присоединившейся бактериальной инфекции. Был проведен корреляционный анализ по Pearson, в результате которого нами были получены следующие данные. В 1-й группе больных выявлена положительная корреляция ( $r=+0,36$ ) уровня IgE с возрастом детей, во 2-й группе данная корреляционная связь была отрицательной ( $r=-0,31$ ). Т.е. на фоне вирусно-бактериальной инфекции чем старше был пациент, тем выше был показатель уровня IgE, в то время, как на фоне вирусной инфекции чем старше был ребенок, тем уровень IgE был меньше. Это связано с возрастными особенностями иммунно-биологической реактивности ребенка. Также выявлена прямая корреляционная связь ( $r=+0,57$ ;  $+0,46$ ) уровня IgE с выраженностью интоксикации и длительностью лихорадки. Особенно хорошо эта связь прослеживается в группе больных с вирусно-бактериальной инфекцией; в этой же группе отмечена корреляционная связь уровня IgE с уровнем нейтрофилов ( $r=+0,34$ ), лимфоцитов ( $r=-0,3$ ) и СОЭ ( $r=+0,68$ ) в общем анализе крови при поступлении больного в стационар.

В группе наблюдаемых нами больных с неосложненными вирусными инфекциями, несмотря на наличие более высокого уровня медианы (180,0 МЕ/мл), подобной корреляционной зависимости не было выявлено. При сравнении двух несвязанных выборок (группы больных с острой вирусно-бактериальной инфекцией и группы с острой вирусной инфекцией) было установлено, что по уровню IgE между этими группами есть статистически значимые различия (тест Kolmogorov-Smirnov  $<0,05$ ). Нами также был проведен сравнительный анализ уровня IgE при некоторых нозологических формах кореподобных вирусных инфекций (корь, краснуха, парвовирусная инфекция В-19, ОРВИ с аллергическим дерматитом и др.). Так, у детей с диагнозом «Корь» средний уровень показателя IgE составил  $79,273+9,3053$  МЕ/мл (доверительный интервал среднего 95% 59,921–98,624 МЕ/мл). В группе

больных с диагнозом «Краснуха» медиана составила 193,85 МЕ/мл (доверительный интервал медианы 95% 111,915–819,385 МЕ/мл). На фоне течения Парвовирусной инфекции В-19: медиана =112,5 (доверительный интервал медианы 95% 10,0–210,0 МЕ/мл). У больных с диагнозом «ОРВИ, аллергический дерматит» средний уровень показателя IgE составил 186,514+37,6516 МЕ/мл (доверительный интервал среднего 95% 94,384–278,645 МЕ/мл). Таким образом, самый высокий средний показатель уровня IgE отмечен при краснухе и самый низкий показатель при кори. Исследования в данном направлении продолжаются.

### ВЫВОДЫ

Среди мальчиков с острыми вирусными и вирусно-бактериальными инфекциями медиана уровня IgE была выше (137,5 МЕ/мл), чем среди девочек (99,5 МЕ/мл).

На фоне вирусных инфекций вероятность высокого показателя IgE достоверно выше, чем при сочетанном течении вирусно-бактериаль-

ной инфекции, особенно осложненной кори на фоне развития анергии.

Самый высокий средний показатель уровня IgE отмечен при краснухе (медиана =193,85 МЕ/мл) и самый низкий показатель при кори (79,273+9,3053 МЕ/мл). Эти данные диктуют необходимость дальнейших исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Железникова Г. Ф. Иммуноглобулин Е при вирусных инфекциях человека. Российский иммунологический журнал. 2014, 8(17), № 2, 52–166. [Zheleznikova G. F. Immunoglobulin E in human viral infections. Russian journal of immunology. 2014, 8(17), № 2, 52–166].
2. Царев С. В. Инфекция и аллергия: взаимосвязь и взаимовлияние. РМЖ «Медицинское обозрение» № 12. 2016, 800–803. [Tsarev S. V. Infection and Allergy: interrelation and mutual influence. BC “Medical review” No. 12. 2016, 800–803].
3. Макроносова М. А. Инфекция и аллергия: две стороны одной медали. Астма и аллергия. 2015, № 4, 9–12. [Mokronosova M. A. Infection and allergies: the two sides of the same coin. Asthma and allergies. 2015, № 4, 9–12].

### COMPARATIVE ANALYSIS OF IgE LEVEL IN CHILDREN WITH ACUTE VIRAL INFECTIONS

© 2019 S. V. Chechetova\*, R. M. Kadyrova, Z. K. Djolbunova, E. S. Mainazarova

\*E-mail: Chechetova.svetl@mail.ru

KSMA them. I. K. Akhunbaeva “Kyrgyz State Medical Academy”, Bishkek, Kyrgyzstan

Received: 10.07.2019. Accepted: 14.08.2019

The analysis of the level of IgE in a group of children with acute viral infections, including measles, rubella, parvovirus B-19 infection, enterovirus infection and acute respiratory viral infections with concomitant allergic dermatitis, was carried out.

**Key words:** IgE, immune status, viral infections, measles, rubella, ARVI, allergic dermatitis, parvovirus B-19 infection, enterovirus infection

#### Authors:

**Chechetova S.V.**, ✉ Ph.D., Associate Professor, Department of Pediatric Infectious Diseases, KSMA named after. I. K. Akhunbaeva, Bishkek, Kyrgyzstan. E-mail: Chechetova.svetl@mail.ru;

**Kadyrova R.M.**, Ph.D., Professor, Department of Pediatric Infectious Diseases, KSMA named after. I. K. Akhunbaeva, Bishkek, Kyrgyzstan;

**Djolbunova Z.K.**, MD, Head of the Department of Pediatric Infectious Diseases, KSMA named after. I. K. Akhunbaeva, Bishkek, Kyrgyzstan;

**Mainazarova E.S.**, PhD, Associate Professor, Department of Immunology and Epidemiology, KRSU, Bishkek, Kyrgyzstan.

## ОРОФАРИНГЕАЛЬНЫЙ КАНДИДОЗ: ЭТИОЛОГИЯ, ФАКТОРЫ РИСКА И ИММУНОПАТОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

© 2019 г. Н. В. Шабашова\*, Е. В. Фролова, Л. В. Филиппова, А. Е. Учеваткина

\*E-mail: shabashova@bk.ru

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 05.07.2019. Принята: 12.08.2019

Несмотря на имеющиеся дефекты иммунореактивности у больных гемобластозами, причины относительно невысокой частоты развития орофарингеального кандидоза (ОФК) остаются невыясненными. Среди 525 наблюдаемых больных гемобластозами у 137 был клинически заподозрен ОФК. Из них у 51 больного (9,7%) был верифицирован ОФК. Вероятность возникновения этого осложнения значительно повышалась при использовании антибактериальной терапии. Развитие ОФК сопровождалось повышением в ротовой жидкости IL-6, IL-8, SLPI, DEFb2 и снижением IL-17 и MСP-1, что указывает на недостаточную функциональную активность клеток моноцитарно-макрофагального ряда, а также регуляторов Т-клеточного ответа в слизистой оболочке полости рта.

**Ключевые слова:** гемобластозы, *Candida spp.*, орофарингеальный кандидоз, локальный иммунитет, растворимые факторы

DOI: 10.31857/S102872210007086-9

Адрес: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба 1/28. Кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии СЗГМУ им. И. И. Мечникова.

Тел./факс+7(812)3035000, доб. 4156, 89217449015 (моб.)

E-mail: shabashova@bk.ru

**Авторы:**

**Шабашова Н. В.**, д.м.н., профессор кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия;

**Фролова Е. В.**, к.м.н., заведующая НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Санкт-Петербург, Россия;

**Филиппова Л. В.**, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Санкт-Петербург, Россия;

**Учеваткина А. Е.**, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П. Н. Кашкина, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Санкт-Петербург, Россия;

Среди осложнений, вызванных микромицетами у больных с онкогематологическими

заболеваниями, около 10% представлены орофарингеальным кандидозом [1, 2]. Как известно, у данной категории больных есть дефекты иммунореактивности, однако частота развития грибковых поражений слизистых оболочек относительно невысока и причины этого не установлены.

**Цель работы:** Определение этиологии, факторов риска и изменений местной иммунореактивности в развитии орофарингеального кандидоза у больных гемобластозами.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из 525 больных гемобластозами у 137 (медиана возраста 54) имелись клинические признаки орофарингеального кандидоза (ОФК). Диагноз ОФК был подтвержден у 51 больного (9,7%). Эти пациенты составили первую группу исследования. Во вторую группу (86 человек) были включены больные с исключенным диагнозом ОФК. В группу сравнения вошли 33 условно здоровых человека соответствующего возраста с санированной ротовой полостью. Диагноз

ОФК был установлен на основании комплексной оценки согласно Российским национальным рекомендациям (2015 г). В стандартном количестве ротовой жидкости, собранной с помощью систем “Salivette sarstedt” (Германия), оценивали содержание грибов рода *Candida*. Высокой микробной нагрузкой считали содержание КОЕ свыше 500/мл. Методом ИФА в супернатантах ротовой жидкости определяли уровни цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-8, IL-6, TNF, IL-10, моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1) («Вектор-Бест», Россия),  $\beta$ -дефензина-2 (DEFb2) «Cloud-Clone Corp», США, секреторного лейкоцитарного протеазного ингибитора (SLPI) («R&D», США). Результаты обрабатывали с помощью программы Statistica for Windows, 10.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ОФК развивался преимущественно на фоне опухолей лимфоидной ткани: в 25 случаях из 51 (49%) у больных лимфомами, в 21% случаев как при плазмноклеточной миеломе, так и при остром миелоидном лейкозе. Цитостатическую терапию применяли в обеих группах по аналогичным схемам: в группе с ОФК — у 45 больных (88%), в группе без ОФК — у 76 больных (88%). Глюкокортикостероиды получали в группе с ОФК 38 больных (74%), в группе без ОФК — 65 больных (75%). Таким образом, частота возникновения ОФК не зависела от применения цитостатической и глюкокортикостероидной терапии. Использование антибактериальной терапии достоверно повышало вероятность развития ОФК [OR=3,37 [1,63–6,99], 95% ДИ]. В 90% случаев возбудителем ОФК был *S.albicans*. Высокая микробная нагрузка (КОЕ свыше 500/мл) выявлена в 69% случаев в первой группе и 46% — во второй. У соматически здоровых людей микробная нагрузка не превышала 100 КОЕ /мл.

Установлено, что у больных с ОФК была усилена продукция IL-6 (107 (0÷640) пг/мл), по сравнению с группой без ОФК (11(0÷97) пг/мл,  $p<0,05$ ) и контролем (3,6 (0÷11) пг/мл,  $p<0,05$ ). Также отмечали повышение выработки IL-8 у больных с ОФК: 199 (24÷456) и 140 (6÷436) vs 123 (24÷454) пг/мл). Это подтверждается выявленными в этих группах корреляционными связями между IL-6 и IL-8 ( $r=0,72$ ,  $p<0,01$ ). Уровень SLPI был достоверно выше у онкогематологических больных на фоне развития ОФК: 3252 (601÷7986) vs 2554 (399÷7560) пг/мл,  $p<0,05$ .

В группе с ОФК установлено значительное повышение DEFb2: 102 (18÷196) пг/мл по сравнению со здоровыми 47 (23÷65) пг/мл,  $p<0,05$ . Уровни IFN- $\gamma$  были ниже в обеих группах больных, по сравнению с контролем. MCP-1 был повышен у всех больных, но на фоне ОФК отмечали снижение данного показателя: 144 (0÷389) и 105 (29÷583) vs 43 (23÷76) пг/мл — в группе здоровых,  $p<0,05$ . Одним из важнейших цитокинов в отношении противогрибковой защиты является IL-17 [3]. Развитие ОФК у гематологических больных сопровождалось снижением продукции IL-17 (2,6 (1÷6) пг/мл), тогда как в группе без осложнения ОФК уровень IL-17 был достоверно выше по сравнению с контролем (4,4 (0÷12) vs 3,4 (1÷7) пг/мл ( $p<0,05$ )). Это могло быть причиной недостаточной циркуляции в слизистой оболочке полости рта клеток моноцитарно-макрофагального ряда, а также регуляторов Т-клеточного ответа.

## ВЫВОДЫ

1. Установлена избыточная колонизация ротовой полости грибами рода *Candida* у больных гемобластозами, что свидетельствует о нарушении местной иммунореактивности.
2. Вероятность развития ОФК при гемобластозах повышается преимущественно после применения антибактериальной терапии.
3. Изменения местного синтеза цитокинов у больных гемобластозами характерны для избыточного раннего и инициативного иммунного ответов с повреждением ткани, что может способствовать усилению патогенных свойств грибов и развитию орофарингеального кандидоза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Gligorov J., Bastit L., Gervais H. Prevalence and treatment management of oropharyngeal candidiasis in cancer patients: results of the French Candidoscope study. *IntJRadiatOncolBiolPhys*. 2011, 80(2), 532–539.
2. Данилова Е.Ю., Шабашова Н.В., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В. Особенности местной защиты онкогематологических больных при орофарингеальном кандидозе. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2015, 3, 31–39.
3. Verma A. H., Richardson J.P., Zhou Ch., Coleman B. M., Moyes D. L., Ho J., Huppler A. R., Ramani K., McGeachy M. J., Mufazalov I. A., Waisman A., Kane L. P., Biswas P. S., Hube B., Naglik J. R., Gaffen S. L. Oral epithelial cells orchestrate innate Type 17 responses to *Candida albicans* through the virulence factor Candidalysin. *Sci Immunol*. 2017, 3; 2(17), eaam8834.

**OROPHARYNGEAL CANDIDIASIS: ETIOLOGY, RISK FACTORS  
AND IMMUNOPATHOLOGY OF DEVELOPMENT IN PATIENTS  
WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES**

© 2019 N. V. Shabashova\*, E. V. Frolova, L. V. Filippova,  
A. E. Uchevatkina

\*E-mail: shabashova@bk.ru

North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov,  
Saint-Petersburg, Russia

**Received:** 05.07.2019. **Accepted:** 12.08.2019

Despite the existing immunoreactivity defects in patients with hemoblastosis, the reasons of the relatively low incidence of oropharyngeal candidiasis (OPC) remain unclear. Among the 525 observed patients with hemoblastosis, in 137 of them were noted clinical signs of OPC. Of these, in 51 patients (9.7%) OPC was verified. The probability of OPC occurrence significantly increased with the use of antibacterial therapy. The OPC development was accompanied by an increase of IL-6, IL-8, SLPI, DEFb2 and a decrease of IL-17 and MCP-1 in the oral fluid, indicating insufficient functional activity of monocyte-macrophage cells, as well as regulators of T-cell response in the oral mucosa.

*Key words:* hematological malignancies, *Candida albicans*, oropharyngeal candidiasis, local immunity, soluble factors

**Authors:**

**Shabashova N. V.**, ✉ PhD, Professor of Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia. **E-mail:** shabashova@bk.ru;

**Frolova E. V.**, PhD, Head of the Laboratory of Immunology and Allergology Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia;

**Filippova L. V.**, PhD, Senior Researcher of Immunology and Allergology Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia;

**Uchevatkina A. E.**, PhD, Senior Researcher of Immunology and Allergology Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia.

## ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛЕЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-7 *IN VITRO* ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

© 2019 г. В. А. Шмаров\*, А. Г. Гончаров

\*E-mail: enant@list.ru

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,  
Минобрнауки России, Калининград, Россия

Поступила: 25.07.2019. Принята: 28.08.2019

В настоящее время исследования по изучению действия цитокинов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток вызывают большой научный интерес. Наиболее показательным является использование различных моделей культивирования клеток иммунной системы. В данной работе описываются две клеточных модели, используемые для изучения прямого влияния интерлейкина-7 на функциональные свойства Т-лимфоцитов. Интерлейкин-7 (IL-7) участвует в основных этапах жизненного цикла Т-клетки: проведение необходимых для выживания сигналов, дифференцировка, пролиферативная активность, защита от апоптотической гибели, гомеостатическое поддержание численности Т-лимфоцитов. Направленность и выраженность эффектов IL-7 оценивали на предложенных гомеостатической и активационной Т-клеточных моделях *in vitro*.

**Ключевые слова:** Т-лимфоциты, интерлейкин-7, инкубация, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210007087-0

Адрес: 236016 Калининград, ул. А. Невского, д. 14, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Центр медицинских биотехнологий. Шмаров Вячеслав Анатольевич. Тел. 89850800243 (моб.).

E-mail: enant@list.ru

Авторы:

**Шмаров В. А.**, младший научный сотрудник Центра медицинских биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Минобрнауки России, Калининград, Россия;

**Гончаров А. Г.**, к. м. н., заместитель директора медицинского института по научной работе, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Минобрнауки России, Калининград, Россия.

Исследования по изучению действия цитокинов на различные компоненты иммунной системы вызывают большой научный интерес. Использование культуральных моделей для оценки функциональной активности иммунокомпетентных клеток является наиболее показательным. Активация и пролиферация Т-лимфоцитов, их дифференцировка во многом определяют силу и направленность иммунного ответа. IL-7 стимулирует лимфопоэз, является ключевым цитокином, поддерживающим гомеостатиче-

скую пролиферацию лимфоцитов, в том числе и Т-клеток памяти, обеспечивает своевременное восполнение Т-клеточного пула тремя способами: тимопоэз, гомеостатическая пролиферация, антиапоптотический эффект [2]. IL-7 играет критическую роль в гомеостазе периферических Т-клеток, является незаменимым фактором выживаемости наивных Т-лимфоцитов. IL-7 способен выступать в качестве цитокинового костимулятора при антигенной (особенно субпороговой) стимуляции Т-лимфоцитов, обеспечивая, таким образом, их рост, а также синтез и секрецию ими цитокинов. IL-7 поддерживает баланс между процессами апоптоза и пролиферации тимоцитов, наивных Т-лимфоцитов и клеток памяти [3, 4]. В зависимости от экспрессии молекул CD45RA и CD197, хелперные и цитотоксические Т-лимфоциты подразделяются на наивные (N), клетки центральной памяти (CM), клетки эффекторной памяти (EM), а также терминально-дифференцированные эффекторы (TEMRA). Дифференцировку Т-клеток от более ранних к более поздним стадиям зрелости можно обозначить следующим образом: N→CM→EM→TEMRA [1].



**Цель работы** – исследовать действие ИЛ-7 на функциональную активность Т-лимфоцитов человека *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В отсутствие антигена, численность периферических Т-лимфоцитов поддерживается сложными механизмами гомеостатической пролиферации, обусловленной действием ИЛ-7, что относится как к наивным, так и к Т-клеткам памяти. В присутствии антигена, в процессе его распознавания, образуется синаптическое взаимодействие между молекулами мембраны антигенпрезентирующей клетки и Т-лимфоцита. В ключевые события формирования иммунного синапса вовлечены такие структуры Т-клетки, как молекула CD3 (линейный Т-лимфоцитарный антиген), CD2 и CD28 (костимуляторные молекулы). CD2/CD3/CD28-стимуляция индуцирует запуск функциональной активности Т-клетки, на ранних этапах выражающейся в активационных процессах. Вышеописанные условия воспроизведены в эксперименте в гомеостатической и активационной моделях культивирования.

Гомеостатическая и активационная модели культивирования *in vitro* основаны на использовании монокультур CD3<sup>+</sup> клеток, выделенных методом позитивной магнитной колоночной сепарации из мононуклеарных клеток цельной крови у 42 условно здоровых доноров. CD3<sup>+</sup> клетки были распределены по 1,0–1,5 × 10<sup>6</sup> клеток/мл на лунку 24-луночного планшета вместе с бессывороточной средой. В активационной модели культивирования использовали микросферы, конъюгированные с анти-CD2/CD3/CD28 антителами, имитирующие действие антигенпрезентирующих клеток. Рекомбинантный ИЛ-7 добавляли в концентрации 10 нг/мл. Инкубация проводилась во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, при 37 °С в течение 48 часов. Оценку функциональной активности различных популяций Т-клеток и степени дифференцировки проводили на проточном цитофлуориметре – определяли количество CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> клеток. Анализ этих маркеров на Т-клетках позволяет отнести их к хелперной или цитотоксической популяции, четко различать их по функциональным признакам, они отражают степень их зрелости, способность к миграции во вторичные лимфоидные органы. CD25<sup>+</sup> молекула представляет собой α-цепь рецептора ИЛ-2 и является общепринятым маркером лимфоидной актива-

ции, ассоциированной с ИЛ-2-зависимой пролиферацией лимфоцитов [4]. Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Чистота и жизнеспособность монокультуры CD3<sup>+</sup> клеток была на уровне 95%, что подтверждает правильность выбора данной модели культивирования клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление к Т-клеткам ИЛ-7 в гомеостатической модели приводило к достоверному увеличению количества CD25<sup>+</sup> клеток, как среди хелперных, так и среди цитотоксических Т-лимфоцитов. Наблюдаемый прирост CD25<sup>+</sup> клеток в обеих популяциях почти всецело обеспечивали Т-клетки эффекторной памяти. Полученные данные указывают на вовлеченность ИЛ-7 в прямую позитивную регуляцию ростовой и функциональной активности Т-клеток человека в условиях отсутствия антигенного стимула и относительного дефицита костимуляторных воздействий.

В активационной модели культивирования также наблюдалось достоверное увеличение количества CD25<sup>+</sup> клеток, как среди хелперных, так и среди цитотоксических Т-лимфоцитов. Но в этом случае среди хелперных клеток активировались лишь клетки памяти (СМ и ЕМ), а среди цитотоксических Т-лимфоцитов активировались все субпопуляции. Таким образом, на фоне стимуляции Т-клеточного рецептора интерлейкин-7 способствует сбалансированной активации почти всех субпопуляций Т-клеточного пула, создавая условия для мощного иммунного ответа.

В гомеостатической модели культивирования добавление ИЛ-7 приводило к повышению количества наиболее зрелых – терминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток по сравнению с интактной пробой, что справедливо как для хелперных, так и для цитотоксических Т-лимфоцитов. Из этого следует, что в системе покоящихся Т-клеток ИЛ-7 выступает индуктором созревания. В активационной модели при использовании заявленной в эксперименте концентрации ИЛ-7 подобного эффекта не наблюдалось.

## ВЫВОДЫ

Были продемонстрированы активационные и индуцирующие созревание эффекты интерлейкина-7 в отношении хелперных и цитотоксических лимфоцитов разной степени дифферен-

цировки. Применение данных моделей *in vitro* позволит наиболее объективно оценивать всесторонние действия цитокинов на Т-лимфоциты.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Меньяло М. Е., Малащенко В. В., Шмаров В. А., Газатова Н. Д., Тодосенко Н. М., Мелашченко О. Б., Гончаров А. Г., Седецов В. И. Прямое влияние интерлейкина-8 на активацию Т-клеток. Российский иммунологический журнал. 2016, 2; 10(19), 174–178.
2. Belarif L., Vanhove B., Poirier N. Full antagonist of the IL-7 receptor suppresses chronic inflammation in non-human primate models by controlling antigen-specific memory T cells. *Cell Stress*. 2018; 2(12), 362–364.
3. Inokuma M. S., Maino V. C., Bagwell C. B. Probability state modeling of memory CD8<sup>+</sup> T-cell differentiation. *J Immunol Methods*. 2013; 397(1–2), 8–17.
4. Shmarov V. A., Malashchenko V. V., Meniailo M. E., Gazatova N. D., Todosenko N. M., Melashchenko O. B., Goncharov A. G., Seledtsov V. I. Direct effects of interleukin-7 on the function of human T cells in vitro. *Eur Cytokine Netw*. 2016; 27(4), 102–107.

### APPLICATION OF *IN VITRO* CULTURAL MODELS WITH INTERLEUKIN-7 FOR ESTIMATING THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF T-LYMPHOCYTES

© 2019 V. A. Shmarov\*, A. G. Goncharov

\*E-mail: enant@list.ru

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received: 25.07.2019. Accepted: 28.08.2019

Currently, studies on the action of cytokines on the functional activity of immunocompetent cells are of great scientific interest. The most significant is the use of various models of the immune system cells culture. This paper describes two cellular models used to study the direct effect of interleukin-7 on the functional properties of T-lymphocytes. Interleukin-7 (IL-7) is involved in the main stages of the T-cell life cycle: carrying out the signals necessary for survival, differentiation, proliferative activity, protection from apoptotic death, homeostatic maintenance of the number of T-lymphocytes. The directionality and severity of the effects of IL-7 was evaluated on the proposed homeostatic and activation T-cell models *in vitro*.

*Key words:* T-lymphocytes, interleukin-7, incubation, flow cytometry

#### Authors:

**Shmarov V. A.**, ✉ Junior research fellow, Center for Medical Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia. E-mail: enant@list.ru;

**Goncharov A. G.**, PhD, Deputy Director of the Medical Institute for Scientific Work, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

## РОЛЬ ТРЕХМЕРНЫХ МАТРИКСОВ, ИМИТИРУЮЩИХ РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТНУЮ ТКАНЬ В ФОРМИРОВАНИИ ПУЛА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

© 2019 г. Л. С. Литвинова<sup>1</sup>, К. А. Юрова<sup>1\*</sup>, В. В. Шуплецова<sup>1</sup>,  
О. Г. Хазиахматова<sup>1</sup>, Е. С. Мелашенко<sup>1</sup>, В. В. Малащенко<sup>1</sup>,  
Е. О. Шунькин<sup>1</sup>, Ю. П. Шаркеев<sup>3</sup>, Е. Г. Комарова<sup>3</sup>, М. Б. Седельникова<sup>3</sup>,  
И. К. Норкин<sup>1</sup>, К. И. Прокин<sup>1</sup>, П. А. Иванов<sup>1</sup>, И. А. Хлусов<sup>2</sup>

\*E-mail: kristina\_kofanova@mail.ru

<sup>1</sup>Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград, Россия;

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

<sup>3</sup>Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск

Поступила: 27.07.2019. Принята: 30.08.2019

Исследование посвящено поиску критериев для создания новых биорезорбируемых материалов, формирующих ниши гемопоэтических стволовых клеток, обеспечивающих васкуляризацию регенерирующей костной ткани. В проведенном эксперименте выявлено, что формирование пула гемопоэтических стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro* зависит от индекса шероховатости поверхности искусственного матрикса.

**Ключевые слова:** трехмерный матрикс, кальцийфосфатное покрытие, ММСК жировой ткани, гемопоэтические ниши, костная ткань

DOI: 10.31857/S102872210007088-1

**Адрес:** 236029 Калининград, ул. Гайдара, 6, «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, Юрова Кристина Алексеевна. Тел.: 595–595 доб. 6634.

**E-mail:** kristina\_kofanova@mail.ru

**Авторы:**

**Литвинова Л. С.**, д.м.н., заведующая базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Юрова К. А.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Шуплецова В. В.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Хазиахматова О. Г.**, к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Мелашенко Е. С.**, биолог центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Малащенко В. В.**, инженер исследователь центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Шунькин Е. О.**, инженер исследователь базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Шаркеев Ю. П.**, д.ф.-м.н., профессор, зав. лаб. физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

**Комарова Е. Г.**, к.т.н., младший научный сотрудник лаборатории физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

**Седельникова М. Б.**, д.т.н., старший научный сотрудник лаборатории физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

**Норкин И. К.**, аспирант БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Прокин К. И.**, студент БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Иванов П. А.**, научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

**Хлусов И. А.**, д.м.н., профессор кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия.

Реконструкция возникающих травматических дефектов костной ткани является основной задачей травматологии и ортопедии. Современные фундаментальные исследования в области биологии стволовых клеток убедительно доказывают важную роль ниш гемопоэтических стволовых клеток, определяющих васкуляризацию регенерирующих органов и тканей, в формировании костной ткани. Согласно данным

научной периодики, нишевые территории гемопоэтических стволовых клеток в костной ткани могут образовываться *de novo* (Dellatore S. M. et al., 2008). Однако условия образования ниш гемопоэтических стволовых клеток, а также условия формирования пула гемопоэтических стволовых клеток, до сих неизвестны. Таким образом, целью настоящей работы явилось выявление условий формирования пула гемопоэтических стволовых клеток в условиях культивирования *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) были выделены из липоспирата человека (Разрешение № 7 от 09.12.2015 локального этического комитета Инновационного парка БФУ имени И. Канта) и соответствовали минимальным критериям, предъявляемым к ММСК. Двухмерная модель культивирования на пластике являлась контролем для оценки морфофункционального состояния клеток, культивируемых в присутствии трехмерного (3D) матрикса, имитирующего рельеф регенерирующей костной ткани.

Трехмерные матриксы размером 10x10x1 мм<sup>3</sup> с двусторонним покрытием из фосфатов кальция, имитирующим рельеф минерального вещества регенерирующей костной ткани, были изготовлены из коммерчески чистого титана ВТ1-0 (содержание составных элементов в весовых процентах: 99,58 Ti, 0,12 O, 0,18 Fe, 0,07 C, 0,04 N, 0,01 H) методом микродугового оксидирования на установке Microarc-3.0 (на базе Института физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск) в анодном режиме.

Для оценки дифференцировки клеток в присутствии разработанных матриксов, ММСК культивировали в присутствии имплантов в 12-луночных стерильных пластиковых культуральных плоскодонных планшетах (Orange Scientific, Бельгия; площадь лунки 1,86 см<sup>2</sup>). Имплант помещали в центр лунки, клеточной суспензией (2x10<sup>4</sup> кл в 100 мкл полной питательной среды) аккуратно покрывали всю верхнюю плоскость импланта. Затем планшет с культурой оставляли на 120 минут во влажной камере для адгезии клеток, после чего в лунки добавляли по 1 мл полной питательной среды (90% DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США), 10% FBS (Sigma-Aldrich, США), 50 мг/л гентамицина (Invitrogen, Великобритания), 280 мг/л L-глутамин (Sigma-Aldrich, США) и культивировали в течение 14 суток со сменой среды каждые 2–3 дня.

Проточную цитометрию для определения антигенных детерминант ММСК проводили с использованием MSC Phenotyping Kit human – 130-095-198 («MiltenyiBiotec», США) согласно протоколу фирмы-производителя, после чего клетки подвергали анализу на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия), обработку полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходная (до культивирования) средняя жизнеспособность культуры ММСК-ЖТ человека составила 95%. После окончания времени инкубации (14 суток) в 2D-культуре на пластике доля живых клеток варьировала в пределах 87–98% (в 10 лунках культуральных планшетов). После 14-дневного сокультивирования ММСК-ЖТ с 3D-матриксами, несущими рельефное кальцийфосфатное покрытие, процент жизнеспособных клеток составил 82–95% (14 тестируемых образцов 3D-матриксов с различной шероховатостью). Таким образом, 3D-матриксы не оказывали цитотоксического влияния на ММСК-ЖТ человека при 14-дневном культивировании.

По окончании 14 дней культивирования, значения, число клеток, экспрессирующих молекулы CD73, CD90 и CD105, составляло более 95%, содержание клеток с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD20 не превышало 3,21%, что соответствовало результатам, полученным до культивирования. Сокультивирование ММСК-ЖТ с трехмерными матриксами, имитирующими рельеф минерального вещества регенерирующей костной ткани, способствовало увеличению числа клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD20) в среднем, до 5,35% на фоне снижения клеток, несущих молекулу CD105. Важно отметить, что изменения коррелировали с индексом шероховатости кальцийфосфатного покрытия. Содержание кроветворных клеток, экспрессирующих CD45, CD34, CD14, CD20 детерминанты, напротив, увеличилось (p<0.05).

По результатам проведенного эксперимента было выявлено, что трехмерные матриксы с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим рельеф минерального вещества регенерирующей костной ткани способствуют увеличению гемопоэтических клеток в условиях

культивирования *in vitro* на фоне снижения ММСК. Вероятно, искусственно созданные микротерритории выполняют роль гемопоэтических ниш, где популяция гемопоэтических клеток, выделенная с фракцией ММСК-ЖТ, могут пролиферировать, наращивая клеточную массу. Исследование выполнено при финан-

совой поддержке РНФ (Соглашение № 18-75-00071).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Dellatore S. M., Garcia A. S., Miller W. M.* Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion // Current opinion in biotechnology, 2008, 19 (5), P. 534–540.

## THE ROLE OF THREE-DIMENSIONAL MATRICES IMITATING BONE TISSUE REGENERATION IN THE FORMATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS POOL UNDER *IN VITRO* CULTIVATION CONDITIONS

© 2019 L. S. Litvinova<sup>1</sup>, K. A. Yurova<sup>1\*</sup>, V. V. Shupletsova<sup>1</sup>, O. G. Khaziakhmatova<sup>1</sup>, E. S. Melashchenko<sup>1</sup>, V. V. Malashchenko<sup>1</sup>, E. O. Shunkin<sup>1</sup>, Y. P. Sharkeyev<sup>3</sup>, E. G. Komarova<sup>3</sup>, M. B. Sedelnikova<sup>3</sup>, I. K. Norkin<sup>1</sup>, K. I. Prokin<sup>1</sup>, P. A. Ivanov<sup>1</sup>, I. A. Khlusov<sup>2</sup>

\*E-mail: kristina\_kofanova@mail.ru

<sup>1</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia

Received: 27.07.2019. Accepted: 30.08.2019

The study is devoted to the search criteria for creating new bioresorbable materials that form hematopoietic stem cell niches that provide vascularization of regenerating bone tissue. In the experiment, it was revealed that the formation of hematopoietic stem cells pool under *in vitro* cultivation conditions depends on the surface roughness index of the artificial matrix.

*Key words:* three-dimensional matrix, calcium phosphate coating, adipose tissue MSCs, hematopoietic niches, bone tissue

### Authors:

**Litvinova L. S.**, Doctor of Medical Science, Head of the Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Yurova K. A.**, Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia. E-mail: kristina\_kofanova@mail.ru;

**Shupletsova V. V.**, Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Haziakhmatova O. G.**, Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Melashchenko E. S.**, Biologist of the Center for Medical Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Malashchenko V. V.**, Researcher, Center for Medical Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Shunkin E. O.**, Engineer Researcher Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Sharkeyev Yu. P.**, Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Head of Laboratory of Physics of nanostructured biocomposites of Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia;

**Komarova E. G.**, Ph.D., Junior Researcher, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites of Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia;

**Sedelnikova M. B.**, Doctor of Technical Science, Doctor of Technical Sciences Senior Researcher, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites of Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia;

**Norkin I. K.**, Ph.D., student of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Prokin K. I.**, student of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Ivanov P. A.**, Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Khlusov I. A.**, Ph.D., Professor of the Department of Morphology and General Pathology of the Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation, Tomsk, Russia.

## Авторский указатель

<b>А</b>				
Абдуллаева Л. Х.	1377	Дмитриева Л. А.	1457	
Айтбаев К. А.	1426	Добрынина М. А.	1469, 1472	
Аклеев А. А.	1423	Долгушин И. И.	1423	
Алексеев А. А.	1479	Дробышевская В. Г.	1460	
Алексеева Л. А.	1331	Дудченко Л. Ш.	1463	
Алымкулова А. Д.	1426	<b>Е</b>		
Альдхамбаева И. Ш.	1520	Емелина Ю. Н.	1466	
Анушенко А. О.	1531	Емельянова Н. П.	1488	
Анциферова Ю. С.	1377	<b>Ж</b>		
Арсенина В. Ю.	1503	Железникова Г. Ф.	1331	
<b>Б</b>			Жук И. Е.	1517
Балыкова Е. В.	1393	<b>З</b>		
Барсуков А. А.	1479	Захарова Е. В.	1540	
Беленюк В. Д.	1385	Земсков В. М.	1479	
Березовская К. В.	1543	Зокиров Н. З.	1537	
Блинова Е. А.	1423	Зуков Р. А.	1372	
Бляхер М. С.	1429	Зурочка А. В.	1469, 1472	
Богданова А. А.	1491	Зурочка В. А.	1469, 1472	
Борзенко С. А.	1485	<b>И</b>		
Борисов А. Г.	1385	Иванов Д. С.	1402	
Борисов С. А.	1432	Иванов П. А.	1497, 1555	
Бугаенко Е. Г.	1435	Илларионов А. С.	1531	
Бугоркова С. А.	1412	Искандярова М. С.	1528	
Бурыгина Е. В.	1482	<b>К</b>		
<b>В</b>			Кадырова Р. М.	1546
Васнева Ж. П.	1438, 1441	Карагулова С. Т.	1522	
Вафин И. А.	1365	Карпова В. Н.	1540	
Вержбицкая Н. Е.	1365	Каспаров Э. В.	1432	
Власова А. Н.	1435	Кириенкова Е. В.	1444	
Волгин А. Р.	1454	Климко Н. Н.	1482	
Волкова Т. О.	1491	Климов В. И.	1454, 1517	
Вульф М. А.	1444	Клюева С. Н.	1412	
<b>Г</b>			Кныш С. В.	1476
Гаймоленко И. Н.	1435, 1447	Ковчур П. И.	1491	
Гапонов А. М.	1450	Кожевников В. А.	1412	
Герасимова Д. Г.	1485, 1531	Козлова М. Н.	1479	
Гилёва Р. А.	1540	Козлова Я. И.	1482	
Гладких В. Д.	1537	Комарова Е. Г.	1497, 1555	
Глушков А. А.	1365	Комах Ю. А.	1485, 1531	
Гончаров А. Г. ^	1506	Комбарова С. Ю.	1429	
Гончарова А. Ю.	1412	Корецкий К. А.	1402	
Гончаров А. Г.	1552	Костина Ю. А.	1528	
Гордеева Л. А.	1365	Костюшко А. В.	1494	
Горенков Д. В.	1454, 1517	Котелева С. И.	1429	
Гриценко В. А.	1469, 1472	Кочетков А. В.	1525	
<b>Д</b>			Кравцов А. Л.	1412
Демидова В. С.	1479	Красников В. Е.	1476	
Джолбунова З. К.	1546	Криволапова И. М.	1466	
		Кривцун О. А.	1460	

## Авторский указатель

Кудрявцев И. В.	1385, 1432	Пивоваров Ю. И.	1457
Кузнецов А. С.	1488	Писарев В. М.	1450
Кузнецов Н. И.	1534	Поленок Е. Г.	1365
Курмышкина О. В.	1491	Пономарева Н. Ю.	1525
Куртасова Л. М.	1372	Потапова Н. Л.	1435, 1447
<b>Л</b>		Потапов А. С.	1531
Лазанович В. А.	1494	Прокин К. И.	1497, 1555
Лазарев В. В.	1525	<b>Р</b>	
Лебедев В. Ф.	1457	Радаева О. А.	1528
Литвинова Л. С.	1444, 1497, 1555	Радыгина Т. В.	1485, 1531
Луценко В. А.	1365	Рамазанова З. К.	1429
<b>М</b>		Рогозин А. И.	1365
Майназарова Э. С.	1500, 1546	Романова Е. С.	1534
Малашенко В. В.	1497, 1506, 1555	Рыжкова А. В.	1365
Мальшкина А. И.	1377	Рябов А. Ю.	1393
Мамаева Т. А.	1402	<b>С</b>	
Маркелова Е. В.	1488, 1503	Савченко А. А.	1372, 1385, 1432
Мартыненко И. Г.	1429	Седельникова М. Б.	1497, 1555
Матюшкина Л. С.	1509	Серебрякова А. П.	1509
Маценко М. В.	1432	Середа Т. В.	1540
Мачтарева Е. С.	1476	Сидорова О. Н.	1509
Маянская Т. В.	1540	Симакова А. И.	1476
Мелашенко Е. С.	1497, 1555	Симбирцев А. С.	1528
Мелашенко О. Б.	1506	Скрипченко Е. Ю.	1331
Меняйло М. Е.	1506	Скрипченко Н. В.	1331
Мергенов А. Э.	1520	Скуратовская Д. А.	1444
Минина В. И.	1365	Смердова М. А.	1402
Митьковский В. Г.	1525	Соболева А. Р.	1444
Мокеева М. В.	1438, 1441	Соболев А. В.	1482
Мун С. А.	1365	Степанян С. А.	1444
Мырзакулова А. Ж.	1500	<b>Т</b>	
<b>Н</b>		Тимофеева А. М.	1347
Наумова М. А.	1402	Тойгомбаева В. С.	1500, 1520, 1522
Невежкина Т. А.	1509	Топтыгина А. П.	1402
Невинский Г. А.	1347	Трошина В. В.	1537
Нестерова И. В.	1512	Тулупова М. С.	1509
Никитина Т. Н.	1454, 1517	Тульская Е. А.	1429
Никифорова Н. А.	1540	Тутельян А. В.	1450
Ниязалиева М. С.	1520, 1522	Тюмонбаева Н. С.	1500
Норкин И. К.	1497, 1555	<b>У</b>	
<b>О</b>		Урбанова М. С.	1488
Образцов И. В.	1393	Учеваткина А. Е.	1549
Орозбекова Б. Т.	1426	<b>Ф</b>	
<b>П</b>		Файзуллина А. И.	1469, 1472
Парамонов А. И.	1393	Федорова И. М.	1429
Петричук С. В.	1485, 1531	Филипович О. М.	1534
Петров А. А.	1488	Филиппова Л. В.	1549
Петрова А. И.	1447	Фисенко А. П.	1531

Авторский указатель

Фисенко В. Г.	1503	<b>Ш</b>	
Фомина Л. О.	1469, 1472	Шабашова Н. В.	1549
Фомина О. И.	1503	Шакина Н. А.	1372
Фролова Е. В.	1549	Шаркеев Ю. П.	1497, 1555
<b>Х</b>		Шишкина Н. С.	1479
Хазиахматова О. Г.	1497, 1555	Шмаров В. А.	1552
Хлусов И. А.	1497, 1555	Шуматов В. Б.	1494
Хохлова А. С.	1488	Шунькин Е. О.	1497, 1506, 1555
Хохлова З. А.	1540	Шуплецова В. В.	1497, 1555
Худякова М. И.	1543	<b>Щ</b>	
<b>Ц</b>		Щуковская Т. Н.	1412
Цуранова Н. С.	1393	<b>Ю</b>	
<b>Ч</b>		Юрова К. А.	1497, 1555
Черевко Н. А.	1543	<b>Я</b>	
Чечетова С. В.	1546	Ямпольская Е. Н.	1525